

**LAS BIOMOLÉCULAS Y SU METODOLOGÍA
BÁSICA EXPERIMENTAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:**

JORGE SUÁREZ MEDINA

ASESORA: Q.F.B. MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

CUAUTILÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO. 2006



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 esta 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.

DEDICATORIA

A Dios quien día a día me da una lección de vida, y que de un momento a otro ha hecho que las cosas cambien y presenten un mejor matiz en mi vida; quien me muestra que el verdadero camino hacia el conocimiento está en los detalles, la sencillez y en lo minúsculo de la naturaleza; que lo que hoy es poderoso, mañana terminará por decaer.

A mi esposa e hijos quienes siempre serán una motivación para ser mejor en la vida que ésta tesis sea un ejemplo del valor al sacrificio.

A mi madre y hermanos quienes siempre creyeron en mi y me alentaron a seguir adelante en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis amigos universitarios, a Cesar Osorio Chávez, Vidal Briones García, a la secre Mago y a mis compañeros y amigos de trabajo quienes en todo momento me alentaron para que me titulara y no dejaron que decayera.

“A aquella flor divina que con su aroma devuelve el recuerdo, con su aliento la vida, con su néctar la gloria y con su presencia, el mismo ser.

Por que hay 4 cosas que un ser humano jamás debe dejar escapar ni perder la felicidad, el amor, las oportunidades y el tiempo. Y porque la vida no está para resolver duelos sino para vivirla como si fuera el último día”. Lebana. O. L.

A los eventos desafortunados y a las personitas que en un momento de mi vida lejos de apoyarme me obstruyeron el camino, gracias por mostrarme el camino hacia la fortaleza en ésta vida “Lo que no me mata me fortalece” Krisnamurti

E N M E M O R I A

A mi querido padre Agustín Suárez Pérez, quien en todo momento ha velado por mí y me ha cuidado hasta de mis propias imprudencias, por su tiempo en vida, por su ejemplo y por los momentos de felicidad que me brindó en la infancia.

Ésta tesis es mi mayor logro y por ésta razón es para ti.

Tu memoria es uno de los mayores obsequios de la vida. †

A G R A D E C I M I E N T O S .

Mi total y profundo agradecimiento a todos mis maestros de asignatura, pero en especial a aquellos que intervinieron con su experiencia y su gran amistad.

Q.F.B. María Ester Revuelta Miranda
M.C. María Eugenia Pozada Galarza.
Dr. José Guillermo Peniéres Carrillo.
Dra. Sandra Días Barriga
M.C. Q. Luis Antonio Martínez Arellano
Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez
M. en C. Maru posada Galarza
Q.F.B. Elia Granados Enrique
Q.F.B. Juan Chiu Chang
Q.F.B. Hector Coss Garduño.

Quienes con sus asesorías y consejos lograron que este trabajo llegara a buen término.

¡Gracias Amigos!

A los señores
Romel Flores Jiménez y
Guillermo Guzmán Burgoa

Que en todo momento me apoyaron en la orientación y búsqueda de la bibliografía adecuada, aún más allá de sus labores, y de manera desinteresada.

¡Gracias!.

P E N S A M I E N T O S .

A MIS MAESTROS

“Que tomaron lo que les fue dado y
que dieron lo que no podía ser tomado”

Mezquita de la Medina.

“Después de llega al a cima
de la montaña ¡sigue subiendo!”

Sentencia Zen

“El hombre solo debe de usar aquello
que ha aprendido a usar”

Tradición Derviche

“El valor de un hombre se mide
por el número de intentos en los
que éste se da por vencido.”

Honsho Jutsu

“Querer regular todo con escuadra
son y compás es ofender a la naturaleza”
Leonardo Da Vinci

“Las faltas del hombre superior
son como eclipses de sol y de luna:
si las comete, todos las ven; si se
corrige todos le contemplan”
Aforismos del sendero de la virtud.

“¿Cómo puedo saber que lo que llamo conocer no es ignorar?
Si queriendo entender la realidad no lo consigo, no detendré
por esto la verdad.” Aforismos del sendero de la virtud.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	7
JUSTIFICACIÓN	8
METODOLOGÍA	11

capítulo 1: agua

1.-AGUA	13
1.A.- PÉRDIDA DE AGUA POR SECADO PARA MUESTRAS BIOLÓGICAS	14
1.B.- DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL AGUA POR SU TEMPERATURA DE CONGELACIÓN	15
1.C.- CUANTIFICACIÓN DE AGUA POR SECADO CON ESTUFA DE VACÍO PARA SALES ANHIDAS Y PRODUCTOS FARMACÉUTICOS	17
1.D.- DETERMINACIÓN DE H ⁺ Y O ⁻ A PARTIR DE AGUA, USANDO LA TÉCNICA DEL VOLTÁMETRO DE HOFFMAN (ELECTRÓLISIS)	19
1.E.- DETERMINACIÓN DE AGUA POR MEZCLAS AZEOTRÓPICAS	21
1.F.- VALORACIÓN POR REACTIVO DE KARL FISHER	23

capítulo 2: CARBOHIDRATOS

2.- CARBOHIDRATOS	26
2.A.- REACCIÓN DE FEHLING – DETERMINACIÓN GENERAL PARA AZÚCARES REDUCTORES.	27
2.B.- PRUEBA DE BENEDICT – AZÚCARES REDUCTORES	28
2.C.- REACCIÓN DE MOLISH – UDRANSKY PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE AZÚCARES REDUCTORES	29
2.D.- REACCIÓN DE TOLLENS	30
2.1.-MONOSACÁRIDOS	31
2.1.A.- REACCIÓN DE OZONAS PARA MONOSACÁRIDOS REDUCTORES	32
2.1.B.- PRUEBA DE DUBOWSKY PARA GLUCOSA. ORTOTOLUIDINA MEDIO ÁCIDO	33
2.1.C.- PRUEBA DE BIAL – IDENTIFICACIÓN DE MONOSACÁRIDOS	34
2.1.D.- CURVA PATRÓN DE LA RIBOSA Y LA DESOXIRIBOSA CON DIFENILAMINA	35
2.1.E.- MUTARROTACIÓN DE LOS AZÚCARES	36

2.2.-DISACÁRIDOS	37
2.2.A.- CUANTIFICACIÓN DE LACTOSA	38
2.3.- OLIGOSACÁRIDOS	39
2.4.-POLISACÁRIDOS	40
2.4.A.- REACCIÓN CON LUGOL – DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN	41
2.4.B.- REACCIÓN DE SCHWEITZER – SOLUBILIDAD DE LA CELULOSA	42
2.4.C.- REACCIÓN DE MILLAR – CAMELIZACIÓN O PIRÓLISIS DE LOS AZÚCARES	43

CAPÍTULO 3: LÍPIDOS

3.- LÍPIDOS	47
3.A.- PRUEBA DE LA HUELLA TRANSLÚCIDA EN PAPEL NO TRANSPARENTE	48
3.B.- PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE LÍPIDOS	49
3.C.- DETECCIÓN DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS GENERALES DE UNA GRASA POR MEDIO DE SUS ÍNDICES	50
3.1.- LÍPIDOS SIMPLES	52
3.1.A.- DETECCIÓN DE ÉSTERES DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN GRASAS Y CERAS	53
3.1.B.- DETECCIÓN DE LOS ÉSTERES DE LOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (GRUPO FUNCIONAL DE LAS GRASAS)	54
3.1.C.- PRUEBA DE SUDAN III Y IV	55
3.1.D.- SAPONIFICACIÓN DE UN GRASA: OBTENCIÓN DE ÁCIDO PALMITICO (LÁURICO – MIRÍSTICO) Y SUS ÉSTERES (I)	56
3.1.E.- SAPONIFICACIÓN DE UN GRASA: OBTENCIÓN DE ÁCIDO PALMITICO (LÁURICO – MIRÍSTICO) Y SUS ÉSTERES (II)	57
3.1.F.- PIRÓLISIS O CRACKING DEL ACEITE DE RICINO	58
3.1.G.- DETECCIÓN DEL GLICEROL MEDIANTE LA CONVERSIÓN EN ACROLEINA	60
3.1.H.- DETECCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS SUPERIORES EN PARAFINA Y VASELINA	61
3.2.- LÍPIDOS COMPUESTOS	62
3.2.A.- REACCIÓN DEL COLESTEROL POR LIBERMAN – BUCHARD Y SALKOSKI	63
3.2.B.- EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FOSFOLÍPIDOS	64

3.3.- DERIVADOS DE LÍPIDOS	66
3.3.A.- DETERMINACIÓN DE GRASAS POR SU ISOMERÍA CIS – TRANS	67
3.3.B.- EXTRACCIÓN DE UN ACEITE ESENCIAL – DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR	68
3.3.C.- REACCIÓN DE IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN VEGETALES	71

capítulo 4: aminoácidos

4.- AMINOÁCIDOS	74
4.A.- PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE UREA Y FORMACIÓN DE UN COMPUESTO DE UREA	75
4.B.- FORMACIÓN DE RESINA DE UREA	76
4.C.- IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO POR ENSAYO DE LA MUREXIDA	77
4.1.- AMINOÁCIDOS – CON CADENAS LATERALES ÁCIDAS	78
4.1.A.- DESENMASCARAMIENTO DE LOS GRUPOS ÁCIDOS EN LOS AMINOÁCIDOS	79
4.2.- AMINOÁCIDOS – CON CADENAS LATERALES BÁSICAS	80
4.3.- AMINOÁCIDOS – CON CADENAS LATERALES POLARES, SIN CARGA EN EL pH FISIOLÓGICO	81
4.3.A.- IDENTIFICACIÓN DE GLICINA	82
4.4.- AMINOÁCIDOS – CON CADENAS LATERALES NO POLARES O HIDRÓFOBAS	83
4.4.A.- DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS CON TIOCIANATO DE POTASIO FUNDIDO	84
4.4.B.- PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE 7 AMINOÁCIDOS	85
4.4.C.- PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE 9 AMINOÁCIDOS	86
4.5.- AMINOÁCIDOS – NO PROTEICOS	87
4.5.A.- REACCIÓN DE LA NINHIDRINA I – DETECCIÓN DE AMINOLÍPIDOS	88

capítulo 5: proteínas

5.- PROTEÍNAS	96
5.A.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR PRUEBA DE BIURET	97
5.B.- REACCIÓN DE LA NINHIDRINA II – DETECCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS DE UNA PROTEÍNA	98
5.C.- REACCIÓN DE LAS XANTOPROTEÍNAS O REACCIÓN DE MULDER	99
5.D.- REACCIÓN DE KJELDAHL PARTE I	100
5.E.- REACCIÓN DE KJELDAHL PARTE II	101
5.F.- REACCIÓN DE FOLIN – WU	102

5.1.- PROTEÍNAS SIMPLES – ESTRUCTURA PRIMARIA	103
5.1.A.- FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS DE BENCE – JONES	104
5.1.B.- ENSAYO DE MILLON	106
5.2.- PROTEÍNAS SIMPLES – ESTRUCTURA SECUNDARIA	107
5.2.A.- PRUEBA DEL DESDOBLAMIENTO TÉRMICO DE UN IMINOCOMPUESTO	108
5.3.- PROTEÍNAS SIMPLES – ESTRUCTURA TERCIARIA	109
5.3.A.- PRUEBA DE TIMOL O PRUEBA DE MACLAGAN	110
5.3.B.- PRUEBA DE LOWRY	111
5.3.C.- PRUEBA DE HARRISON	112
5.3.D.- PRUEBA DEL ÉSTER ETÍLICO DE LA TETRABROMOFENOLFTALEÍNA	113
5.4.- PROTEÍNAS SIMPLES – ESTRUCTURA CUATERNARIA	114
5.4.A.- PRUEBA DE DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR COAGULACIÓN	115
5.5.- LOS PROTÉIDOS	116
5.5.A.- DETERMINACIÓN DE METALOPROTEÍNAS	117
5.5.B.- REACCIÓN DE LA CASEÍNA – PEGAMENTO LÁCTEO	118

capítulo 6: ENZIMAS

6.- ENZIMAS	123
6.A.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA UREASA – EFECTO DEL TIEMPO EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN	124
6.B.- REACCIÓN DE LA CASEÍNA CON CUAJO – OBTENCIÓN DE QUESO	125
6.C.- EFECTO DE LA ENZIMA (BROMELINA) DE LA PIÑA EN GELATINA	126
6.1.- ISOENZIMAS	127
6.1.A.- EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENILOXIDASA DE UN ALIMENTO NATURAL	128
6.1.B.- EVIDENCIAR LA PRESENCIA DE PEROXIDASA EN DISTINTOS ALIMENTOS NATURALES	129
6.2.- COENZIMAS Y VITAMINAS	130
6.2.A.- EXTRACCIÓN DE BETACAROTENOS DE LA ZANAHORIA	131
6.2.B.- SEPARACIÓN DE PIGMENTOS POR CROMATOGRFÍA EN ESPINACAS (ENZIMAS VEGETALES)	132
6.2.C.- DETERMINACIÓN DE VITAMINA C	134
6.3.- ZIMÓGENO – PROENZIMA	135
6.4.- IONES METÁLICOS	136
6.5.- HOLOENZIMA	137

CAPÍTULO 7: LAS MOLÉCULAS MAESTRAS LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

7.- LAS MOLÉCULAS MAESTRAS	144
7.A.- OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE ADN HUMANO	145
7.1.- ÁCIDOS NUCLEICOS	146
7.1.A.- EXTRACCIÓN CASERA DE ADN	147
7.1.B.- EXTRACCIÓN DE ADN ANIMAL I	148
7.1.C.- EXTRACCIÓN DE ADN ANIMAL II	149
7.1.D.- EXTRACCIÓN DE ADN DE FRUTA	150
7.1.E.- AISLAMIENTO DE ADN Y ARN DE MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS	151
7.1.F.- CAMBIOS HIPERCROMÁTICOS Y DE VISCOSIDAD EN ADN PURO CON EFECTOS DE pH	159
7.2.- ADN – LINEAL	161
7.2.A.- IDENTIFICACIÓN DE PURINAS POR ENSAYO DE LA MUREXIDA	162
7.2.B.- DETERMINACIÓN DE ADN POR SUS BASES	163
7.2.C.- IDENTIFICACIÓN DE LOS AZÚCARES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	164
7.2.D.- CURVA PATRÓN DE LA DESOXIRIBOSA CON DIFENILAMINA	165
7.2.E.- TÉCNICA DE FISKE Y SUBARROW – CURVA PATRÓN DE FÓSFORO DE ADN	167
7.3.- ADN CIRCULAR	168
7.3.A.- AISLAMIENTO DEL ADN DE LEVADURAS Y DE BACTERIAS	169
7.4.- ADN.- LOS GENES	170
7.4.A.- DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	171
7.4.B.- SEPARACIÓN DE ADN POR ELECTROFORESIS EN GEL AGAROSA	172
7.4.C.- AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN EN AGAROSA POR ELECTROFORESIS	176
7.4.D.- OBTENCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN	177
7.4.E.- TÉCNICA Glass- Max, BRL Y TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN MEMBRANA DE CELULOSA DEAE	178
7.4.F.- TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	179

7.5.- ADN.- LOS CROMOSOMAS	181
7.5.A.- TÉCNICA PARA OBTENER SEXOCROMATINA DE RAÍZ DE CABELLO	182
7.5.B.- OBSERVACIÓN DE SEXOCROMATINA EN CÉLULAS EPITELIALES	183
7.5.C.- TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE LA CROMTINA "Y"	184
7.5.D.- OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS HUMANOS	185
7.5.E.- OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS DE CEBOLLA	188
7.5.F.- PREPARACIÓN DE DROSOPHILA MELANOGASTER Y CONSERVACIÓN DEL ADN	189
7.5.G.- TÉCNICA PARA OBTENER CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE DROSOPHILA MELANOGASTER	190
7.6.- LOS ARN'S	194
7.6.A.- AISLAMIENTO DE ARN RIBOSOMAL	195
7.6.B.- CURVA PATRÓN DE LA RIBOSA CON ORCINOL	196
7.6.C.- CURVA PATRÓN DE LA RIBOSA CON DIFENILAMINA	198
RESULTADOS	207
CONCLUSIONES	208
APÉNDICE	209
BIBLIOGRAFÍA	230

ÍNDICE DE ESQUEMAS

LAS BIOMOLÉCULAS

ESQUEMA A.	-----	1
La Gran importancia de las Biomoléculas. Interacción y función de las Biomoléculas.		
ESQUEMA B.	-----	2
La Gran importancia de las Biomoléculas. Propiedades biológicas de las principales Biomoléculas.		

agua

ESQUEMA 1 A.	-----	16
Montaje para la determinación de la pureza del agua por su temperatura de congelación		
ESQUEMA 1 B.	-----	18
Montaje de un Picnómetro para la determinación de mezclas azeotrópicas		
ESQUEMA C.	-----	20
Esquema que nos muestra el montaje del voltámetro de Hoffman		
ESQUEMA 1 D.	-----	22
Montaje del picnómetro		
ESQUEMA 1 E.	-----	24
Esquema que nos muestra el montaje para una valoración de Karl Fisher		

CARBOHIDRATOS

ESQUEMA 2 A.	-----	44
Esquema que nos muestra una clasificación de los carbohidratos		
ESQUEMA 2 B.	-----	45
Clasificación clásica de los carbohidratos		

LÍPIDOS

ESQUEMA 3 A.	-----	51
Esquema que nos muestra el montaje para una valoración en los índices de grasa		
ESQUEMA 3 B.	-----	59
Equipo de destilación para una pirólisis del aceite de ricino		
ESQUEMA 3 C.	-----	65
Cromatografía Bidimensional de Fosfolípidos.		
ESQUEMA 3 D.	-----	69
Montaje para bidestillación de un aceite esencial de un producto natural		
ESQUEMA 3 E.	-----	70
Montaje de un soxhlet para la extracción un aceite esencial por arrastre de vapor		
ESQUEMA 3 F.	-----	72
Esquema que nos muestra una clasificación de los lípidos.		

AMINOÁCIDOS

ESQUEMA 4 A. Cromatografía Bidimensional de Aminolípidos	-----	89
ESQUEMA 4 B. Estructuras moleculares de los aminoácidos primera parte	-----	90
ESQUEMA 4 C. Estructuras moleculares de los aminoácidos segunda parte	-----	91
ESQUEMA 4 D. Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos primera parte	-----	92
ESQUEMA 4 E. Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos segunda parte	-----	93
ESQUEMA 4 F. Abreviaturas para los aminoácidos y sus propiedades biofísicas	-----	94

PROTEÍNAS

ESQUEMA 5 A. Montaje de una electroforesis de Bence – Jones sobre papel filtro Whatman número 1	-----	105
ESQUEMA 5 B. Esquema que nos muestra una clasificación de las proteínas	-----	119
ESQUEMA 5 C. Esquema que nos muestra una clasificación de las proteínas del albumen	-----	120
ESQUEMA 5 D. Esquema que nos muestra las diferentes conformaciones proteicas	-----	121

ENZIMAS

ESQUEMA 6 A. Montaje de una cromatografía en jeringa	-----	133
ESQUEMA 6 B. Reacciones de oxidación para la cresolasa y la catecolasa	-----	138
ESQUEMA 6 C. Ejemplo de compuestos que reaccionan con la enzima fenolasa	-----	139
ESQUEMA 6 D. Mecanismo de reacción para la formación de 2,6 – dicloroindofenol a partir de la enzima fosfatasa alcalina	-----	140
ESQUEMA 6 E. Esquema que muestra la reacciones que se dan entre ureasa y la lipoxigenasa	-----	141
ESQUEMA 6 F. Mecanismo de reacción de las enzimas pépticas	-----	142

LAS MOLECULAS MAESTRAS LOS ACIDOS NUCLEICOS

ESQUEMA 7 A. Centrifuga General de Laboratorio	-----	152
ESQUEMA 7 B. Obtención de Organelos y Biomoléculas	-----	153
ESQUEMA 7 B. Obtención de Lisosomas y Mitocondrias por Centrifugado	-----	154
ESQUEMA 7 C. Equipo de Electroforesis en Gel	-----	173
ESQUEMA 7 D. Procedimiento de Transferencia en Gel de agarosa	-----	174
ESQUEMA 7 E. Obtención de un Gen por Electroforesis con Gel de Agarosa	-----	175
ESQUEMA 7 F. Procedimiento de Sondeo y Fragmentación en PCR	-----	180
ESQUEMA 7 H. Cariotipo Humano	-----	186
ESQUEMA 7 G. Cariograma Humano	-----	187
ESQUEMA 7 I. Disección de las Glándulas Salivales en Larva de Mosca de <i>Drosophila melanogaster</i>	-----	191
ESQUEMA 7 J. Un Cromosoma Politénico de <i>Drosophila melanogaster</i>	-----	192
ESQUEMA 7 K. El Cuerpo Graso en Glándulas Salivales de <i>Drosophila melanogaster</i>	-----	193
ESQUEMA 7 L. Los Cromosomas Politénicos de <i>Drosophila melanogaster</i> a 40X	-----	200
ESQUEMA 7 M L. as Formas de los Ácidos Nucleicos	-----	201
ESQUEMA 7 N. Representación del ADN a través de modelos, vistos desde diferentes puntos de vista.	-----	202
ESQUEMA 7 Ñ. Preparación de una Huella Génica	-----	203
ESQUEMA 7 O. Comparación de Genes en una Escala	-----	204
ESQUEMA 7 P. ARN Representativo de Células Procariotas	-----	205
ESQUEMA 7 Q. ARN Representativo de Células Eucariotas	-----	206

ÍNDICE DE TABLAS

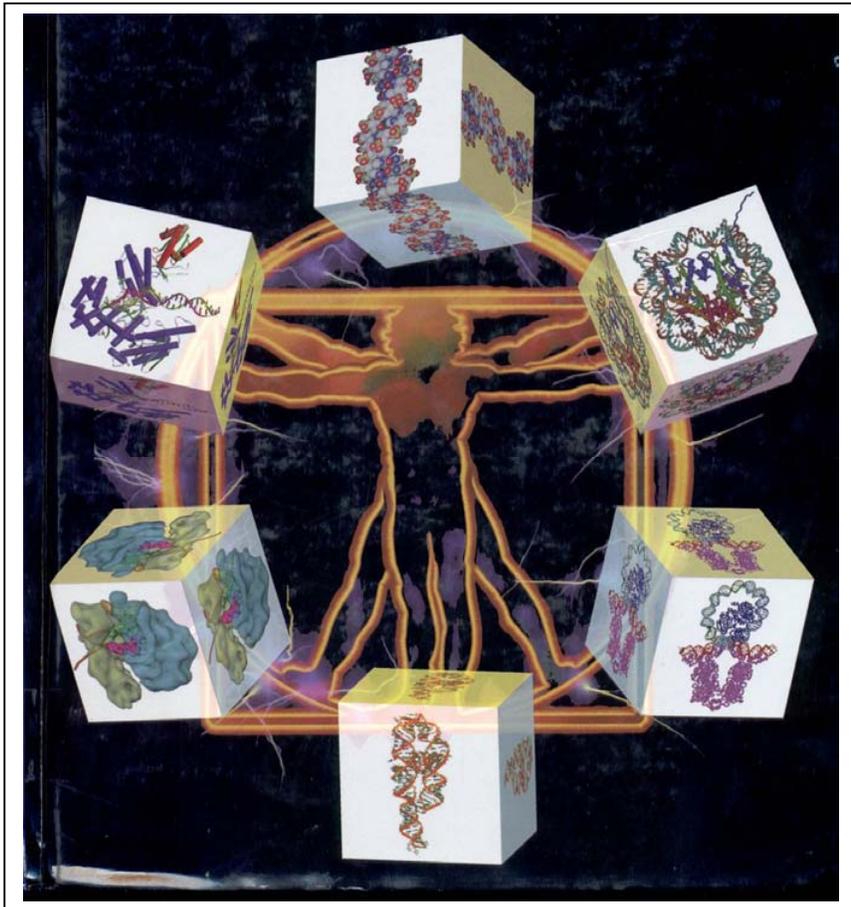
TABLA 7 A. Conversiones de r.p.m. a C.C.R.	-----	155
TABLA 7 B. Fraccionamiento Subcelular por Técnica de Centrifugación	-----	156
TABLA 7 C. Rendimiento de Fracciones Subcelulares por Centrifugado	-----	157
TABLA 7 D. *Cuantificación Adecuada de ARN	-----	158
TABLA 7 E. *Cuantificación adecuada de ADN y ARN	-----	158
TABLA 7 F. Condiciones Adecuadas de Reactivos para Hiperromaticidad en ADN	-----	160
TABLA 7 G. Parámetros de Medición para la curva patrón del ADN, Desoxirribosa con Difenilamina	-----	166
TABLA 7 H. Parámetros de Medición para la curva patrón del ARN con Orcinol	-----	197
TABLA 7 I. Parámetros de Medición para la curva patrón del ARN, Ribosa con Difenilamina (sustituyendo ADN por ARN).	-----	199
TABLA 7 J. Procedimiento de trabajo para las sondas Southern Blot, Northern Blot y Western Blot.	-----	202

ABREVIATURAS.

a.a	Aminoácidos
≈	Aproximadamente
Abs	Absorbancia
Br – Et	Bromuro de Etidio
Bco	Refiérase a un tubo blanco de lectura
°C	Refiérase a grados centígrados de temperatura
cm.	Centímetros
cmg	Centimorgans
C.C.R.	Campo centrifugo relativo
D	Dextrógiro
DCIP	Indofenol
DMF	Dimetilformamida
E	Enzima
e ^d	Edición
et. al.	Y otros autores
EDTA	Etilendiamintetracetato de sodio
g	Gramos
G	Campo centrifugo
GP	Grado de polimerización
°, hrs	Horas
I	Inhibidor enzimático
J	Joules, Julios
Kcal	Kilocalorías
KJ	Kilo Julios
Kb	Kilobases de ADN
Kg	Kilogramos
Km	Constante de Michaelis Mentel
L	Levógiro, litros
M°, M ⁺ , M ⁺⁺	Grados de oxidación de un metal
mA	Microampers
≥	Mayor o igual a
≤	Menor o igual a
M	Molaridad
mg	Miligramos
μg	Microgramos
', min	Minutos
ml	Mililitros
μl	Microlitros
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
μM,	Micromoles
mM	Micromolar
mol / L	Mol por litro
mmol / ml	Milimoles por mililitro
N	Normalidad
N°	Número
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro

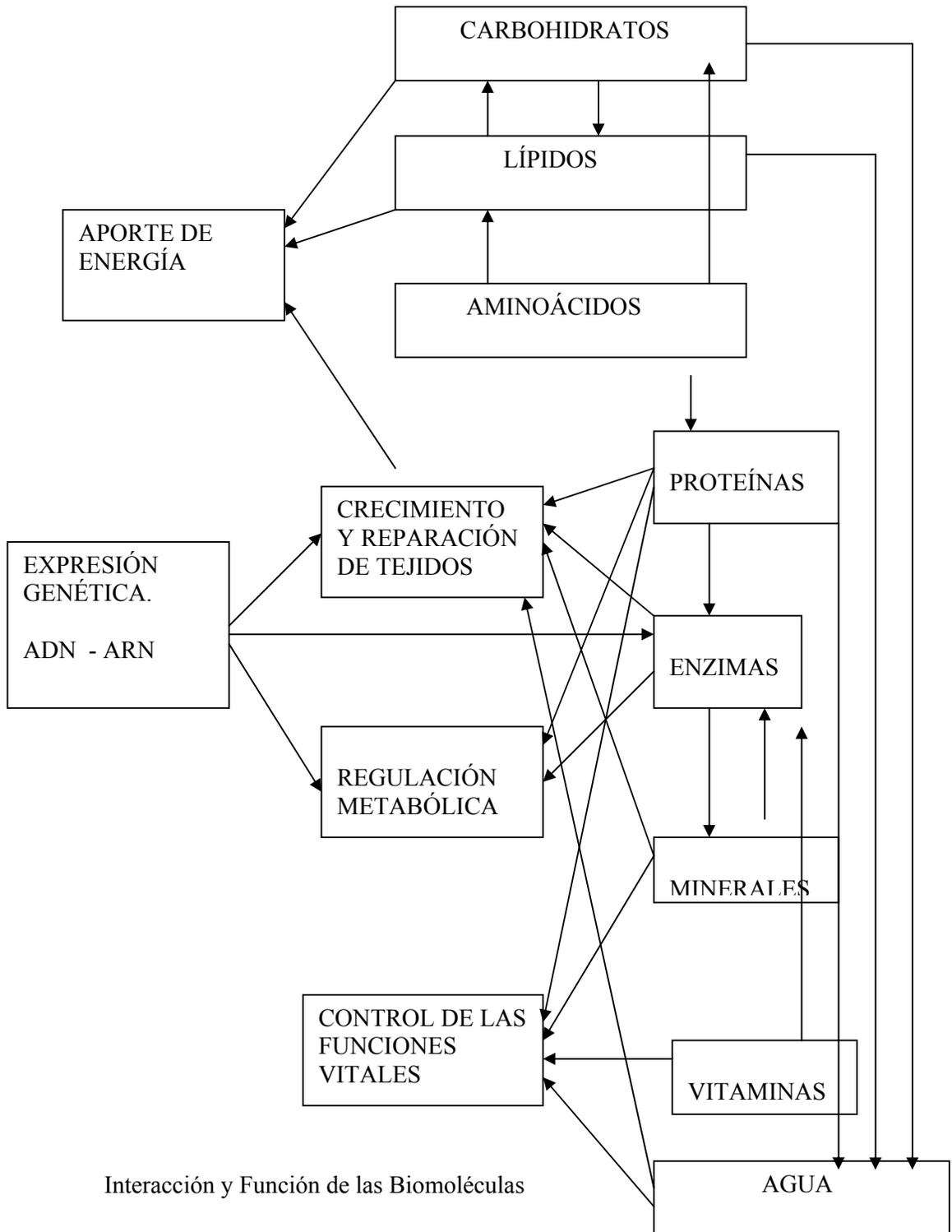
P	Producto enzimático, peso
Pb	Pares de bases
P/P	Peso por peso
PCA	Ac. Perclórico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecula
P/V	Peso por volumen
q.p	Grado reactivo
R (+)	Reacción positiva
R (-)	Reacción negativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S	Sustrato
' , seg.	Segundos
°T	Temperatura
TCA	Ac. Tricloroacético
TRIS	Desoxicolato de sodio
I TAE20X	Buffer específico para electroelución en gel de azarosa
UV, λv	Luz o radiación ultravioleta
V / V	Volumen por volumen
VTB	Volumen del tubo blanco
VTC	Volumen del tubo corregido
VTP	Volumen del tubo problema
xg	Fuerza gravitacional

LAS BIOMOLÉCULAS



ESQUEMA A

LA GRAN IMPORTANCIA DE LAS BIOMOLÉCULAS



ESQUEMA B

LA GRAN IMPORTANCIA DE LAS BIOMOLÉCULAS

TABLA 3-2 ✨ Las principales moléculas biológicas			
Clases de molécula	Principales subtipos	Ejemplo	Función
Carbohidrato: Generalmente con tiene carbono, oxígeno e hidrógeno, en la fórmula aproximada $(CH_2O)_n$	Monosacárido: Azúcar simple	Glucosa	Fuente de energía importante para las células; subunidad de la que están hechos la mayor parte de los polisacáridos
	Disacárido: Dos monosacáridos unidos	Sacarosa	Principal azúcar transportada en los cuerpos de las plantas terrestres
	Polisacárido: Muchos monosacáridos (generalmente glucosa) unidos	Almidón Glucógeno Celulosa	Almacenamiento de energía en plantas Almacenamiento de energía en animales Material estructural en plantas
Lípido: Contiene una alta proporción de carbono e hidrógeno; generalmente es no polar e insoluble en agua.	Triglicérido: Tres ácidos grasos unidos a un glicerol	Aceite, grasa	Almacenamiento de energía en animales y algunas plantas
	Cera: Números variables de ácidos grasos unidos a una cadena larga de alcohol.	Ceras en cutícula de plantas	Cubierta a prueba de agua en las hojas y tallos de las plantas de tierra
	Fosfolípidos: Grupo fosfato polar y dos ácidos grasos unidos a un glicerol.	Fosfatidilcolina	Componente común de las membranas en las células
	Esteroides: Cuatro anillos unidos de átomos de carbono con grupos funcionales agregados.	Colesterol	Componente común de las membranas de células eucarióticas; precursor de otros esteroides como la testosterona y las sales biliares
Proteína: Cadenas de aminoácidos; contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre.		Queratina	Proteína helicoidal, principal componente del cabello
		Seda	Proteína en forma de lámina delgada; de la seda producida por la polilla y las arañas
		Hemoglobina	Proteína globular compuesta de cuatro subunidades peptídicas; transporte de oxígeno en la sangre de los vertebrados
Ácido nucleico: Formados de subunidades de nucleótidos; pueden consistir en un solo nucleótido o en una cadena larga de nucleótidos.	Ácidos nucleicos de cadena larga	Ácido desoxirribonucleico (DNA) Ácido ribonucleico (RNA)	Material genético de todas las células vivas Material genético de algunos virus; en las células vivas, es esencial en el intercambio de información genética del DNA a proteínas
	Nucleótidos simples	Trifosfato de adenosina (ATP) Monofosfato de Adenosina cíclico (AMP cíclico)	Principal molécula transportadora de energía a corto plazo en las células Mensajero intracelular

AUDESIRK. Propiedades biológicas de las principales biomoléculas

INTRODUCCIÓN

La bioquímica tiene sus raíces en la medicina tradicional, la alquimia, la nutrición, la herbaria, la homeopatía y en todos los procesos naturales. Actualmente, el estudio bioquímico se enfoca al interior de los sistemas vivos y a sus procesos naturales llamados metabolismo.

Todas aquellas que se consideran biomoléculas están directamente o indirectamente relacionadas con alguna función bioquímica que determina el excelente funcionamiento de un ser vivo. Por ésta razón es importante reconocer que los ácidos nucleicos, las enzimas, las proteínas, los aminoácidos, los lípidos, los glúcidos y aún, aquellas moléculas y elementos que son considerados como bioelementos tales como el agua y los metales; son indispensable en la creación, desarrollo, especialización, evolución y muerte de un ser vivo. En todos los sentidos, desde lo microscópico hasta lo macroscópico la bioquímica está presente.

Joyce apoya la siguiente definición “La vida es un sistema químico capaz de sostenerse a si mismo y que además es susceptible de experimentar la evolución Darwiniana como se menciona a continuación”.

1° Un grupo de individuos debe poder reproducirse haciendo copias de si mismo.

2° Las copias deben tener imperfecciones o mutaciones heredables que introduzcan variaciones en una población.

3° Debe existir un sistema de selección natural que favorezca la supervivencia de algunos individuos sobre otros.

La vida se concibe como un sistema organizado de materia y de energía en el cual la organización se desarrolla gracias a un tercer factor fundamental, el agua. Este orden de vida postula, desde sus orígenes una trascendencia genoacuática, y una renovación permanente de nutrimentos y nutrición que suponen un nacimiento y un desarrollo de la misma materia en movimiento y evolución.

El agua como tal, es entonces, considerada para cualquier ser vivo un elixir de la vida ya que, sin ésta no podría sustentarse la misma.

Los carbohidratos, los lípidos, los aminoácidos, las enzimas, las vitaminas, las proteínas y los ácidos nucleicos cumplen varias funciones clave en la naturaleza. Solo por citar algunas de ellas; se les conoce como funcionales, como estructurales y como reservas energéticas. Además de las propiedades físicoquímicas que manifiestan cada una incluso, llegan a pertenecer al grupo de sustancias naturales conocidas como macromoléculas y que son capaces de sintetizar a la membrana misma.

LOS CARBOHIDRATOS.- (Hidratos de carbono o azúcares) son compuestos orgánicos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno; y en algunos tipos intervienen también el azufre y el nitrógeno. Están constituidos principalmente por unidades monoméricas llamadas monosacáridos que a su vez son constituyentes principales de los disacáridos y de los polisacáridos. Todos ellos tienen la característica común de poseer grupos alcohol, un aldehído y una cetona.

Los carbohidratos son fuente inmediata de energía con una capacidad extraordinaria para absorberse y regular el metabolismo basal, los procesos mentales, los hormonales, de nutrición y de contracción; solo por mencionar algunos.

LOS LÍPIDOS.- Constituyen un grupo heterogéneo de sustancias presentes en los seres vivos, insolubles en agua y extraíbles en solventes orgánicos, como el éter, el cloroformo, la bencina, etc. Estos compuestos pueden clasificarse según su número de carbonos, por su número de insaturaciones, o por su linealidad o su ciclicidad; pero principalmente por sus grupos funcionales, estos son el éster, el alcohol, y el extremo carboxilo o ácido graso.

Se sabe que los lípidos son considerados como una fuente energética de reserva en el organismo, aunque recientemente se ha descubierto que la grasa a la cual se le considera como nociva, en realidad cumple otras funciones.

La cavidad abdominal, en estados de sedentarismo, comúnmente se llena de tejido graso, comenzando por las capas exteriores hasta llegar las capas más profundas. Hoy en día, estudios científicos han demostrado que, a la inversa, la práctica de ciertos ejercicios, posturas y respiraciones canalizará el reflujo metabólico de las grasas, transformando el 50% en agua y el resto en energía, que es llevada desde la cavidad abdominal a las capas más profundas del tejido conjuntivo para formar una especie de "cojín". Ya en el perimicio, se encarga de proteger a los órganos, los músculos y las glándulas vitales. En conclusión, al quemar la grasa y almacenar energía en los órganos, se limita el espacio abdominal, y por lo tanto, se incrementan los gramos de presión por centímetro cuadrado en la superficie del órgano. De ésta manera a través del hábito de las repeticiones, se le condiciona al organismo a convertir dicha grasa en energía de forma permanente, almacenándola en las mismas capas del tejido conjuntivo.

LAS PROTEÍNAS.- Son macromoléculas provenientes de cadenas peptídicas que están compuestas de aminoácidos. Estas biomoléculas están estructuradas por un extremo amino, un extremo carboxilo, un hidrógeno y un grupo radical. Las proteínas se clasifican básicamente por su función o por su estructura. La clasificación más relevante es aquella en donde se les denomina según su estructura. La primaria, la secundaria, la terciaria, la cuaternaria y las conjugadas, aunque en ocasiones, las proteínas se asocian a otras moléculas, formando estructuras más complejas denominadas supramoléculas.

Las proteínas son con diferencia las macromoléculas más abundantes presentes en la célula: En la mayoría de los seres vivos constituyen el 50% ó más del peso seco. Calcular cuántos tipos de proteínas hay actualmente es una tarea imposible. Se conocen unos 700 tipos de proteínas, pero potencialmente se piensa que, en realidad, podemos hablar de unos 50 mil o quizás 100 mil tipos de proteínas diferentes. De estos 700 tipos se han estudiado unos 300 solamente, y los científicos han conseguido cristalizar 150 de estos compuestos. El ensamble de proteínas a partir de los 20 aminoácidos depende de 2 moléculas maestras el ADN y el ARN comunicadas por un lenguaje único, en ese mensaje se encontrarían las instrucciones secretas para fabricar todas las proteínas que le mantienen vivo a usted. Basta con que el ARN se ponga en comunicación con los ribosomas, y empieza la fiesta. Miles de proteínas salen despedidas listas para cualquier cosa; pueden reparar un trozo de ADN que se ha roto, mandar un mensaje a otra célula para que empiece a secretarse una hormona que marque el inicio del desarrollo en la vida de un embrión o en contra parte, la apoptosis de un individuo; o como eficaces

mensajeros de los impulsos nerviosos, tanto en los primitivos cerebros de los gusanos o para transmitir los pensamientos de un físico despistado que está pensando en una nueva teoría sobre las leyes del universo. Cuando se piensa hay que agradecerse a ellas.

LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.-Las 2 principales clases de ácidos nucleicos están definidas por su azúcar constituyente; el ADN contiene D-2'-desoxirribosa y el ARN contiene la D-ribose. La D define la estereoquímica de la ribosa y a menudo se omite por conveniencia. El ADN es mucho más estable que el ARN y está, por consiguiente, bien adaptada a su papel genético, como hebra estable de continuidad hereditaria. La cadena de ADN está compuesta por monómeros denominados nucleótidos o, más específicamente, desoxirribonucleótidos. Cada nucleótido está compuesto de ácido fosfórico, de un azúcar como se menciono anteriormente y de las 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina); mientras que en el ARN solo se operan 2 cambios (desoxirribosa por ribosa y timina por uracilo).

Escribe Francis Crick. El hombre moderno tiene quizás unos 50,000 años, la civilización unos 10,000; pero el ADN y el ARN han existido desde hace miles de millones de años, de forma activa y nosotros somos las primeras criaturas concientes de su existencia. El ADN es una molécula larguísima. Los 46 cromosomas que contiene el núcleo de una célula humana encierran unos 2 metros de ADN. Además de esta sorprendente característica organizativa, el ADN puede autoreplicarse y es una molécula autoreproductiva. Deja pues, descendencia. Somos entonces, los reservorios de una molécula inteligente.

OBJETIVOS GENERALES

Elaborar un manual un manual teórico – práctico que sirva de apoyo para los estudiantes de la FESC en las asignaturas de bioquímica a nivel licenciatura (carrera de Q.F.B.). Además de ser útil para los profesores de preparatoria y secundaria en las asignaturas de química y biología. Todo esto a través de una serie de formatos conocidos como fichas de triple entrada, con la finalidad de proporcionar un material didáctico que facilite el conocimiento en dichos niveles y que va acorde a los planes de estudio actuales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.-Describir una nueva metodología conocida como ficha de triple entrada que facilite el conocimiento en el área bioquímica

2.-Aplicar las fichas de triple entrada a través de un marco teórico y un marco experimental con características bien definidas que facilitaran el conocimiento en el área química, biológica y bioquímica de forma pedagógica.

3.-Integrar la parte teórica y la parte experimental de cada biomolécula con éste sistema de trabajo, para cada uno de los siete capítulos.

ANTECEDENTES

Actualmente se procura encontrar los medios de enseñanza más óptimos y eficientes, dados los tiempos que se disponen para las prácticas. Esta última es una razón de peso para adoptar los sistemas pedagógicos más prácticos que nos lleven a obtener los mejores resultados en la preparación de nuestros futuros profesionistas.

La UNAM se ha adelantado notoriamente en los planes y programas de estudio, debido a las necesidades de nuestro tiempo. Por ende, los retos actuales en los diferentes niveles de estudio, requieren de una parte teórica y una experimental que se complementan entre sí. La existencia de éste manual se justifica, ya que no existe un texto adecuado que ayude al alumno al 100%, dado que los libros a los que puede recurrir son muy antiguos, muy profundos, se tratan temas que nunca se utilizan, la información se encuentra incompleta, la información no es confiable, o simplemente no existe el tema de consulta.

Por estas razones, este manual pretende hacer llegar un herramienta útil para los alumnos de la FESC de acuerdo a los nuevos planes de estudio en las asignaturas de bioquímica dado que cubrirá las necesidades básicas en los laboratorios y en la parte teórica.

Por otra parte su lenguaje sencillo también va dirigido a los niveles de preparatoria y secundaria como un apoyo en las prácticas de química y biología que se solicitan en ese nivel y de acuerdo a los planes de estudio actuales, ya que el nivel pedagógico que se maneja, la selección de prácticas y el lenguaje lo hacen fácil de abordar para dichos niveles.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se procura encontrar medios de aprendizaje más óptimos y eficientes, dados los tiempos que se disponen para la investigación documental y para la realización de prácticas de algún tema específico. Por ésta razón se han buscado nuevas alternativas y elementos para hacer llegar la información teórica y experimental de una manera práctica, breve y concisa; una de estas opciones es la ficha de triple entrada.

La ficha de triple entrada se define como un sistema o método que ordena y divide una página en espacios rectangulares a **2 ó 3** entradas, según sea el caso. En dichos espacios se recoge el contenido principal de un tema consultado en forma de resumen o síntesis, facilitando de ésta manera su acceso, organización y memorización de forma concreta y sencilla.

Sus características son variadas pero, para éste caso se optó por tomar las adecuadas a ésta área.

MARCO TEÓRICO.

Titulo del tema
Introducción
Cita textual
Imagen
Pie de foto
Guía del estudiante
Fuentes

MARCO EXPERIMENTAL

Titulo de la práctica
¿Para qué sirve?
Importancia
Metodología – Técnica
Fundamento
¡Nota importante!
Clasificación
Referencias

Sus bondades son:

Ayuda a ordenar y a formar las ideas para una exposición adecuada con los elementos más importantes y sobresalientes de un tema.

Induce al alumno a recordar y a reconocer el orden de los elementos en una ficha de triple entrada.

Compromete al estudiante que trabaja con fichas de triple entrada a escribir sus propias ideas a través de una breve introducción y de un comentario a manera de síntesis.

Da dinamismo a la ficha a través de una imagen relacionada con el tema de consulta.

Refuerza los conocimientos a través de cuestionarios.

Permite al alumno sacar sus propias interpretaciones y conclusiones.

Induce al alumno a recordar y actualizar la manera en que se redactan los elementos en una ficha bibliográfica, hemerográfica y otros medios electrónicos de consulta.

Motiva al alumno a consultar más a fondo las fuentes originales de libros, artículos, textos y fuentes electrónicas; con el fin de acrecentar más el vocabulario y aprender más sobre el tema.

FORMATO DE TRABAJO

Marco Teórico

El Marco teórico consta de:

Título del tema. El cual se resalta con negrillas y en mayúscula, además se le asigna un número consecutivo; en donde el primer dígito corresponde al capítulo de estudio y el segundo corresponde a los subtemas de esa misma unidad.

La Introducción. Nos marca de manera general origen y concepto histórico de la biomolécula, definición, clasificaciones, y propiedades fisicoquímicas.

Los Comentarios. Nos hablan de la función e importancia que tiene la biomolécula en la naturaleza y en la vida cotidiana. Cabe mencionar que la información que sustenta a la *introducción* y a los *comentarios* no se cita en las fuentes del mismo formato, dado el poco espacio con el que cuenta la ficha, además de ser información que comprende una serie de datos elementales que no se retoman textualmente y que por sustentar las bases bioquímicas, se encuentra en cualquier libro de bioquímica. En cambio, se optó por colocarla al final en una referencia bibliográfica exclusiva dándole la importancia que se merece.

La cita Textual. Como su nombre lo dice, es la extracción viva del párrafo de un artículo científico que varía en diferentes niveles de comprensión y se retoma con la finalidad de motivar el interés por el tema que se está consultando.

La Imagen. Nos refuerza en contenido temático además de darle una vista atractiva al tema.

Pie de foto. Son los comentarios que relacionan al tema que se consulta en ese momento con respecto a la imagen que aparece.

Guía del estudiante. Su función es reforzar el contenido fina de cada capítulo, contemplando al marco teórico y al marco experimental con una serie de preguntas que en algunos casos no tengan relación con el tema consultado en ese momento pero bien pueden estar conectados con otros marcos experimentales de ese capítulo.

Las Fuentes. Son referencias que citan al artículo puesto en la cita textual y a la imagen del marco teórico, las fuentes se citan con un número. En éste marco aparecerán algunas palabras resaltadas en negrillas con la finalidad de que el alumno las busque en alguna fuente indispensable y enriquezca su vocabulario científico.

Marco Experimental

Estas técnicas estarán enfocadas a las áreas de biología, química, bioquímica y otras asignaturas afines a las ciencias de la salud.

Tomando en cuenta la complejidad del tema solo se abordaran los métodos clásicos convencionales así como los métodos instrumentales, sin embargo, se incluirán con ciertas excepciones aquellas que requieran una instrumentación especial asociados a un área restringida de la industria, así como aquellos que requieran de un tratamiento muy específico como lo es en el caso de la investigación. Además, la didáctica que se empleará en éste manual permitirá su fácil acceso, originándolo desde un nivel medio básico (secundaria) hasta un nivel superior (licenciaturas o ingenierías).

El Marco experimental consta de:

Título de la Práctica. El cual se resalta con negrillas y en mayúscula, además se le asigna un número consecutivo; en donde el primer dígito corresponde al capítulo de estudio, el segundo corresponde a los subtemas correlacionados con el marco teórico y la literal en mayúscula nos designa el orden exclusivo de ese capítulo o subcapítulo, solo para las prácticas.

¿Para que sirve?. Nos ilustra de manera diferente el objetivo de la práctica para hacerlo más atractivo en los niveles de secundaria.

Importancia. En éste punto se resalta la importancia de la práctica, las ventajas que presenta y en ocasiones algunas características teóricas o prácticas de la misma que complementan la información.

Método –Técnica. Aquí en éste punto es en donde se desarrolla la técnica o la metodología a seguir de manera breve, según sea el caso. No se da un listado de materiales ni de reactivos ya que se incluyen en la marcha de la práctica. En ocasiones se presenta la preparación de los reactivos o condiciones necesarias para la práctica. Otro aspecto importante es que se da el resultado marcado como R = (+) cuando la reacción es positiva y de la misma manera se marca a la reacción negativa con su respectivo signo R = (-)

Fundamento. Nos refuerza a la práctica con algún texto explicativo o con la reacción de la misma práctica.

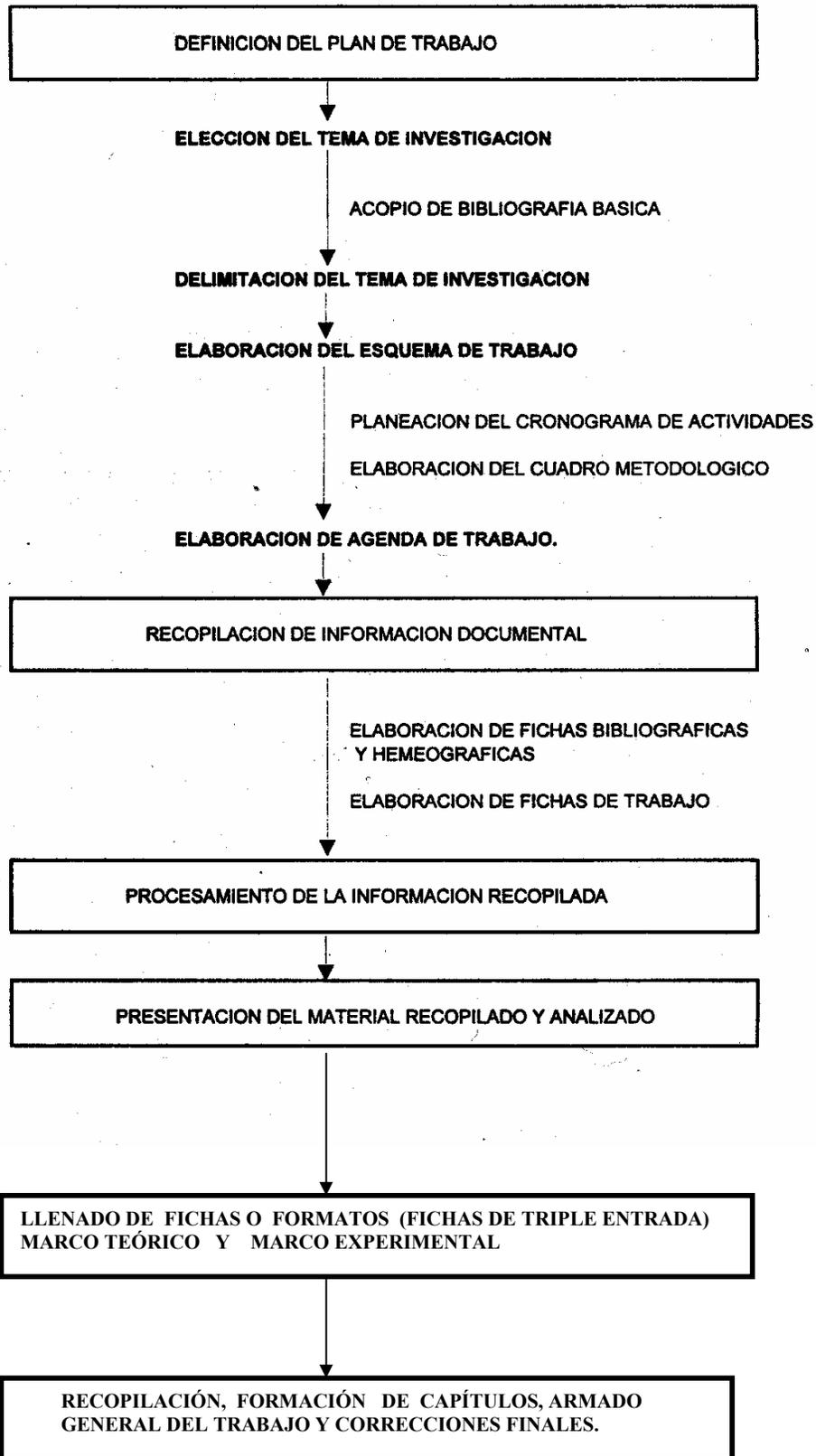
Aplicación. Nos denota el campo profesional al cual se puede aplicar la práctica, así como sus pormenores.

¡Nota importante!. Nos resalta los cuidados personales, de seguridad o de condiciones óptimas para que la práctica se lleve a cabo de la mejor manera.

Clasificación. Nos señala con una viñeta en forma de rombo (◆) para qué nivel o niveles que se sugieren para la práctica, así como la naturaleza de la misma en 3 categorías (Cualitativa, Semicuantitativa o Cuantitativa).

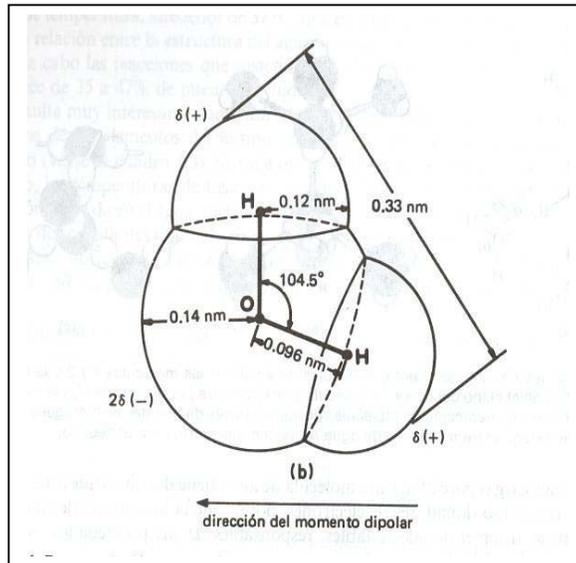
Referencias de la Técnica o Método. Son las fuentes de donde se retomó la técnica o el método descrito.

METODOLOGÍA DE TRABAJO



CAPITULO 1

AGUA



Hidrogene üδωρ

INTRODUCCIÓN



Los investigadores reconocen que la denominación de H_2O , es, en realidad una licencia científica. El agua como tal fue reconocida como uno de los 4 "elementos básicos", según la antigua cultura Griega, quines le designan con el nombre de **hidrogene, ὕδωρ**.

800 veces más densa que el aire, el agua es la única sustancia que al congelarse pierde peso y que además su calor de vaporización a $100^\circ C$ es de 538.7 cal/g , lo que permite que actúe como un regulador térmico en nuestro planeta.

La molécula de agua esta constituida por 2 átomos de H unidos en forma covalente a 1 de O, es altamente polar, no es lineal y crea estructuras tetrahédricas debido a su hibridación s y p. Cabe indicar que los puentes de H no solo se inducen en el agua, pero sí con cualquier sustancia que tenga características polares, como son las proteínas o los carbohidratos, con sus diversos grupos **hidrofilicos**; mediante este mecanismo algunos compuestos de bajo peso molecular retienen agua y le confieren a la materia propiedades **reológicas** muy particulares.

El agua es un solvente biológico ideal, estas moléculas presentan una tendencia ligera a disociarse, lo cual es fisiológicamente importante.

Su propiedad de ionizarse tiene importancia capital para la vida, dado que el agua puede actuar como un ácido o como una base, es posible representar su ionización como una transferencia protónica intermolecular, que forma un ion hidronio (H_3O^+) y un ion hidróxilo (OH^-). Por definición, al $-\log (H_3O^+)$, se le llama pH y al $-\log K_a$, se le llama pKa. Entonces, se puede definir al H_2O como un sistema amortiguador de solvencia libre, capaz de influir en el carácter anfipático de algunos grupos funcionales por ejemplo, COO^- por $COOH$ y NH_3 por NH_4^+ ; como sucede en el caso de los aminoácidos y de las proteínas.

Sus principales funciones biológicas estriban en su capacidad para transportar distintas sustancias, disolver otras, y activar a una gran diversidad de macromoléculas, sin esta acción las enzimas, por ejemplo, perderían su capacidad de reacción. Además los tejidos, órganos y sistemas también perderían su constitución y terminarían por atrofiarse.

1.- AGUA

CITA TEXTUAL



El gran Jacques Cousteau expreso "El agua de mar de mis células reacciona recordándome que soy mar." En la misma línea se expreso el célebre biólogo Claude Bernard: "Cuando la vida salió del mar, se llevó el océano consigo."

Claudine Luu, de la universidad de Montpellier, llevo a la siguiente conclusión: "El agua es el principal constituyente de los sistemas vivos, y no olvida las sustancias que disuelve." Se hacia una vez más, mención de la controvertida hipótesis conocida como memoria del agua. (1)

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Foto que ilustra la importancia que tienen hoy en día como atractivo turístico algunos senotes. Gran senote, península de Yucatán. (2)

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).-¿Cuál es la temperatura del calor de vaporización del agua?
- 2).-¿Qué propiedad fisicoquímica le confieren carácter dual al agua?
- 3).-¿Qué forma tridimensional adquiere el agua?
- 4).-Mencione una técnica de identificación del agua.
- 5).-¿Qué aplicaciones importancia tiene la técnica?

COMENTARIOS



(Informático) Es el único líquido que al congelarse pierde peso. Si la dejamos fluir libremente en un plano inclinado, por liso que sea, seguirá un curso serpenteante, con un diseño en espiral. Algunos científicos han aventurado incluso la hipótesis de que acaso pueda registrar en su estructura toda la memoria de la vida sobre la tierra. Hablamos del agua de cada día, la sangre de nuestra madre "GAIA" (termino muy común en el medioevo).

Nosotros, como todos los mamíferos de la tierra, nos desarrollamos, en el periodo de gestación, sumergidos en un microcosmos acuático, salado y cálido. Y durante el resto de nuestra vida sentiremos una atracción irresistible por el agua, que nos vincula con nuestro origen por partida doble, individualmente y como especie.

Las cianobacterias son una de las formas de vida más resistentes y pueden vivir en hábitat poco atractivos, desde los desiertos más áridos hasta los casquetes polares, aunque ya se perdió toda su anatomía original, se cree que su bioquímica era muy similar dados sus vestigios "genoacuáticos" que vinculan a las anteriores formas de vida con las actuales.

Otra fuente, pero de menor importancia es la que se origina en las reacciones metabólicas y de combustión de los nutrimentos: la oxidación de 1 molécula de glucosa por las vías correspondientes origina 6 moléculas de H_2O , que son iguales a $0.6 \text{ g} / 1 \text{ g}$ de glucosa; además, también se obtienen 1.1 g y 0.4 g de H_2O / 1 g de grasa y de proteína respectivamente en una dieta. Esto es, por cada 2000 kcal de consumo, se generan aproximadamente 300ml de H_2O .

FUENTES.



- 1).- RIOS.C. El misterio del agua, Año Cero, Año X, N°10-0110-09, 2001.
- 2).-De la VEGA Eduardo (foto), Desde las entrañas de la tierra, ¿Cómo ves? Año5 N° 54, Mayo 2004

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la cantidad de agua existente en una muestra biológica mediante la técnica de secado para evidenciar la presencia de la misma.

IMPORTANCIA.



En los líquidos, se dan contactos definidos e interacciones intermoleculares relativamente fuertes, el agua no es la excepción. Este tipo de interacciones monoméricas se mantienen básicamente unidas por 2 tipos de enlaces: los puentes de hidrógeno y los enlaces covalentes corrientes.

Por esta razón, los procesos vitales implican muchas reacciones e interacciones en las interfases bioquímicas existentes entre el agua y los componentes semisólidos, agua / lípido, agua / azúcar / agua / vitaminas y agua / proteínas entre otras más. Debido a esto es conveniente no pasar por alto las interacciones agua soluto para cualquier muestra biológica.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se deben cuidar 2 aspectos importantes, 1° el uso de molinos para triturar la muestra y 2° se debe cuidar estrictamente la preparación de la muestra para que no se pierda humedad.

Se debe procurar que el peso de la cápsula sea constante.

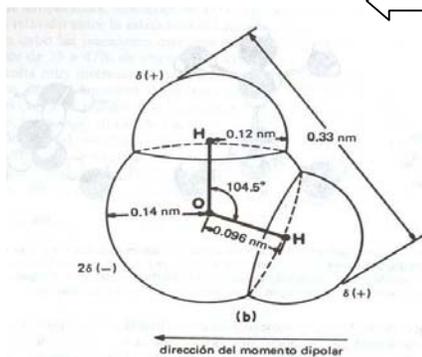
1.A.- PÉRDIDA DE AGUA POR SECADO PARA MUESTRAS BIOLÓGICAS

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Pulverizar, desmenuzar, quebrar, granular, cortar hasta un tamaño menor a 3mm, y pesar 12 g de una muestra de semillas y / o frutos.
- II.- Pasar la muestra y secar a 105 °C durante 5 hrs.
- III.- Dejar enfriar la muestra en un desecador y pesar a intervalos de 1hra, hasta que la diferencia entre 2 pesadas continuas sea cuando más del 0.25 %.
- IV.- Calcular el % de agua y considerar el peso de la muestra tomada.

IMAGEN



Estructura que nos muestra la interacción que se da entre átomos de hidrogeno y oxígeno (2)

APLICACIÓN.



Esta prueba es de suma importancia para la industria alimenticia, sobre todo en el control de calidad, cuando se procura que haya un mínimo de humedad en productos deshidratados. Por ende es muy útil en los niveles superiores.

CLASIFICACIÓN.

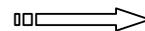
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- DR. SOBERON A. Guillermo, DR. MARTUSCELLI Q. Jaime. et al; Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª/e^d, México, SECRETARIA DE SALUD, 1988.
- 2.- BADUI. S. Química de los alimentos, 3ª/e^d, México, Pearson, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la pureza del agua valiéndonos de la propiedad que tiene esta para cambiar del estado líquido al estado sólido a los cero grados centígrados, cuando esta se encuentra pura.



IMPORTANCIA.

Las sustancias puras tienen un punto de congelación bien definido y el agua no es la excepción, pero las mezclas generalmente congelan sobre un rango de temperatura variable. Si se libera calor cuando se presenta la solidificación, demuestra la presencia de cualquier impureza disuelta presente solamente en el líquido y no en el sólido.

El método que aquí se describe se usa para determinar la temperatura de congelación, en sustancias que funden entre los -20°C y 150°C .

Cuando el enfriamiento es muy prolongado se pueden producir desviaciones en los cambios normales de la $T^{\circ}\text{C}$. Por ende, la prueba se repite introduciendo pequeñas porciones de la muestra sólida a intervalos de 1°C mientras la temperatura se aproxima al punto de congelación estimado.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuando la muestra se ha enfriado aproximadamente 5°C arriba de su punto de congelación, la $T^{\circ}\text{C}$ del baño se debe ajustar entre 7°C – 8°C debajo de dicho punto. Agitar la muestra continuamente con el agitador, entre el fondo y la superficie a intervalos de 20 ciclos por minuto.

1.B.- DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL AGUA POR SU TEMPERATURA DE CONGELACIÓN

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Preparar un sistema como se muestra en el esquema, con un tubo de ensayo de 25 mm de diámetro x 100mm de largo, colocar la muestra provista con un tapón de corcho, un termómetro y un agitador de alambre de 300mm de largo doblado en su parte inferior en forma curva horizontal, rodeando el termómetro.

Todo el sistema se coloca en un baño maría con un volumen mínimo de 3.7cm, que deberá tener un termómetro.

II.- Fundir un trozo de hielo, verterla dentro del tubo de prueba. Ensamble el termómetro con el aparato.

III.- Llenar el baño maría como se indica a un $T^{\circ}\text{C}$ entre de 4°C - 5°C abajo del punto de congelación y esperar, si el agua está en estado líquido, la determinación se hace empleando un baño con una $T = 15^{\circ}\text{C}$ abajo del punto de congelación esperado.

IV.- Tomar las T° cada 30 seg. y anotar, continuar agitando mientras la T° disminuye, por lo menos durante 3' min. después de que la T° empieza a descender nuevamente (después de permanecer constante).

V.- Cuando el promedio de por lo menos 4 lecturas consecutivas, que varían no más de 0.2°C , esto constituye la temperatura de congelación.

*Consultar esquema de montaje

IMAGEN

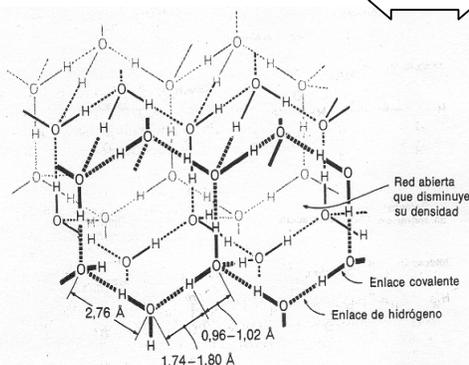


Fig. 5. Estructura del hielo I. Obsérvese su red abierta que se corresponde con su baja densidad.

APLICACIÓN.



Esta prueba es una herramienta eficaz cuando se valora la pureza de agua en los niveles superiores. Solo en algunos casos se usa esta valoración para preparaciones de antibióticos y mezclas intravenosas.

CLASIFICACIÓN.

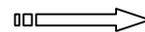
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

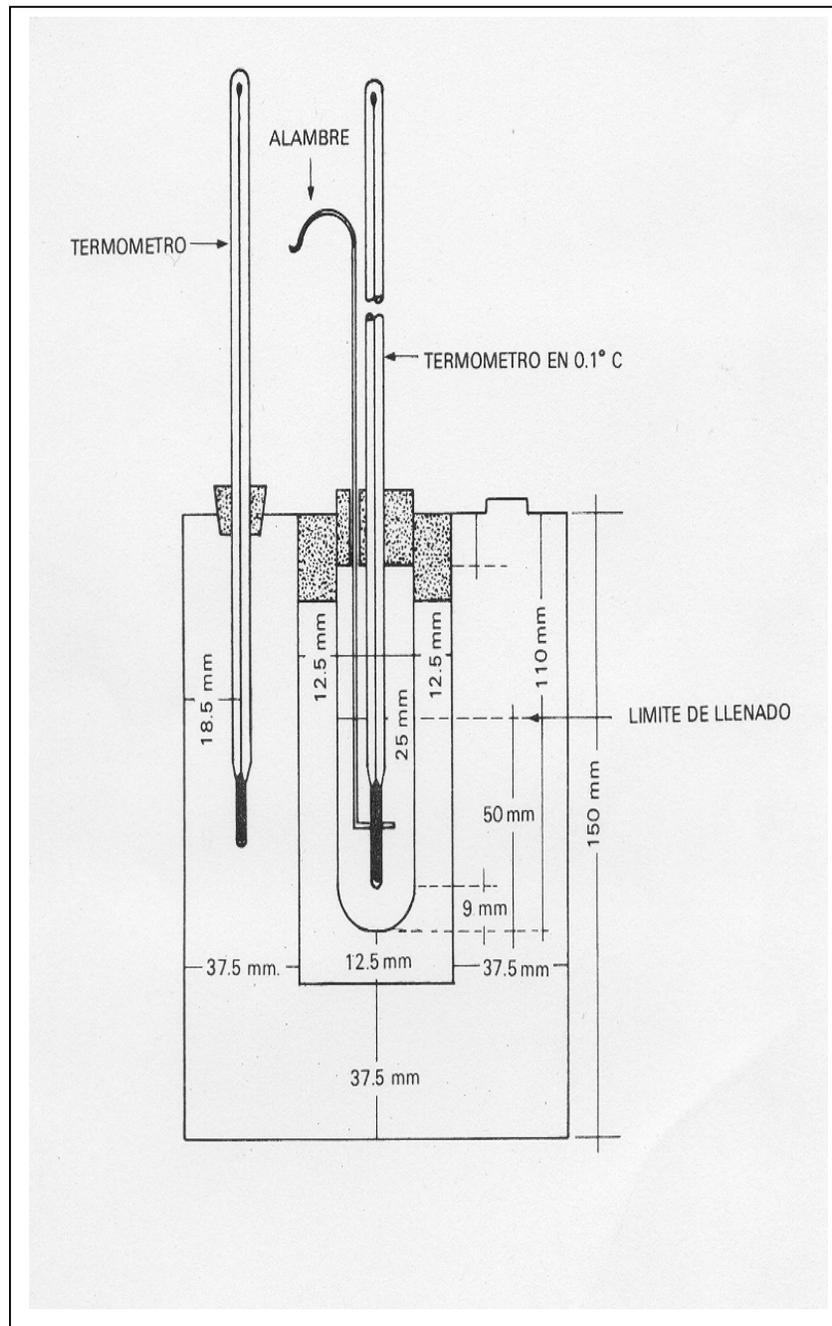
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- DR. SOBERON A. Guillermo, DR. MARTUSCELLI. Q. Jaime. et. al. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª/e^d, México, SECRETARIA DE SALUD, 1988.

ESQUEMA 1 A



DR. SOBERON. Montaje para la determinación de la pureza del agua por su temperatura de congelación

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la cantidad de agua en una muestra de una sal conocida al llevarla a sequedad total o parcial, según sea el caso de la muestra para establecer la presencia de la misma.

IMPORTANCIA.



La pérdida de peso se puede llevar a cabo calentando el compuesto o manteniendo las condiciones estándares de temperatura (15 - 25°C) y presión atmosférica ambiental.

En los sólidos es frecuente encontrar agua de humedad entre 0.5 - 1.0 % para aquellos productos higroscópicos que no se pueden desecar completamente durante su proceso. Aunque cabe aclarar que el agua de hidratación también está presente ya que se encuentra unida por enlaces covalentes presentándose como mono, di, tri, pentahidratos, etcétera, en las sales.

¡NOTA IMPORTANTE!



El método descrito en esta práctica cuantifica cierta cantidad de agua aunque no la total, ya que el agua se presenta como libre o como esencial.

Solo se recomienda utilizar esta técnica para compuestos sólidos

1.C.- CUANTIFICACIÓN DE AGUA POR SECADO CON ESTUFA DE VACÍO PARA SALES ANHIDRAS Y PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Tomar 4 unidades de una muestra de tableta, trocisco o cápsula; se maceran hasta obtener un fino polvo y pesar 100mg en una balanza analítica.
Anotar su peso (con una atmósfera relativa al 10% de humedad).

II.- Pesar un frasco con tapón esmerilado primero, la muestra se lleva al frasco, enseguida pesar el frasco, con su contenido, sin incluir el peso del tapón. Colocar el frasco en una estufa de vacío y colgar el tapón en la parte lateral, sin cerrar durante el periodo de secado.

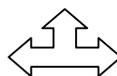
III Procurar que el secado sea a una $T^{\circ} = 60^{\circ} C$ y a una presión igual o menor a 5mm de mercurio, por 3 hrs. Aunque cabe aclarar que si la bibliografía marca condiciones distintas, se deben hacer los cambios pertinentes

IV.- Transcurrido el tiempo necesario, llenar la estufa de vacío con aire seco, pasando a través de un agente deshidratante como ácido sulfúrico o gel de sílice.

V.- Colocar el tapón al frasco y llevar a un desecante como el pentóxido de fósforo o gel de sílice. Se procede a enfriar a T° ambiente y se vuelve a pesar.

VI.- Por último sacar la cantidad de agua por diferencia de pesos y calcular el % de pérdida de agua.

FUNDAMENTO



El agua al igual que otros compuestos, se encuentran suspendidos en el medio ambiente y dadas la naturaleza de los enlaces del agua; es muy factible que algunas sales naturales y sintéticas se “amalgamen” con el agua, presentando de esta manera pesos y volúmenes falsos.

APLICACIÓN.



Esta prueba es de suma importancia para la valoración de algunas sales y antibióticos que deben presentar un mínimo de humedad según se reporte de acuerdo a especificaciones del reactivo y marca, presentes en el frasco comercial. Se considera muy útil en los laboratorios de investigación y en los de nivel superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

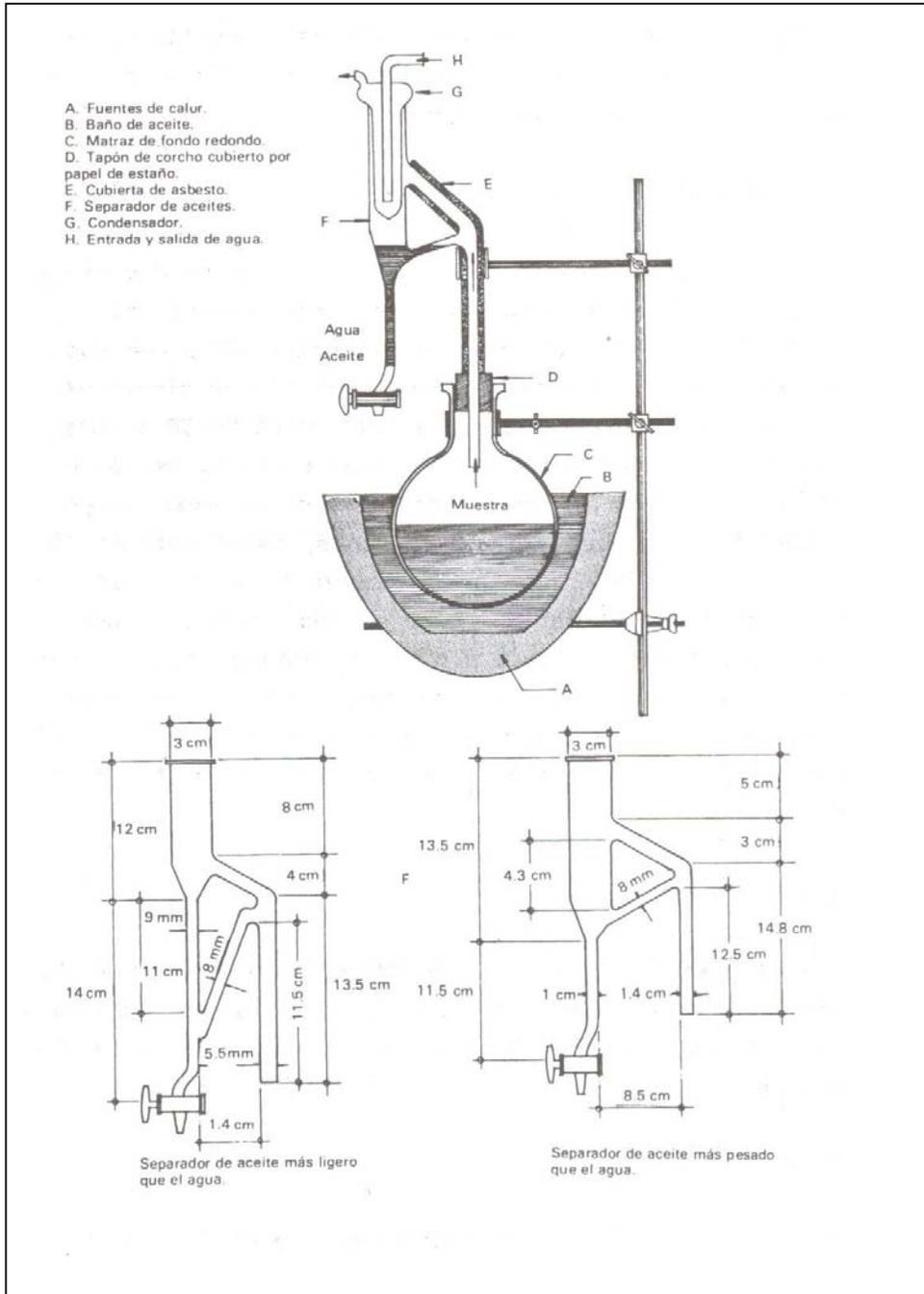
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- DR. SOBERON A. Guillermo, DR. MARTUSCELLI. Q. Jaime. et. al. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª/e^d, México, SECRETARIA DE SALUD, 1988.

ESQUEMA 1 B



DR. SOBERON. Montaje de un Picnómetro para la determinación de mezclas azeotrópicas

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la composición del agua mediante una electrolisis que permita la separación de los gases elementales de 1 agua (oxígeno e hidrógeno).

IMPORTANCIA.



En este experimento es importante que observe las distancias superiores que existen entre uno y otro tubo de ensayo.

Ya que esta medida nos determinará las proporcionalidades que existen en la naturaleza atómica de la materia; obteniéndose 2 volúmenes de hidrógeno por 1 volumen de oxígeno.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se debe cuidar que se lleve a cabo la reacción de manera efectiva y además, las pajillas deberán introducirse inmediatamente después de sacar cada tubo de ensayo.

1.D.- DETERMINACIÓN DE H⁺ Y O⁻ A PARTIR DE H₂O USANDO LA TÉCNICA DEL VOLTÁMETRO DE HOFFMAM (ELECTROLISIS)

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Montar el aparato de Hoffman como se indica a continuación:

Coloque en serie 2 pilas secas de 4.5 Vols. unidos por 2 cables de 30cm con un caimán en ambos extremos (ánodo y cátodo).

Colocar un extremo de un caimán en un trozo de grafito de carbón y en el otro extremo del caimán se debe colocar el paso de corriente de la pila.

Repetir el procedimiento anterior solo que en lugar de usar un trozo de grafito se debe sustituir por una placa de cinc, aluminio o magnesio.

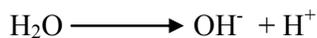
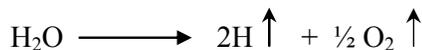
II.- En un baso de precipitados de 250ml coloque una solución de ácido sulfúrico al 12% con una cantidad de 100ml

III.-Coloque con mucho cuidado los extremos de los caimanes que contienen el grafito y la placa metálica, en los interiores de 2 tubos de ensayo, uno en cada tubo; y a su vez colocar estos tubos invertidos en el interior de un vaso de precipitados.

Deje que la reacción se lleve a cabo de 20' a 40' min.

Al término del experimento coloque en el interior de cada tubo una pajilla recién apagada y observe que pasa (realice la operación rápida. Checar esquema.

FUNDAMENTO



Reacción que nos muestra la descomposición del agua por una electrolisis en sus dos gases elementales

APLICACIÓN.



Esta técnica es muy útil y sencilla, por esta razón se puede llevar a cabo en las aulas escolares de los niveles medio básico y medio superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

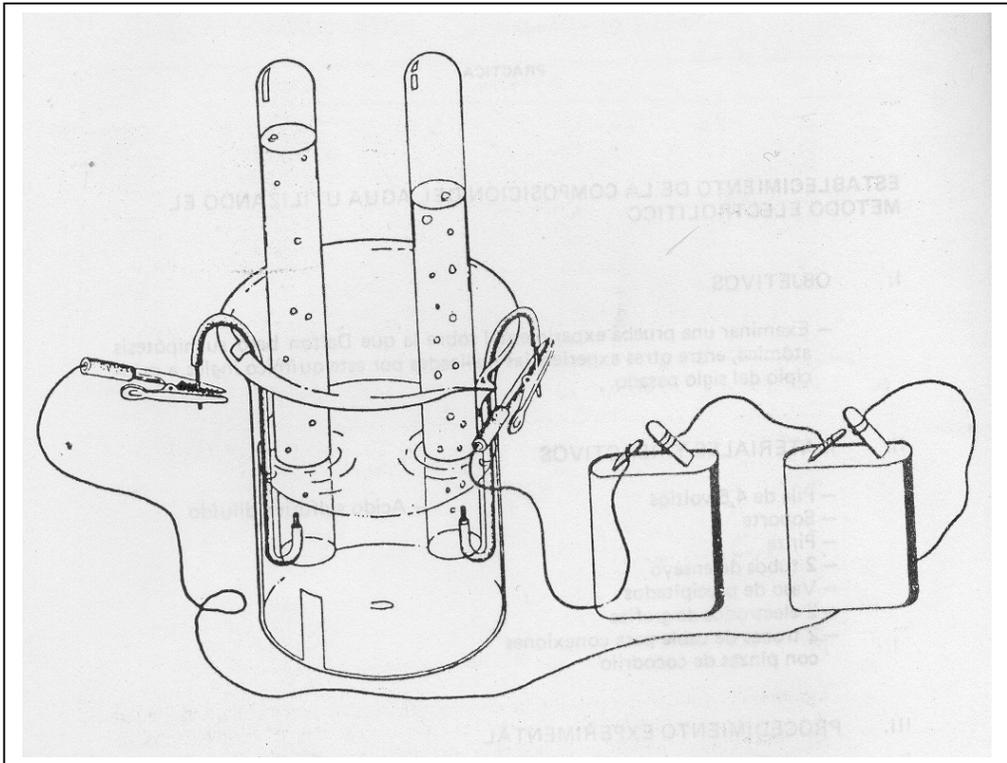
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-ALVAREZ Marcelino, Guía de Prácticas de Química Para Alumnos de E.E.M.M, España, EDUTRADE S. A; 1996.

ESQUEMA 1 C



ANGELES. Esquema que nos muestra el montaje del voltámetro de Hoffman

¿PARA QUÉ SIRVE?



Método utilizado para determinar agua por destilación en mezclas **azeotrópicas**.

El agua arrastrada se mide al terminar la destilación con ayuda de un tubo calibrado.

Aunque la precisión del método sea menor que en los métodos **gravimétricos**, no deja de tener su propio valor, y en ocasiones el error se debe al arrastre de agua con otras sustancias miscibles o a reacciones de degradación de sustancias que contienen azúcar o proteínas.



IMPORTANCIA.

La ventaja de la destilación azeotrópica radica en su duración relativamente corta y en la posibilidad de utilizar muestras mayores. Además de poderse utilizar en muestras biológicas como alimentos y productos secos.

Es importante que la T° ambiental sea menor que la del baño maría para que el líquido de la vasija no se pierda por expansión. La más importante aplicación analítica de las medidas de densidad es la determinación de alcohol de soluciones acuosas, en donde se prepara una curva estándar midiendo el peso específico de un número significativo de soluciones alcohol / agua.

¡NOTA IMPORTANTE!



El peso de la muestra depende de la cantidad de agua esperada, porque el tubo de medida sólo tiene capacidad para 10 ml de agua.

Preferentemente se utiliza toluol ya que tiene un punto de ebullición menor que el xilol.

1.E.- DETERMINACIÓN DE AGUA POR MEZCLAS AZEOTRÓPICAS

MÉTODO- TÉCNICA



I.-Pesar de 10-100g de la muestra con un error permitido de +/- 10mg.

II.-Agregar al matraz:

- A) La muestra y las perlas de vidrio
- B) De 100-300ml de Xilol o Toluol
- C) Agitar la mezcla

III.- Poner a hervir el tiempo necesario:

- A) Hasta que en el tubo de medida no se separe ni una gota de agua
- B) Hasta que la posición del menisco no varíe.

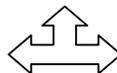
IV.- Secar cuidadosamente la parte exterior del picnómetro con un paño de hilo húmedo, de 15' a 20'min. hasta alcanzar el equilibrio con la atmósfera y pesar.

Repetir el mismo procedimiento para el agua y para el líquido contenido en el picnómetro.

Por último se pesar el picnómetro vacío.

* El agua pesa 1 g / ml a 4° C y a 25°C es igual a 0.99707 g / ml
Checar esquema de montaje

FUNDAMENTO



Como se indico con anterioridad, la muestra se destila añadiendo toluol. El azeótropo formado, por toluol y agua ($K_p = 84^\circ\text{C}$), se separa debido a la reducida densidad del toluol tras la condensación

Datos

$K_p =$ Puntos de ebullición

Mezclas:

K_p toluol/Agua= 84 °C

K_p Xilol/Agua=92 °C

Puros:

K_p Toluol=110 °C

K_p Xilol=144 °C

APLICACIÓN.



Esta destilación se realiza para materiales biológicos, alimentos heterogéneos; voluminosos preferentemente secos o semisecos, por ejemplo verduras secas y col ácida.

Cuando se van a analizar elixires, tinturas, bebidas y extractos; se recomienda realizar una destilación previa para separar el alcohol.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

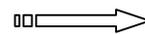
Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.

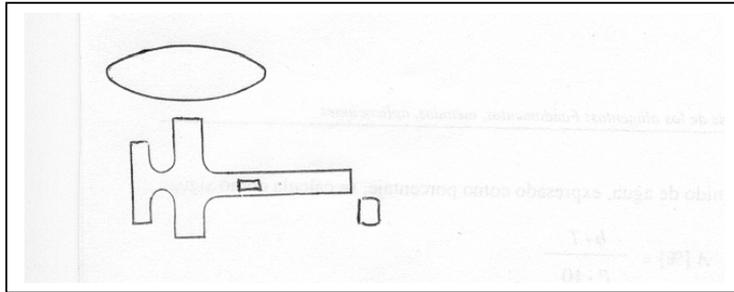
(Para conocer más...)



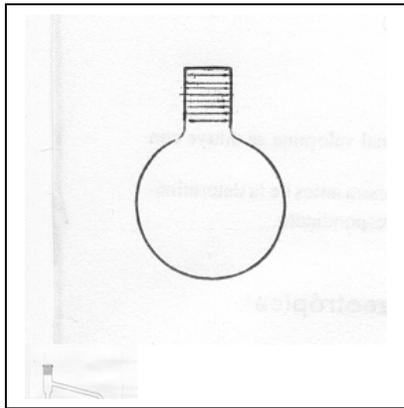
1.-RENHART. M. Análisis de los alimentos 2^a/e^d, España, Acribia, 1992.

2.- CONNORS. Kenneth .A, Curso de análisis farmacéutico (Ensayo del medicamento), 2^a/e^d, España, REVERTE, 1980.

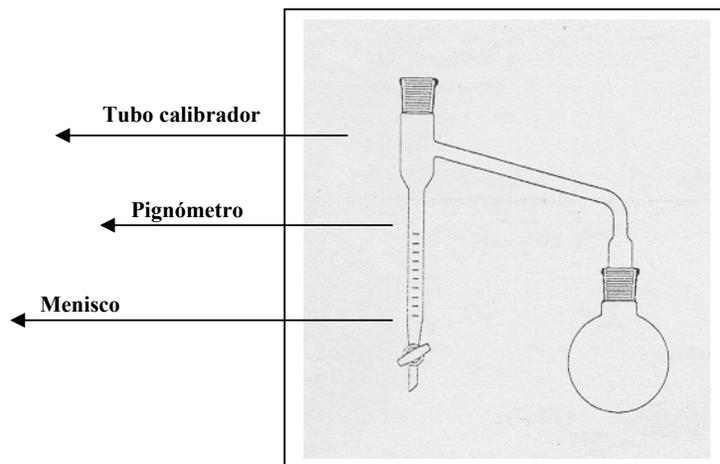
ESQUEMA 1 D



Balanza granataria de un plato



Matraz de balón



Montaje del picnómetro

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la cantidad de agua libre por el método de Karl Fisher, evidenciando su presencia, mediante la reacción que se produce entre el agua con el dióxido de azufre, el yodo, la piridina anhídrica y el metanol.



IMPORTANCIA.

Prepare previamente el reactivo de Karl Fisher como se indica en la Farmacopea de los E.U. M. Un ml de esta solución equivale a 5 ml de agua.

El punto final de la titulación se puede determinar electrométricamente mediante un microamperímetro.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se debe de tomar en cuenta que el reactivo se va descomponiendo gradualmente, por lo cual debe valorarse 1 hr. antes de usarse y además deberá protegerse de la luz en un frasco color ámbar con tapón de vidrio y bajo refrigeración.

Conseguir el reactivo en una casa comercial ya estabilizado.

Valorar el reactivo previamente.

1.F.- VALORACIÓN POR REACTIVO DE KARL FISHER

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Montar un equipo para valorar una solución:

Colocar un soporte universal con 1 pinza de nuez, una pinza para matraz y colocar una bureta graduada de 50 ml con boquilla amplia y una llave de paso, cerciorarse de que la llave de paso este bien cerrada.

II.- Colocar un baso de precipitados de 100 ml bajo la bureta.

III.- Preparar una solución, diluyendo 2 ml de agua bidestilada con metanol a 1000ml de aforo.

IV.- Tomar 25 ml de esta solución y agregar al vaso de precipitados suavemente.

V.- Llenar la bureta con reactivo de K.F. hasta la marca de 50 ml y comenzar a valorar la mezcla Etanol / Agua, hasta obtener el punto de equilibrio indicado por el vire de color.

Calcule el contenido de agua con la siguiente formula:

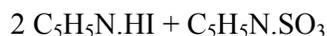
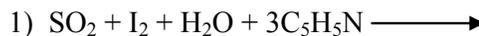
$$C = V \cdot F / 25$$

C = Contenido de agua en g / ml

V = volumen del R. K. F.

F = Es el factor equivalente de agua del reactivo

FUNDAMENTO



Con el yodo libre en la solución se produce un cambio de color, el cual nos indica el punto final de la reacción, Por ende la reacción es indirecta ya que se cuantifica la cantidad de yodo restante y no la de agua.

APLICACIÓN.



Esta prueba es de suma importancia para la valoración de algunas sales y antibióticos que deben presentar un mínimo de humedad según se reporte en la bibliografía. Muy útil en el área farmacéutica.

CLASIFICACIÓN.

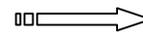
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo

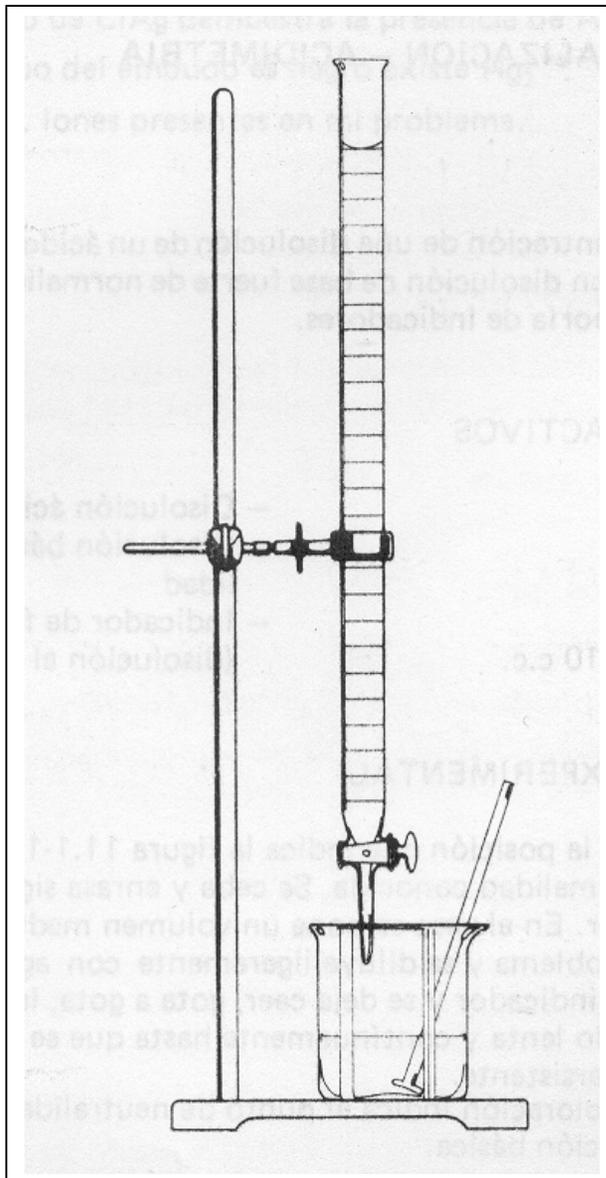
Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- DR. SOBERON A. Guillermo, DR. MARTUSCELLI. Q. Jaime. et. al. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª/e^d, México, SECRETARIA DE SALUD, 1988.

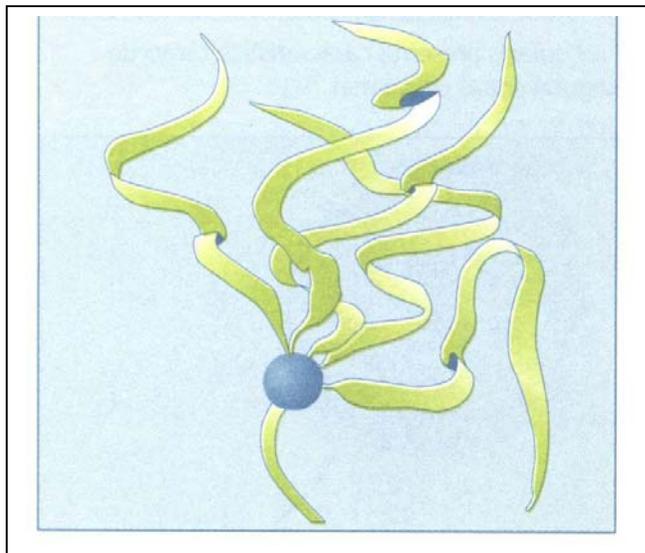
ESQUEMA 1 E



ANGELES. Esquema que nos muestra el montaje para una valoración de Karl Fisher

CAPÍTULO 2

CARBOHIDRATOS



Gluxú γλυχύ

INTRODUCCIÓN



El nombre glúcidos, del Griego **gluxú** γλυκύ dulce, tomando como referencia al carácter dulce de la mayoría de los glúcidos simples y el término azúcar, es una generalización del cabohidrato más clásico del grupo, es decir, el azúcar de caña, o sacarosa.

El término carbohidratos o hidratos de carbono se acuñó en un principio para designar a una familia de compuestos que contienen C, H y O, estos últimos en la proporción del agua, cuya antigua fórmula se abrevia como $C_n(H_2O)_n$ lo que les dio su antiguo nombre, sin embargo, tiempo después se descubrieron otras sustancias presentes como el N, P y S. **Actualmente se definen como biomoléculas derivadas de compuestos orgánicos con grupos aldehídicos (R-HC=O), cetónicos, (R-RC=O) y de alcoholes polihídricos (R-C-OH).**

Se clasifican en 3 grandes grupos, los más simples se denominan **monosacáridos**; de 3,4 ,5 y 6 átomos de carbono que corresponden a las triosas, tetrosas, pentosas y hexosas. Los disacáridos son moléculas formadas por 2 **monómeros** de azúcar y los **polisacáridos** están constituidos por 3 ó más monómeros de azúcar. En ocasiones se les denomina **oligosacáridos** a los compuestos que contienen hasta 10 monómeros de azúcar. En general, los hay del orden lineal y cíclicos, y además algunos presentan **estereoisomería** (α y β , y D y L).

Los azúcares se conducen como ácidos muy débiles, y por esta razón los efectos producidos por las bases que aceleran la enolización de los azúcares, son semejantes a los que se observan con aldehídos. En ausencia de bases, es probable que exista un equilibrio entre las formas enol y ceto; pero lo habitual es que el equilibrio esté a favor del grupo ceto.

Generalmente estos compuestos son insolubles en etanol y éter; solubles en agua y tienen un sabor dulce aunque existen algunos que son amargos; comparativamente. La mayoría se ha podido cristalizar. Se encuentra en diferentes frutas hortalizas, hongos, insectos y hasta bacterias.

2.- CARBOHIDRATOS

CITA TEXTUAL

El Desayuno.

Para obtener la máxima energía durante el juego, Michael Jordan desayunó espagueti, alimento que contiene almidón, el cual es un polisacárido, muy similar al glucógeno, que se descompone fácilmente en pequeñas moléculas de glucosa. Estas moléculas son de un alto contenido energético y reaccionan para convertirse en CO_2 y H_2O . Contrariamente a lo que se cree, la energía se libera, no mientras se rompen los enlaces de glucosa sino cuando se forman los enlaces de CO_2 y H_2O . (1)



IMAGEN:



PIE DE FOTO.



El esquema nos muestra una serie de alimentos ricos en su contenido de glúcidos, como fuente energética primaria de los seres vivos.(2)

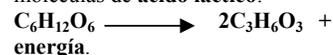
GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuáles son los 3 grupos funcionales de los carbohidratos?
- 2).- ¿Cómo se clasifican los carbohidratos?
- 3).- ¿Cuáles son los 2 azúcares que se consideran de reserva energética en los seres vivos?
- 4).- En la prueba de Benedict, ¿Qué es más importante? La presencia de color o el precipitado?
- 5).- ¿Qué otros reactivos solo determinan la presencia de azúcares?

COMENTARIOS



Cuando el oxígeno que respiramos no alcanza para generar la cantidad de energía suficiente (mientras realizamos grandes esfuerzos físicos), las células musculares se ven obligadas a usar una reacción completamente diferente que consiste en romper a la mitad de cada molécula de glucosa en dos moléculas de **ácido láctico**:



Este proceso, conocido como respiración **anaeróbica**, proporciona menos energía por cada molécula de glucosa comparado con el de la respiración **aeróbica** donde participa el oxígeno, cada glucosa genera 4 Kcal / g. El ácido láctico que queda como residuo de la respiración anaeróbica produce dolor al cabo de unas horas, la famosa "robotitis" que todos hemos sentido después de realizar algún "sobreesfuerzo" al que no estamos acostumbrados y además con una inadecuada forma de respirar.

Algunos de los carbohidratos constituyen sustancias de reserva energética en los seres vivos (Glucógeno y Almidón), otros son sustancias estructurales. Por ejemplo, la quitina es un polisacárido estructural modificado (un grupo con N reemplaza un grupo -OH) que constituye el exoesqueleto de los **artrópodos**. La corteza de los árboles esta formada por celulosa: un **polisacárido** constituido por unidades repetidas de glucosa. Tanto la quitina como la celulosa son azúcares insolubles en e agua.

FUENTES.



- 1).-SOSA Plinio, Michael Jordan un tipo con mucha química, ¿Cómo ves?, Año2, N°4, Noviembre 2000.
- 2).-DONALD. Voet Fundamentals Biochemistry, 2ª/e^d E.E. U.U., Jhon Wiley and Sons, 1995.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de azúcares a través de sus grupos reductores (grupos aldehído y cetona).

La capacidad de un azúcar para reducir los reactivos alcalinos depende la disponibilidad de un grupo aldehído o cetona, expuestos. Por tanto, estos azúcares se vuelven agentes poderosos, capaces de reducir Cu^{++} a Cu^+ y Ag^+ a Ag^0 .

IMPORTANCIA.



Esta prueba se puede aplicar además a otros compuestos como acetona, acetaldehído, butaraldehído y formaldehído, obteniéndose buenos resultados en corto tiempo.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se recomienda realizar una prueba de efectividad al reactivo, previa a la práctica. Ya que después de un tiempo, el sulfato de cobre, se precipita como dióxido de cobre. Además deberá cubrirse de la luz, por ser de naturaleza foto sensible.

2.A.- REACCIÓN DE FEHLING - DETERMINACIÓN GENERAL PARA AZÚCARES REDUCTORES

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Agregar los siguientes azúcares en solución.

Glucosa Sacarosa Almidón Almidón Hidrolizado Suero de leche*

II.- A cada tubo agregar lo siguiente.

- A) 0.5 ml del azúcar
- B) 0.5 ml de solución A de Fehling.
- C) 0.5 ml de solución B de Fehling
- D) 4 ml de agua

III.- Colocar todos los tubos de ensayo en baño María durante 10' min. y observar los cambios.

*Preparación del suero de leche.

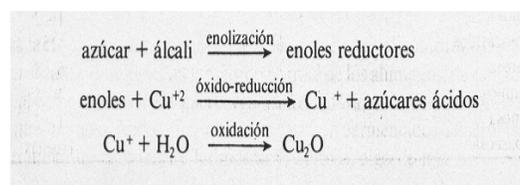
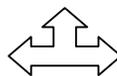
Disolver 2ml de leche en 10 ml de agua y adicionar de 3 a 6 gotas de jugo de limón y esperar a que desnaturalice la proteína. Tomar 0.5 ml del suero.

Solución de Fehling A = Agregar 34.64g de sulfato de cobre pentahidratado aforado en 500 ml de agua destilada.

Solución de Fehling B= Agregar 60g de hidróxido de sodio + 173g de Tartrato de sodio- potasio (sal de Rochelle) en agua y aforar hasta 500ml.

REACCIÓN (+) = Verde para lactosa o precipitado rojo ladrillo para la glucosa, con sobrenadante azul.

FUNDAMENTO



El cobre se une al ácido tartárico para evitar la formación inmediata de hidróxido de cobre.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas.

Además sirve para identificar la presencia de lactosa en la industria alimenticia, aunque no es la prueba principal.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.

2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM México, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de azúcares a través de sus grupos reductores (grupos aldehído y cetona) para evidenciar su existencia



IMPORTANCIA.

La capacidad de un azúcar para reducir los reactivos alcalinos depende de la disponibilidad de un grupo aldehído o cetona, expuestos. Por tanto, estos azúcares se vuelven agentes poderosos, capaces de reducir Cu^{++} a Cu^+ y Ag^+ a Ag^0 .

Los azúcares reductores pueden reaccionar con distintos agentes oxidantes. Se han empleado reacciones como la de Fehling, Benedict y Osazonas para distinguir a los monosacáridos de los disacáridos en función de sus diferentes tiempos de reacción.

De los distintos reactivos empleados para determinar azúcares (de manera general), el que es más confiable, es el reactivo de Benedict y además es el más empleado en la actualidad.

¡NOTA IMPORTANTE!



Hay que tomar en cuenta fundamentalmente la cantidad del precipitado, antes que su color.

El reactivo debe prepararse previamente (parecido a Fehling A y B) o bien puede comprarse.

2.B.- PRUEBA DE BENEDICT - AZÚCARES REDUCTORES

MÉTODO- TÉCNICA



I.- En 13 tubos se agregará
5ml de reactivo de BENEDICT +
1ml de los siguientes azúcares 0.1 M:

glucosa	maltosa	lactosa
arabinosa	sacarosa	fenol
acetaldehído	hidroquinona	
almidón	manosa	xilosa
inulina	dextrina	

II.- Dejar en agua hirviendo en un lapso de 5'-50' min. hasta que haya una buena aparición de color.

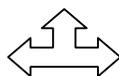
UN RESULTADO (+) = Aparición de color Rojo, Verde o Amarillo.

Moléculas Grandes – reducción lenta = Rojo ladrillo.

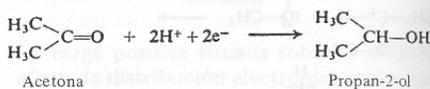
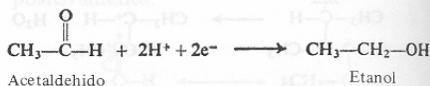
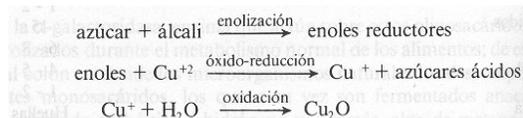
Moléculas pequeñas-reducción rápida = Verde.

*Si la reacción ocurre, aparece un precipitado de óxido de cobre rojo ladrillo

FUNDAMENTO



Reacción clásica de óxido reducción



APLICACIÓN.



En la industria alimenticia se utiliza para determinar la presencia de un carbohidrato así como las cantidades presentes en un equilibrio.

En los laboratorios escolares se usa con mucha frecuencia dado su sencillo manejo y su facilidad para adquirir el reactivo.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1974.

2.-ASHBY.J.F. Principios de química biológica, España, ACRIBIA, 1998.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de azúcares a través de sus grupos reductores (grupos aldehído y cetona)

La capacidad de un azúcar para reducir los reactivos alcalinos depende de la disponibilidad de un grupo aldehído o cetona, expuestos. Por tanto, estos azúcares se vuelven agentes poderosos, capaces de reducir Cu^{++} a Cu^+ y Ag^+ a Ag^0 .



IMPORTANCIA.

Esta prueba es muy sensible, basta una muestra de 0.001% para que la reacción sea (+)

Con esta prueba se desdobra a los disacáridos y a los polisacáridos hasta monosacáridos.

Se considera que es una reacción de deshidratación en medio ácido que da como producto una molécula de furfural, que en presencia de naftol en medio ácido forma un complejo con color intenso característico en la interfase.

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida.

¡NOTA IMPORTANTE!



Al agregar el ácido concentrado, no agite los tubos de ensayo y cuide de que este resbale por las paredes.

2.C.- REACCIÓN DE MOLISH-UDRANSKY PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE AZÚCARES

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Agregar a los tubos 1 ml de la solución de azúcar a identificar.

II. - Agregar 2 gotas de reactivo de Molish y mezclar bien.

III.- Agregar 1ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo y esperar hasta obtener resultados.

Preparación del reactivo de Molish:

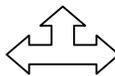
Disolver 0.1 g de α naftol en 10ml de etanol.

REACCIÓN (+) α naftol = Anillo rojo-violáceo o morado en la interfase de las soluciones del tubo de ensayo.

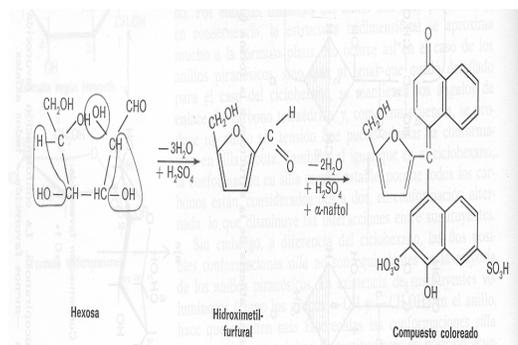
REACCIÓN (+) α naftol = Rojo oscuro con las "osas"

REACCIÓN (+) c/ resorcina =Rojo p/ cetosas

FUNDAMENTO



Complejo de furfural con color intenso



APLICACIÓN.



Su práctica en los laboratorios escolares es muy recomendable.

Se aplica en la determinación de azúcares en bebida y zumos de frutas.

En algunos laboratorios escolares su aplicación es muy útil y sencilla, mientras que en los laboratorios de diagnóstico se utiliza para determinaciones de azúcares reductores.

CLASIFICACIÓN.

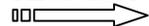
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM, México1993.
- 3.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cualitativa la presencia de azúcares (hexosas) en muestras biológicas.

Determinar que tipo de azúcares dan positiva a la reacción, en muestras puras

IMPORTANCIA.



Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida. Recomendable para el nivel superior y medio superior.

2.D.- REACCIÓN DE TOLLENS

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Agregar 1ml del reactivo de Tollens a los tubos de ensayo.

II.- Añadir 2ml del (os) azúcares deseados a cada tubo de ensayo.

III.- Calentar a baño maría de 10' - 15' min. y esperar resultados

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TOLLENS.

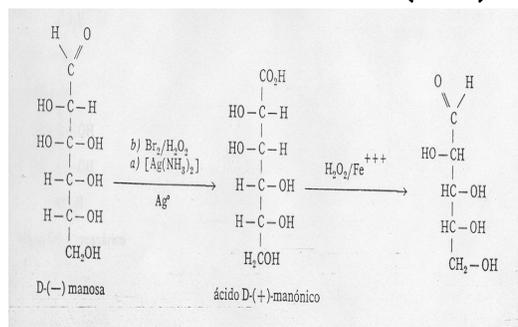
Disolver: 3g de nitrato de plata en 30 ml de agua destilada.

Añadir 1.5g de hidróxido de sodio disuelto en 30 ml de agua,

En seguida se agregar, gota a gota, Hidróxido de amonio diluido (1:1) hasta que se disolver el precipitado formado.

REACCIÓN (+) = Formación del espejo de plata sobre la superficie del tubo.

FUNDAMENTO



Reacción dada por la glucosa y el nitrato de plata amoniacal.

APLICACIÓN.



Se puede aplicar directamente a muestras purificadas o a productos biológicos bien tratados.

En los laboratorios escolares se usa con mucha frecuencia dado su sencillo manejo y su facilidad para adquirir el reactivo.

¡NOTA IMPORTANTE!



El nitrato de plata no se debe tocar con las manos al preparar el reactivo de Tollens.

El reactivo de deberá prepararse previamente y utilizarse en su totalidad ya que al cabo de 10 hrs. produce compuestos explosivos.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5^a/e^d, México, limusa, 1984.

2.-DOMINGUEZ. Xorge. Fundamentos de y problemas de Química Orgánica, 3^a/e^d, México, limusa, 1978.

INTRODUCCIÓN



Los glúcidos u holósidos sencillos formados únicamente por una molécula de azúcar, se llaman monosacáridos. Sus nombres terminados en “osas”, nos indican su origen.

Los azúcares se clasifican a partir de 3 consideraciones.

- 1) Por la identificación de un grupo funcional en la molécula.
- 2) Por su número de átomos de carbono en la molécula.
- 3) Por el número de unidades moleculares (no en el caso de los monosacáridos).

Los monosacáridos se agrupan en función de un número de átomos de carbono en dichas moléculas, por lo cual a un azúcar de 3 carbonos se le llama triosa, a una de 5, pentosa, y a una de 6, se le llama hexosa, etcétera.

Aquellos que tienen grupos aldehído se llaman aldosas o aldotriosas y los que tienen grupos cetónicos son cetosas o cetotriosas.

Otra gran clasificación se da de acuerdo a sus propiedades químicas, como **monosacáridos simples** y se caracterizan por su número total de átomos de carbono como se mencionó anteriormente, mientras que los **monosacáridos derivados** se caracterizan por una modificación química de los anteriores, dada por una reducción, una oxidación o una sustitución.

Las aldosas y cetosas que contienen el mismo número de átomos de carbono son **isómeros**; esto es, poseen la misma fórmula empírica, pero con diferente conformación en el espacio, dado que sus átomos de carbono son **quirálicos**, por ejemplo la hexosa y la hexulosa, que tienen la misma fórmula $C_6H_{12}O_6$.

En cuanto a la serie D y L, esta dada en función de la posición – derecha o izquierda-del grupo funcional –OH en su cadena del carbono primero, aunque cabe aclarar que existen desviación (+) y (-) de la luz para c/ serie; mientras que las formas α y β , están en función de la posición del grupo-OH en una conformación de Fisher cíclica (furano o pirano).

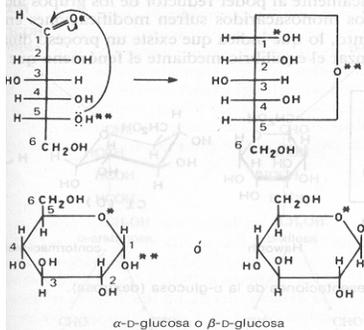
2.1.- MONOSACÁRIDOS

CITA TEXTUAL



La quiralidad es de gran importancia para la vida. Por ejemplo, el ácido (+) ascórbico es la vitamina C, mientras que una molécula de igual composición química, pero con una geometría diferente (su imagen al espejo o quiral), el ácido (-) ascórbico, no tiene actividad biológica, es decir, no puede ser asimilado, ¡no es una vitamina! La (-) cloromicetina es un potente antibiótico, pero su molécula dextrorrotatoria (+) no lo es. La (-) adrenalina es una hormona muchas veces más activa que su quiral, la (+) adrenalina. (2)

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Representación esquemática de los tipos de enlaces químicos en 2 moléculas lineales y cíclicas de la glucosa, así como su conformación α y β en las piranosas. (1)

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuáles son las 3 consideraciones para clasificar un azúcar?
- 2).- ¿Qué es un isómero?
- 3).- ¿Por qué se dice que la prueba de O.Toluídina se puede cuantificar?
- 4).- ¿Qué azúcar determina la O.T?
- 5).- ¿Qué espectro de absorción tiene la reacción y que color da?

COMENTARIOS



Los monosacáridos simples son sólidos, blancos, cristalinos, hidrosolubles y en general tienen sabor dulce. Antiguamente a la glucosa se le llamaba dextrosa y azúcar de uva. A la fructosa, un monosacárido, se le llama a veces levulosa o azúcar de fruta. Hoy, se sabe que la galactosa no se encuentra libre sino combinada con la glucosa en la lactosa (azúcar de la leche).

También hay galactosa en los tejidos nerviosos, donde se combina con un lípido para formar los cerebrosidos.

Por vías reductivas se originan los desoxiazúcares que carecen de un hidroxilo en uno de sus carbonos, así la ribosa da origen a la desoxirribosa del DNA.

Así, por la vía oxidativa se forma el ácido glucurónico que facilita la eliminación renal de algunas sustancias poco solubles en agua, como las bilirrubinas y los esteroides.

Por ejemplo, los aditales se forman por reducción del grupo aldehído a alcohol: así las triosas originan el glicerol, importante en los mecanismos de defensa inespecíficos de la piel y también presentes en los lípidos corporales.

La glucosa se considera como la unidad básica de los oligosacáridos y los polisacáridos además, se encuentra en la sangre y puede administrarse por vía intravenosa cuando no es posible deglutir alimentos.

FUENTES.



- 1.-BADUI Salvador. Química de los alimentos 3^{ra}ed., Pearson Educación, México, UNAM, 1993.
- 2.-TRUJILLO A. Mauricio y Valdez A. Norma. Pasteur y las moléculas en el espejo, ¿Cómo Ves?, Año 4, N° 44, Julio 2002.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de azúcares con naturaleza reductora ya que los mismos tienen la capacidad de fermentar en presencia de levaduras.

Las hidracinas en condiciones adecuadas de reacción pasan a hidrazonas:

glucosa- glucosazona,
galactosa-galactosazona,
lactosa- lactosazona,
maltosa-maltosazona

Los azúcares pueden ser identificados por el tiempo que tardan en formar sus osazonas correspondientes, por la forma cristalina y por la estabilidad en temperatura fría o caliente.



IMPORTANCIA.

Es de suma importancia ya que se pueden cuantificar productos de reacción peso /peso y además se puede ver el grado de pureza a través del Pf.

Usando las mismas proporciones de reactivos, se puede repetir esta prueba para cualquier azúcar reductora.

Su realización es rápida y sencilla además se requiere poco reactivo.

¡NOTA IMPORTANTE!



En todos los casos es importante anotar el tiempo de formación de las osazonas, así como dibujar la forma que adquieren los cristales

Los disacáridos no dan reacción, solo los monosacáridos reductores.

2.1.A.- REACCIÓN DE OZONAS PARA MONOSACÁRIDOS REDUCTORES

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Preparar un tubo de ensayo y colocar
100mg de glucosa + 200 mg de clorhidrato de fenilhidracina +
300mg de acetato de sodio cristalizado + 4ml de agua.
Tapar el tubo con algodón (superficialmente).

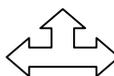
II.- Calentar a baño maría durante 20' min.
Dejar enfriar y reposar la solución.

III.- Tomar unas gotas de la muestra, colocarlas en un portaobjetos y observar la forma de los cristales usando un microscopio.

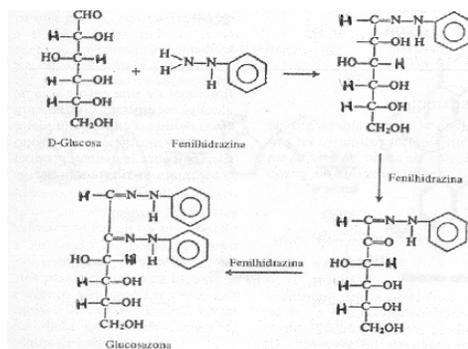
IV.- Filtrar el precipitado y disolverlo en alcohol caliente.
Recristalizar, secar y determinar su punto de fusión.

REACCIÓN (+) = Amarillo Claro.

FUNDAMENTO



Reacción de osazonas para monosacáridos



APLICACIÓN.



En algunos laboratorios escolares su aplicación es muy útil y sencilla, mientras que en los laboratorios de diagnóstico clínico médico y veterinario aún se utiliza para determinar azúcares reductores en muestras biológicas.

CLASIFICACIÓN.

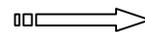
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-RENDINA. G. Técnicas de Bioquímica Aplicada, España, Interamericana, 1997.

2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM, México, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la concentración de glucosa a partir del sobrenadante de una muestra biológica libre de proteínas

IMPORTANCIA.



Esta técnica es de suma relevancia, ya que se pueden cuantificar productos de reacción en una muestra de sangre humana o animal.

Otra de sus importancias radica en el poco tiempo que requiere la práctica para su realización, así como una mínima cantidad de reactivo que se necesita. En comparación con otras prácticas, su desarrollo es muy sencillo.

Es un método colorimétrico y la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración.

En la actualidad es poco utilizada ya que el reactivo es corrosivo y cancerígeno, además esta sujeta a muchas interferencias.

¡NOTA IMPORTANTE!



El contenido de los tubos se vierte en celdas adecuadas y se debe de checar que el espectro este bien calibrado.

La muestra deberá estar libre de proteínas.

2.1.B.- PRUEBA DE DUBOWSKY PARA GLUCOSA. ORTO-TOLUIDINA EN MEDIO ÁCIDO

MÉTODO- TÉCNICA



I. - Preparar un tubo de ensayo al que se le colocan 1.9 ml. de ácido tricloroacético al 3% + 0.1 ml. de sangre completa. Mezclar y dejar reposar durante 5' min.

II.-Preparar otros 3 tubos de ensayo enumerados y etiquetados con su tipo de preparación:

A) 2-Bco.= Blanco 1ml. de agua destilada + 5 ml de toluidina.

B) 3-Pb. = Problema 1ml. de sobrenadante de la muestra + 5ml. de toluidina

C) 4-Pt.= Patrón 1ml. de solución patrón + 5ml. de toluidina

IV.- Tapar los tubos con papel aluminio, mezclar y calentar con agua hirviendo durante 10' min.

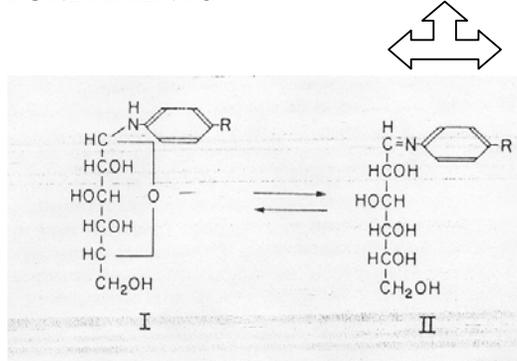
V.- Enfriar al chorro del agua corriente sin destaparlos.

VI.- Calibrar el espectrofotómetro con el tubo blanco.

Leer los 2 tubos restantes (Pb. Y Pt.) a 630 nm. de absorción

REACCIÓN (+) = Verde- Azul.

FUNDAMENTO



Se obtiene un color verde, probablemente debido a la formación de un compuesto aminado de glucosa, como se muestra en el esquema.

APLICACIÓN.



En algunos laboratorios escolares su aplicación es muy útil y sencilla, mientras que en los laboratorios de diagnóstico clínico médico y veterinario aún se utiliza.

Midiendo la absorbancia de la solución se hace una relación para determinar la concentración de glucosa en una muestra de sangre, que se usa para diagnóstico clínico

Glucosa mg/100ml = Abs.
Pb/ Abs.Pt 200

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-VEGA. C .Linda, Manual del laboratorio de bioquímica para M.V.Z; México, UNAM-FESC; ISBN, 1993.

2.-HENRY. Richard. J. Química Clínica, 2ª/e^d, España, JIMS, 1980.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar carbohidratos del orden de los monosacáridos

Determinar de manera cualitativa la presencia de azúcares en muestras biológicas.

IMPORTANCIA.



Su importancia radica en que diferencia entre pentosas, hexosas y heptosas

Además es una prueba determinante y específica para DNA

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida. Recomendable para el nivel superior y medio superior.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cerciorarse previamente de que tanto reactivos como materiales no estén contaminados (estén bien limpios y secos).

2.1.C.- PRUEBA DE BIAL – IDENTIFICACIÓN DE MONOSACÁRIDOS

MÉTODO- TÉCNICA



I.- A cada tubo añadir 1ml de los siguientes azúcares:
Ribosa Desoxirribosa Glucosa Fructuosa

II.- Enseguida añadir 8 gotas del reactivo de Bial + 1.5 ml de Acido Clorhídrico concentrado.

III.- Calentar los tubos a baño María durante 10' min y espere resultados.

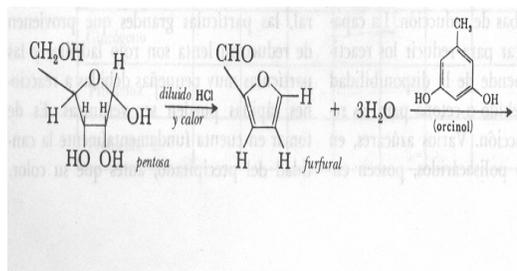
Resultados:

Pentosas (+) = Verdoso o Azul Violáceo

Hexosas (+) = Naranja- Amarillo – Café

Heptosas (+) = Púrpura

FUNDAMENTO



Orcinol + Fe Cl₃ en medio ácido. El producto de esta reacción es una superposición de las nubes electrónicas entre el furfural y el difenol, esto es, una reacción de condensación de nubes electrónicas entre grupos cíclicos.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas

Se recomienda para la práctica usar jugos de fruta como piña y naranja.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5^a/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM México,1993.
- 3.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cuantitativa la presencia de un azúcar nucleico en muestras biológicas.

Determinar la presencia de desoxirribosa, carbohidrato del orden de los monosacáridos presentes en el ADN y ARN, valiéndose de un método llamado curva patrón y una técnica colorimétrica.

IMPORTANCIA.



Su importancia radica en que diferencia entre desoxirribosa y ribosa mediante un vire de color característico.

Además es una prueba determinante y específica para ADN y ARN, que suele ser cuantitativa.

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida.

Recomendable para el nivel superior e investigación.

¡NOTA IMPORTANTE!



Calibre adecuadamente el espectrofotómetro y prepare muy bien los tubos a leer problema, patrón y blanco.

2.1.D.- CURVA PATRÓN DE LA RIBOSA Y LA DESOXIRRIBOSA CON DIFENILAMINA

MÉTODO- TÉCNICA



Prepare las siguientes soluciones:

10ml de ácido tricloroacético al 10%

Reactivo de difenil amina.- 1 g de difenil amina en 100ml de ácido acético glacial + 2.5 ml de H₂ SO₄ concentrado.

I.- Siguiendo el paso VII de "Extracción de ADN Animal II", tomar 2ml de ésta solución y añadir 1 ml se ácido tricloroacético al 10% + 5ml de reactivo de difenil amina.

II.- Realizar una ligera mezcla y calientar 10'min a baño maría

III.- Preparar una curva patrón con algunos patrones y su blanco (como se muestra en la tabla anexa), lea a 595 nm.

R (+) = Color Azul

***Checar tabla de medición de ADN**

FUNDAMENTO



El azúcar conocido como desoxirribosa, reacciona fácilmente con la difenil amina en medio ácido, dando una reacción positiva solo en los azúcares unidos a bases púricas, ya que éstas se liberan adoptando una configuración abierta dentro de la cadena de ADN o ARN.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas, es muy usual para la identificación de ADN y ARN en los procesos y métodos de investigación.

Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ADN y ARN, por ende se utilizan muy bien en todos los niveles e investigación, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se haga cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar el poder rotatorio de los azúcares con capacidad reductora, usando un polarímetro.

Determina la diferencia entre 2 compuestos que presentan la misma fórmula, estructura empírica y los mismos grupos funcionales.

IMPORTANCIA.



Resalta la importancia de que 2 isómeros ópticos desvían el plano de luz polarizada en direcciones opuestas. Por ejemplo, el (+) ácido ascórbico es la vitamina C, mientras que su homóloga de igual composición química, pero con una geometría diferente, el (-) ácido ascórbico, no presenta actividad biológica, es un compuesto inerte.

¡NOTA IMPORTANTE!



Calibre previamente su polarímetro.

Aunque los valores de equilibrio no se alcanzan hasta las 24 horas, pueden conseguirse más rápidamente añadiendo 1 gota de amoníaco a la solución.

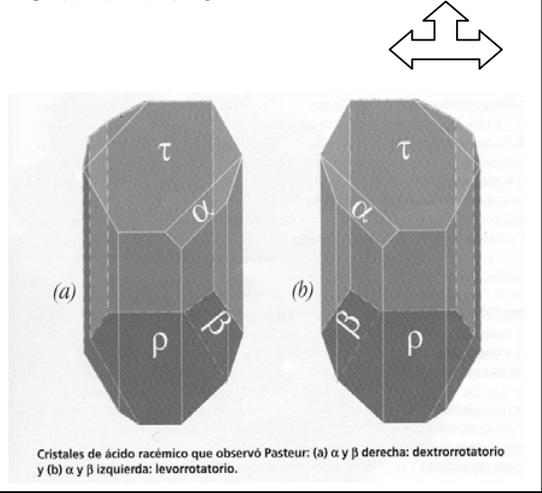
2.1.E.- MUTARROTACIÓN DE LOS AZÚCARES

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Disolver 1g de glucosa cristalina (α o β) en 10 ml de agua destilada.
 - II.- Preparar un cronometro en mano, se poner en marcha y tomar el tiempo cero.
 - III.- Preparar el polarímetro, agregar la solución en un tubo polarimetrico.
 - IV).-Leer el ángulo (α) de desviación de luz polarizada a intervalos regulares de 15' minutos (de 3 – 6 lecturas).
 - V.- Extrapolar a tiempo cero para obtener el valor de (α), para la forma cristalina utilizada.
 - VI.-Utilizar la fórmula: $\alpha = (\alpha) \times C \times L$.
- $C = 0.1 \text{ g / ml}$
- $L = 1 \text{ ó } 2 \text{ dm. según diseño experimental}$

FUNDAMENTO



APLICACIÓN.



Muy recomendada para nivel superior, ya que fortalece algunos temas vistos en los programas, sobre todo en estereoisomería y mezclas racémicas.

CLASIFICACIÓN.

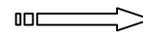
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas, lecciones de bioquímica estructural, España, Reverte, 1993.
- 2.- TRUJILLO. R. Mauricio, Pasteur y las moléculas en el espejo, ¿Cómo Ves?, Año 4, N°44

INTRODUCCIÓN



Los disacáridos son **biomoléculas** que se forman por unión de 2 unidades de monosacáridos, llevándose a cabo la eliminación de 1 molécula de agua.

También se les conoce como **diholósidos**, se caracterizan por las "osas" que los constituyen y el lugar que ocupa el puente oxidico con sus enlaces α y β , 1-2 ; 2α , 1-4; α y β , 1-4. Al formarse el puente entre moléculas de oxígeno, se dice que el azúcar se ha cerrado en anillo **piranósico**, cuando el ciclo tiene 6 eslabones, y **furanósico**, si tiene 5.

Los disacáridos se agrupan en función de 2 moléculas de azúcar, es decir, formados por 2 monosacáridos iguales o distintos.

Los disacáridos reciben nombres sistemáticos en función de:

- 1) Los monosacáridos que lo compone.
- 2) El tipo de enlace que interviene entre los 2 azúcares.
- 3) El sitio del puente oxidico.
- 4) La terminación "osa" o "ano" (nombre sistemático)

Dadas sus propiedades químicas se clasifican en reductores, cuando conservan un grupo aldehído o cetona libre, y coinciden con sus propiedades fisicoquímicas con los monosacáridos; son sólidos, cristalinos, hidrosolubles, presentan **mutarrotación** y poder reductor, entre otras propiedades.

Se consideran no reductores en caso de no quedar expuesto el grupo aldehído o cetona.

Los disacáridos pueden ser homogéneos o heterogéneos dada la composición de sus monómeros, por ejemplo, los homogéneos de glucosa incluyen a la celobiosa, maltosa, isomaltosa, gentobiosa y trehalosa.

Los heterogéneos son la sacarosa, lactosa, lactulosa y melibiosa.

PIE DE FOTO.



Representación esquemática en donde la glucosa se presenta en forma piranósica y la fructosa adopta la estructura de 5 miembros de tipo furanosa. (1)

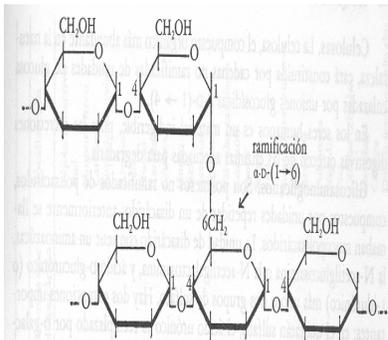
2.2.- DISACÁRIDOS

CITA TEXTUAL (Consulta...)



*Muchos historiadores han planteado que tanto el plomo como la atracción por lo dulce contribuyeron a la caída del imperio romano. Los recubrimientos con plomo empleados en vasos, platos y cerámica en general, además del plomo presente en las tuberías, han hecho especular sobre el posible daño cerebral que este pudo causar. Adicionalmente ante la falta de miel, los cocineros eran propensos a endulzar sus platillos empleando una sustancia llamada **sapra**, producida al hervir vino picado (en el que el alcohol se oxida a ácido Acético) en recipientes de plomo, formando acetato de plomo (azúcar de plomo) que es muy dulce. (2)*

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Por qué se les llama disacáridos?
- 2).- ¿En que caso, el azúcar se considera no reductor?
- 3).- ¿Qué compuestos forman las hidraclinas con la maltosa y la lactosa?
- 4).- ¿Qué importancia tiene recristalizar y sacar el punto de fusión del producto en la reacción de osasomas?
- 5).- ¿Qué color nos da la reacción anterior?

COMENTARIOS



El disacárido más representativo de este grupo es la sacarosa, que proviene principalmente del azúcar de caña y de la remolacha, en sus formas pura o combinado con muy distintos alimentos, es un componente importante para la dieta humana.

Los disacáridos formados por la unión de un OH del carbono **anomérico** de un monosacárido y un grupo hidroxilo de otro monosacárido, tienen gran importancia fisiológica la sacarosa, la lactosa y la maltosa. Aunque la maltosa no existe libre en la naturaleza; se obtiene por una hidrólisis parcial de los polisacáridos, almidón y glucógeno, pero forman parte de su larga estructura.

La lactosa presente en la leche, se forma en las glándulas mamarias de los mamíferos; es considerado un galactósido con uniones glucosídicas. Sin embargo, tanto la sacarosa como la lactosa no pueden absorber directamente por la sangre y primero deben ser hidrolizadas por enzimas específicas, presentes en la mucosa intestinal.

La sacarosa se utiliza ampliamente como agente edulcorante, se obtiene fácilmente y es más dulce que los azúcares comunes, maltosa, lactosa y glucosa. Solo la fructosa es más dulce, y hoy en día mezclas de fructosa y glucosa producidas por enzimas a partir del maíz y otras plantas, están sustituyendo a la sacarosa como edulcorante comercial.

FUENTES.



- 1.- LAGUNA Y PIÑA. Bioquímica, 4ª/e^d, España, Salvat, 1990.
- 2.- LOPEZ. M. Agustín, ¿Cómo te supo? La ciencia de la dulzura, ¿Cómo Ves?, Año 2, N°22, Septiembre 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Cuantificar a la lactosa medianate una técnica de titulación indirecta con un vire de color.



IMPORTANCIA.

Ésta práctica es una de las más importantes en las áreas de la bioquímica experimental, ya que cuantifica con gran precisión una de los disacáridos más relevantes en la industria alimenticia.

2.2.A.- CUANTIFICACIÓN DE LACTOSA

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Tomar un matraz de aforo de 100ml y colocar en su interior 2.5 g de leche + 40 ml de agua, agitar cuidadosamente para homogenizar y evitar el espumado.
- II.- Enseguida añada 3ml de fehling I, agitar con cuidado y agregar 2ml de NaOH 0.25N, seguir agitando con cuidado.
- III.- Llevar al aforo hasta 100ml con agua destilada, homogenizar sin formar espuma, filtrar.
- IV.-Mientras filtra, colocar en un vaso de precipitados de 250ml, 5ml de fehling + 5ml de Fehling II + 10 ml de agua destilada, cubrir el vaso con un vidrio reloj y poner a hervir.
- V.- Cuando comience a ebullición agregar 10ml del filtrado obtenido anteriormente y continuar la ebullición sin quitar el vidrio reloj, hasta completar 6' min, observará un precipitado de óxido de cobre (color ladrillo), en éste momento se debe retirar del fuego.
- VI.-Colocar una solución de HNO₃: H₂O 1:1 en un baño maría.
- VII.- Lavar la parte convexa del vidrio reloj con agua destilada, recolectar los lavados en el mismo vaso. Filtrar la solución por gravedad, enjuagando el baso con agua caliente para desprender todas las trazas de cobre que estén adheridas. Los lavados también se filtran para recuperarlos.
- VIII.- Colocar en un matraz Erlen meyer, el papel filtro con el óxido de cobre y agregue 3ml de la mezcla de HNO₃: H₂O 1:1, calentar sobre el papel filtro. El oxido se disuelve al entrar en contacto con la mezcla, de ser necesario lavar nuevamente el papel filtro con otros 3 ml de la mezcla caliente y retirar con una varilla de vidrio.
- IX.-Calentar la solución de nitrato de cobre hasta ebullición y adicionar con cuidado 0.3g de urea, y continuar la ebullición más de 1' min.
- X.- Dejar enfriar y adicionar 5ml de ácido sulfúrico diluido 1:1. Calentar nuevamente con cuidado hasta que aparezcan vapores de ácido sulfhídrico.
- XI.- Llevar el residuo a 50ml de agua, calentar por un min., dejar enfriar la solución y agregar 2 ml de KI al 50%, tapar el matraz con un vidrio reloj y dejar reposar unos minutos (solución café intenso). Titular el yodo obtenido con una solución de tiosulfato 0.1 N más 2 ml de almidón hasta que aparezca un color amarillo tenue. Continuar titulando hasta que el color azul desaparezca y quede una suspensión insoluble de color blanco amarillenta.
- XII.- Una vez que queda la suspensión, agitar vigorosamente el matraz para que el precipitado no ocluya yodo y la reacción sea cuantitativa.

Según la reacción $2\text{Cu} = \text{I}_2 = 2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ por lo tanto 0.0634g de Cu = 1ml de Na₂S₂O₃ 1N
Reportar en % P /V de Lactosa en la muestra de la leche.

FUNDAMENTO



El óxido cuproso reacciona con el ác. Nítrico y después con el ác. Sulfhídrico formándose sulfato de cobre.



El producto se valora con tiosulfato de sodio 0.1 N



APLICACIÓN.



Se aplica muy bien como una metodología experimental dentro de las aulas del nivel superior. Dada su complejidad y los reactivos usados, no se recomienda para los niveles básicos.

¡NOTA IMPORTANTE!



En el paso IX tenga cuidado de los vapores que se desprenden ya que provocan quemaduras.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- ESCALANTE R. G. Q.F.B., MONDRAGÓN E. Ma Elena Q.B.P., et.al, MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS Q.F.B. México, UNAM, 20002

INTRODUCCIÓN



Los oligosacáridos son azúcares que contienen de 2- 20 unidades unidas por enlaces glicosídicos. Al existir más de 20 unidades se le considera ya un polisacárido.

La unión de los monosacáridos tiene lugar mediante enlaces acetálicos o glicosídicos, dentro de esta clasificación pueden incluirse aquellos polimeros que no rebasen las 20 unidades, aunque esto dependerá del tipo de bibliografía que se consulte; los más abundantes son los disacáridos, aquellos formados por 2 monosacáridos iguales o distintos.

Los enlaces glucosídicos forman parte de las estructuras acetálicas y pueden sufrir hidrólisis **catalizadas** por ácidos y calor. En su mayoría se producen por hidrólisis de polisacáridos a unidades pequeñas.

Los oligosacáridos **reductores** coinciden en sus propiedades físicas y químicas con los monosacáridos simples: son sólidos, cristalinos, hidrosolubles, presentan **mutarrotación** y poder reductor, entre otras propiedades. Las propiedades reductoras se solo se dan cuando uno de los hidroxilos anoméricos no está comprometido en el enlace glicosídico.

Como ejemplo tenemos a la maltosa, la isomaltosa, la celobiosa y la lactosa. Entre los oligosacáridos no reductores se encuentran la sacarosa, la trehalosa y la rafinosa.

Los oligosacáridos no reductores se encuentran frecuentemente en fluidos biológicos, casi siempre de origen vegetal.

Por ejemplo la maltosa existe en muy pequeñas cantidades en plantas y es un producto de la hidrólisis parcial del almidón que se produce en el malteado de cebada y que además se utiliza como un edulcorante suave en los alimentos.

PIE DE FOTO.



Representación esquemática que nos señala el enlace β ,1-4 Glucosídico, de la lactosa. (1)

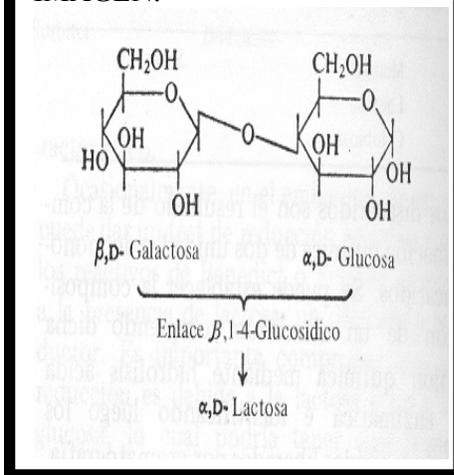
2.3.- OLIGOSACÁRIDOS

CITA TEXTUAL



En México se comercializa un sustituto de la leche (Alegria), que contiene fibra soluble, principalmente inulina y otros azúcares, y β -glucano, que es una fibra extraída de la avena. Actualmente se evalúan sus beneficios en pacientes con diabetes y con problemas de obesidad. La inulina y otros azúcares complejos a base de fructosa, se encuentran de manera natural en el agave tequilero, aunque los productos comerciales se obtienen de una planta conocida como alcachofa de Jerusalén y de la achicoria. (2)

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Qué diferencia hay entre Disacárido y Oligosacárido?
- 2).- ¿Qué coincidencia hay entre Monosacáridos y Oligosacáridos?
- 3).- ¿Cómo se prepara el suero de la leche para la reacción de Fehling?
- 4).- ¿Qué metales reducen dichos azúcares en esta reacción?
- 5).- ¿Qué grupo determina la prueba de Biol?

COMENTARIOS



Es sabido que la sacarosa es un azúcar que se absorbe fácilmente en el intestino y se convierte fácilmente en glucosa para ir a torrente sanguíneo. Haciendo de la sacarosa uno de los 3 carbohidratos que los seres humanos pueden aprovechar para obtener energía; siendo los otros 2 la lactosa y el almidón.

La concentración de la lactosa en leche cambia, dependiendo del mamífero. En cabra y vaca van de un 4.5- 4.8% y la humana hasta un 7%. La lactosa constituye el 40% de la energía consumida durante la lactancia. La leche también contiene de un 0.3- 0.6% de otros oligosacáridos que poseen lactosa, de los cuales son una rica fuente de energía para los **lactobacillus bifidus**, predominante en la flora intestinal de los lactantes

También es conocido que la lactosa es un buen estimulante de la absorción intestinal en la que la fase líquida solidifica como un vidrio, restringiendo la movilidad de todas las moléculas, y las reacciones dependientes de la difusión; causando que la molécula de agua en estado de vidrio no pueda cristalizar. De esta manera, los azúcares funcionan como **crioprotectores**, protegiendo contra la lesión de tejidos celulares y contra la deshidratación que se producen en la congelación.

FUENTES.



- 1.-ASHBY. J. F. Principios de Química Biológica, España, Acribia, 1998.
- 2.- LOPEZ. M. Agustín, Alimentos funcionales. Salud ala carta, ¿Cómo Ves?, Año 4, N°42, Mayo 2002.

INTRODUCCIÓN



El término científico para los **polisacáridos** es el de “**Glicanos**”, estos se presentan en forma lineal o ramificada.

Los polisacáridos son polímeros que provienen de una o varias cadenas de monosacáridos.

Si todas las unidades **glicosídicas** están constituidas por el mismo azúcar se llaman “**homoglucos**” y si están constituidas por diferentes azúcares se les llama “**heteroglucos**,” 2 ó más unidades distintas.

Un polisacárido con 2 unidades distintas se le llama Diheteroglucano, el que contiene 3, Triheteroglucano, y así sucesivamente.

Al número de unidades de monosacáridos en el polisacárido, se le denomina grado de polimerización (G P), y es muy variable. Muy pocos poseen un GP < 100, la mayoría presentan un GP que va de 200 – 3000.

Una gran macromolécula es la celulosa, que comprende un GP de 7000 – 15000. Se sabe que más de un 90% del total de carbohidratos existentes en la naturaleza se haya en forma de polisacáridos.

En cuanto a la nomenclatura abreviada de oligo y polisacáridos, las unidades de azúcar se designan con las 3 primeras letras del nombre, en donde la primera es mayúscula ejemplo Glucosa = Glc.

Si el monosacárido es una L- Azúcar, se mantiene la literal L; en caso de que la literal sea D, se omite, ejemplo Arabinosa L- Ara.

El tamaño del anillo, si es piranosil, se designa con una p cursiva o si es un furano, con una f cursiva.

La configuración anomérica se designa con con las letras α o β , ejemplo Glucopiranosil = α Glc p .

Los ácidos urónicos se designan con una A mayúscula, ejemplo, ácido gulopiranosilico = L Gul p A. La posición de los enlaces se designa por 1 \rightarrow 3 ó 1, 3, ejemplo maltosa = α Glc p (1 \rightarrow 3) Glc o también α Glc p 1,4 Glc .Es importante notar que no se puede designar con α o β , o con una p o f, puesto que el anillo puede estar abierto o cerrado.

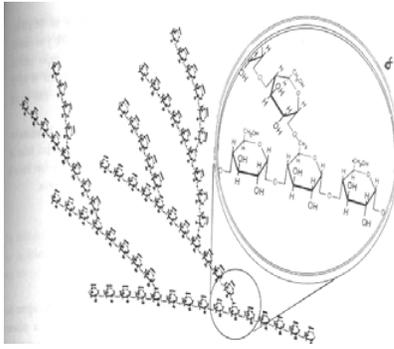
2.4.- POLISACÁRIDOS

CITA TEXTUAL



Un trabajo coordinado por Xavier Soberón y Agustín López se enfoca al estudio de la α -Amilasa y su capacidad de producir eficientemente glucosa a partir del almidón. Se le compara con otras enzimas que también actúan sobre azúcares y se han implementado cambios en su estructura, inspirados por estas comparaciones, que permiten generar cadenas mucho más pequeñas de glucosa que las producidas usualmente. Estos estudios tienen potencial para simplificar el proceso de producción de los jarabes, eliminando la necesidad de una 2ª enzima, lo que reduce los costos significativamente. (2)

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Vista macroscópica de un polímero de almidón, mostrando los enlaces glicosídicos. (1)

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1.- ¿De qué otra forma se les llama a los polisacáridos?
- 2.- ¿Qué significado tiene D los siglos GP?
- 3.- ¿Cuál es el único reactivo capaz de disolver la celulosa?
- 4.- ¿Qué compuesto identifica la reacción de lugol?
- 5.- ¿En qué parte de la molécula de almidón se insertan los iones de yodo?

COMENTARIOS



La mayoría de los polisacáridos contienen unidades glicosídicas que como medida, poseen 3 grupos hidroxilo; por lo tanto se les considera **polioles** en donde cada grupo hidroxilo puede formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua sueltas y de esta manera, mantenerlas unidas con gran avidez .

Los polisacáridos modifican la movilidad del agua en los alimentos, y conjuntamente controlan muchas propiedades metabólicas y fisiológicas en las células, en los órganos y en los nutrientes.

Tres azúcares de esta clase son: el almidón, el glucógeno y la celulosa; que pueden llamarse hexosanos o glucosanos y que presentan insolubilidad en el agua ya que solo dejan expuesto un grupo aldehído libre en toda la molécula por lo cual pierden su poder reductor.

Estos azúcares son insípidos. Existen azúcares capaces de fermentar en presencia de levaduras (glucosa, fructosa, maltosa y manosa), otros no fermentan (lactosa, galactosa y pentosas).

La presencia de glucosa en la orina – glucosuria – nos indica una disfunción del túbulo renal y la presencia de azúcar en la sangre (diabétes miellitus). Se mide con el método de Benedict o con un método más preciso, el de la glucosa oxidasa.

FUENTES.



- 1.-RENDINA. G. Técnicas de Bioquímica Aplicada, España, Interamericana, 1997.
- 2.- SOBERON Xavier y López Agustín, Imitar a la Naturaleza, ¿Cómo Ves?, Año 2, N° 18, Mayo 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de almidón en algunos alimentos caseros con el reactivo de lugol, para reconocer el polisacárido.



IMPORTANCIA.

La inserción de las moléculas de yodo se lleva a cabo en los enlaces α -1-4 de la hélice como se señala en el esquema.

Cada molécula de yodo queda atrapada en una espiral del esqueleto de la molécula de almidón. La amilosa produce un color azul puro intenso, mientras que la amilopectina produce un color rojo y el almidón, un color negro o café.

Al calentar la solución, el color desaparece aunque al enfriarse se revierta la reacción. Las cantidades elevadas de etanol entorpecen la reacción.

El yodo en medio alcalino oxida a la glucosa dando ácido glucónico. Las cetosas no se oxidan en estas condiciones. El yodo en presencia de agua es oxidante.

¡NOTA IMPORTANTE!



La disolución de yodo es de 0.01 mo /L, para ser exactos: disolución de yodo / potasio.

La reacción es muy sensible, detecta hasta 0.002mg de almidón / ml de solución.

2.4.A.- REACCIÓN CON LUGOL - DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Triturar un gramo de almidón en 10ml de agua fría.

II.- Vertir la suspensión lechosa en un recipiente con 200ml de agua hirviendo y deje enfriar la mezcla.

III.- Parte del material formará una solución coloidal.

Poner 5ml de esta solución en un tubo de ensayo y añadir unas gotas de Lugol diluido, esperar resultados.

IV.- Raspar un poco del interior de una papa y poner la muestra en un vidrio reloj, tomar una muestra de paté y un pedacito de hoja blanca, y hacer lo mismo.

V.- A cada muestra se debe agregar unas gotas de lugol y esperar los resultados.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE LUGOL:

Disolver 16 g de yoduro de potasio en 5 ml de agua y añadir 3.2g de yodo, una vez disueltos, aforar con agua hasta 250 ml.

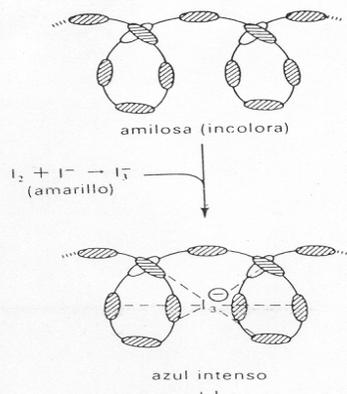
REACCIÓN (+) p/ almidon = color café oscuro o negro.

REACCIÓN (+) p/ amilosa = color azul intenso

FUNDAMENTO



Inserción de yodo en almidón



APLICACIÓN.



Su aplicación se lleva a cabo en los laboratorios escolares de los diferentes niveles escolares.

Se usa comúnmente para determinar la presencia de almidón en repostería fina, harinas de cereales, productos de molienda y pan y otras muestras biológicas tratadas adecuadamente.

CLASIFICACIÓN.

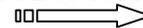
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM México, 1993.
- 3).-MACARULLA .M. J. y GOÑI. M. F. Biomoléculas lecciones de bioquímica estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cualitativa la presencia de celulosa en una muestra de papel común y corriente.



IMPORTANCIA.

Esta reacción es de suma importancia ya que la celulosa es insoluble en la mayoría de los disolventes, pero es soluble, solamente en el reactivo de Schweitzer.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se recomienda tener mucho cuidado en el manejo del reactivo de Schweitzer ya que puede producir daños severos a la piel.

2.4.B.- REACCIÓN DE SCHWEITZER - SOLUBILIDAD DE LA CELULOSA

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- En un baso de precipitados de 10ml agregar el reactivo de Schweitzer en una cantidad significativa.
- II.- Agregar enseguida un trozo de papel filtro que mida de 3-6 cm. De diámetro.
- III.- Dejar reposar la mezcla el tiempo suficiente, hasta la formación de una solución viscosa.
- IV.- Luego vertir en ácido clorhídrico diluido y anote sus resultados.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE SCHWEITZER.

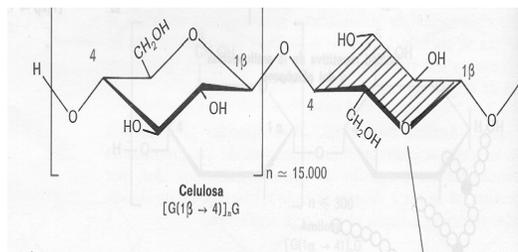
Tome un volumen 10 ml de hidróxido de amonio concentrado y agregarle 2ml una solución de hidróxido cúprico al 20%.

REACCIÓN (+) = Producto lechoso y blanco

FUNDAMENTO



La disposición de hidroxilos con respecto a un plano principal de la cadena, alternativamente hacia arriba o hacia abajo, permite establecer múltiples enlaces de hidrógeno que son susceptibles a algunas bases como la de amonio.



APLICACIÓN.



Este método aunque es muy sencillo y elemental, inicialmente se usó satisfactoriamente para la fabricación de fibra de celulosa.

En los laboratorios escolares se usa con mucha frecuencia dado su sencillo manejo.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas, lecciones de bioquímica estructural, España, Reverte, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Inducir el fenómeno de pirólisis al calentar un azúcar por encima de su punto de fusión, logrando inducir la adición de ácidos carboxílicos y de algunas sales. Dicho cambio se evidencia al generarse un ligero color amarillo o un café ámbar.

Los azúcares reductores que más favorecen esta reacción en primer lugar están, las pentosa, en segundo lugar están, las hexosas y de esta manera las aldosas actúan más fácilmente que las cetosas. En términos generales, los monosacáridos son más activos que los disacáridos.

IMPORTANCIA.



Debido a la complejidad de esta reacción, existen aspectos que no se conocen muy bien y que requieren de más investigación; ya que el comportamiento de los azúcares varía considerablemente con el pH, la temperatura y la presencia de otros agentes químicos que lo pueden dirigir a diversas rutas.

¡NOTA IMPORTANTE!



Una desventaja de esta reacción es que genera una serie de compuestos nocivos como pigmentos de melanoïdinas, furanonas, lactonas, furanonas, pironas, pirazinas, esteres y ácidos; aunque en muy baja cantidad.

2.4.C.- REACCIÓN DE MILLAR - CAMELIZACIÓN O PIRÓLISIS DE LOS AZÚCARES

MÉTODO- TÉCNICA

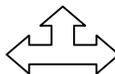


I.- A un tubo de ensayo agregar de 2 – 5 g de sacarosa.

II.- Poner al fuego el tubo de ensayo y se esperar hasta que haya una descomposición del azúcar caracterizada por el pardeamiento de la misma y la presencia de agua.

III.- Observar las características y hacer sus anotaciones.

FUNDAMENTO



Esta reacción esta dada por una deshidratación general de los azúcares al exponerse al fuego, que provoca la transformación de ciertos isómeros y sus derivados insaturados. Por ejemplo 2,5-Dimetilpirazina y la trimetilpirazina, que contribuyen a su aroma característico.

APLICACIÓN.



Los cambios que se realizan no siempre son dañinos, ya que en algunos casos como en el del cacao, café, panes, natillas cajetas le dan el pardeamiento, aroma y sabor requeridos para la industria alimenticia.

Esta práctica es muy ilustrativa para los niveles de secundaria y preparatoria ya que demuestra la presencia de varias sustancias en un compuesto.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

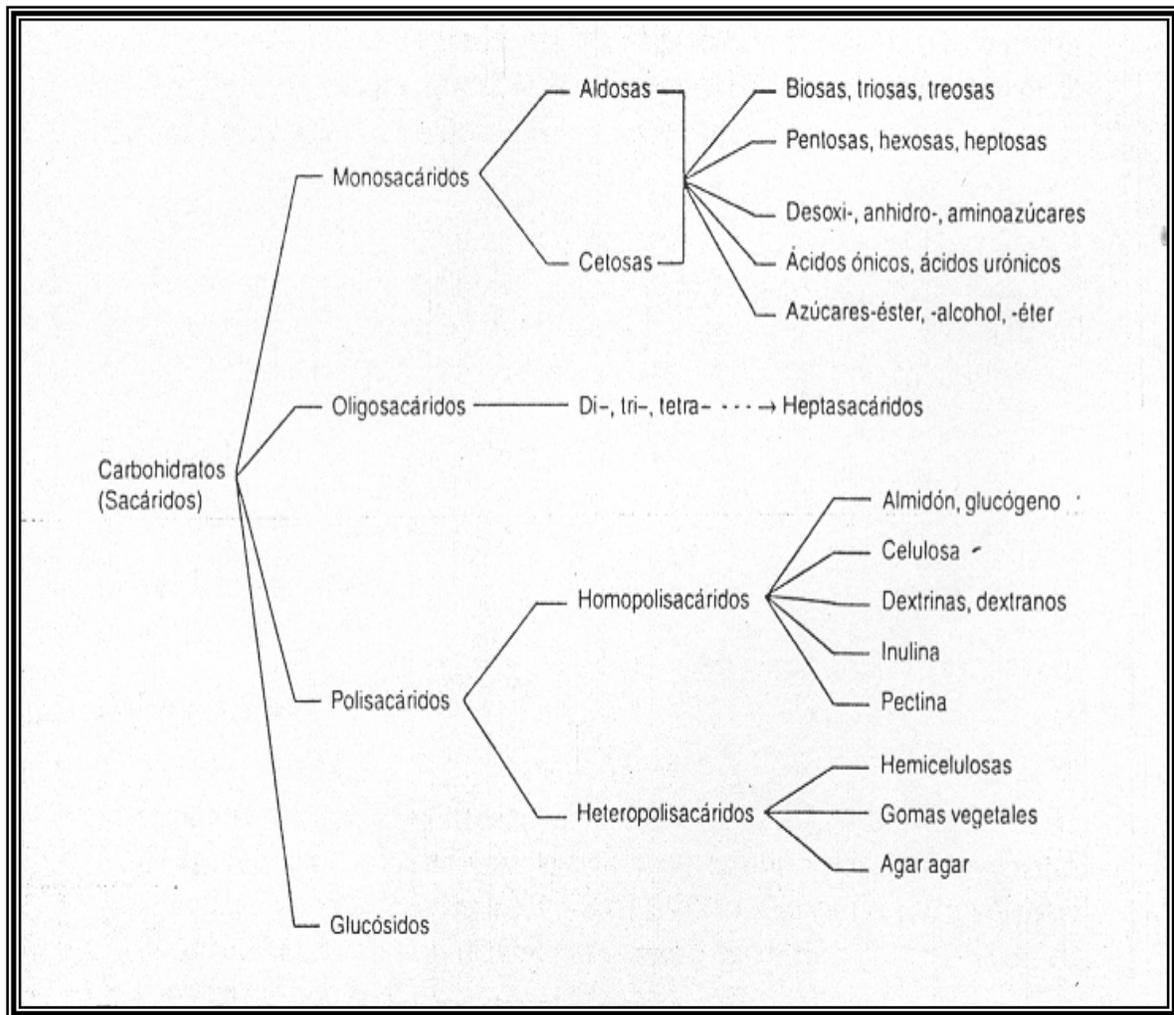
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



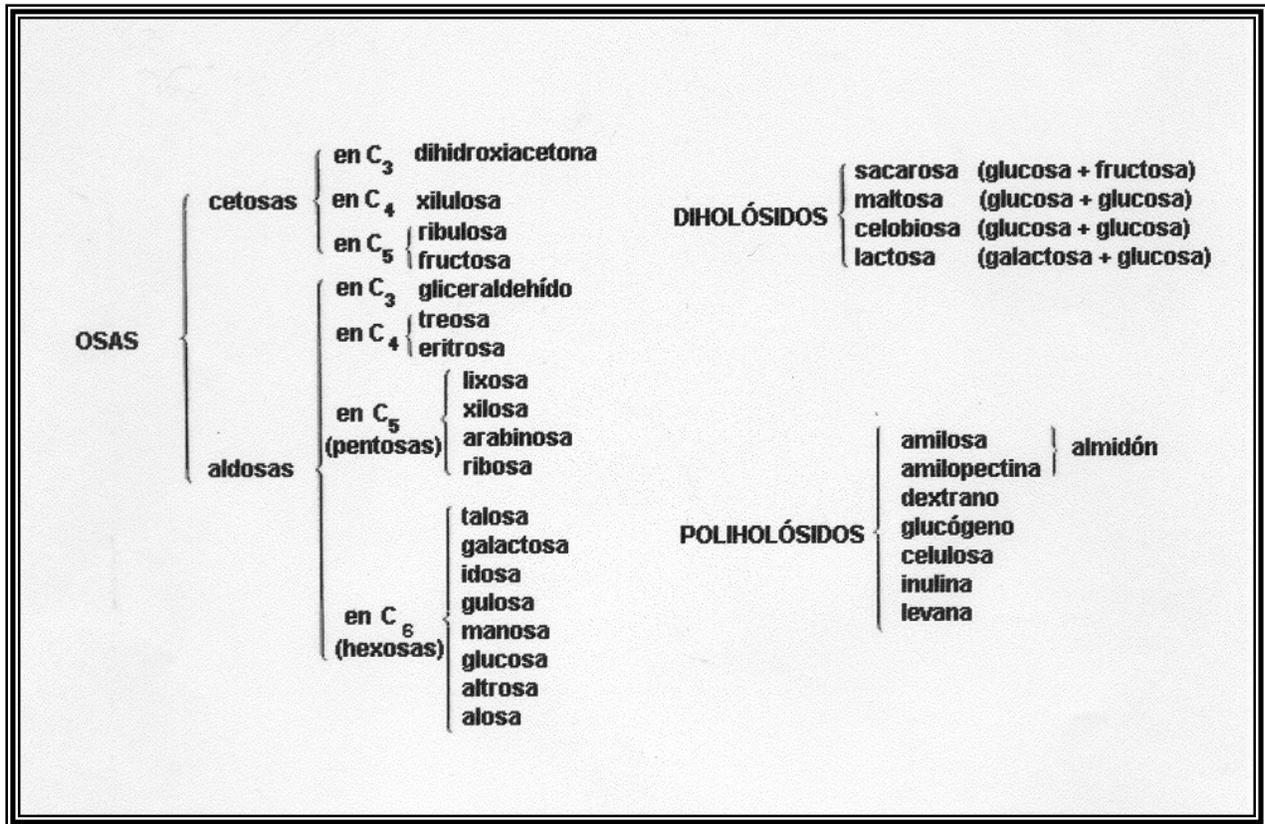
1.-BADUI Salvador. Química de los alimentos, 3ª/ e^d, Pearson Educación, México, UNAM, 1993.

ESQUEMA 2 A



REINHARD Esquema que nos muestra una clasificación de los carbohidratos

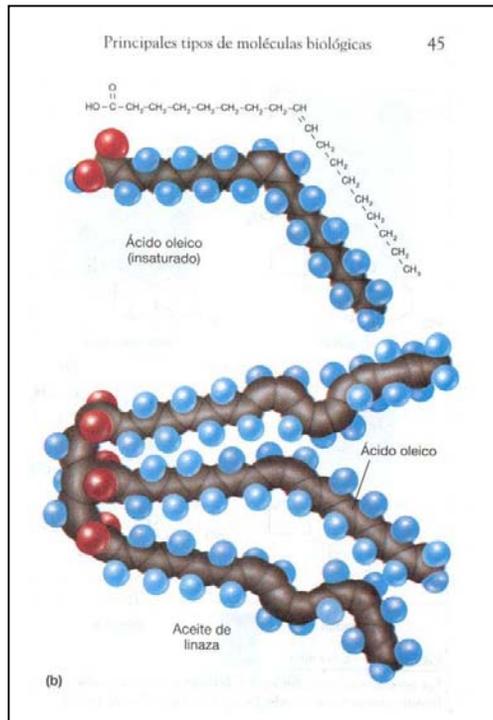
ESQUEMA 2 B



BADUI Clasificación clásica de los carbohidratos

CAPÍTULO 3

LÍPIDOS



Λιπος λιπος

INTRODUCCIÓN



Del Griego $\lambda \iota \pi \omicron \varsigma$, **lipos**, **grasa** forman un grupo de **biomoléculas** estructuralmente muy heterogéneo, pero con características muy particulares de solubilidad en disolventes orgánicos como el éter, benceno, cloroformo, alcohol, etcétera.

La mayor parte de los lípidos están constituidos por las grasas y los aceites.

Los lípidos son principalmente un grupo de biomoléculas que contienen C, H, y O, aunque a menudo presentan P, S, N; de manera muy semejante a la de los carbohidratos. Cabe aclarar que sus grupos funcionales son muy característicos y definidos.

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadena larga, que se hayan regularmente formando parte de otros lípidos, casi siempre por medio de enlaces ésteres. Sus principales grupos son: **(R-CH₂-OH) Alcohol**,

(R-O=C-O-R) Ester,

(R-O=C-O) Acido graso.

Son insolubles en agua y solubles en cloroformo y éter de petróleo

Existen diferentes formas de clasificar a los lípidos dependiendo de la bibliografía consultada, aunque una de las formas más generales es la siguiente:

Acilglicéridos o Grasas Neutras.- son ácidos grasos unidos a un glicerol, que pueden ser aceites o grasas y que tienen como función el almacenar energía metabólica. Aceites vegetales, aceites minerales y Grasa animales.

Fosfolípidos.- Es la unión que se da entre un grupo fosfato polar y un ácido graso a un glicerol. Por ejemplo Membrana celular y la Fosfatidil Colina **Ceras**.-Es aquel número variable de ácidos grasos unidos a una cadena larga de alcohol. Por ejemplo Cutícula de vegetales.

Esteroides.- es la unión que se da entre 4 anillos de 6 carbonos cada uno (ciclopentanoperhidrofenantreno), agregados entre si. Por ejemplo Testosterona, Colesterol y Sales Biliares.

Los cambios físicos y químicos que sufren los lípidos frente a las condiciones ambientales se ven influidos por numerosos parámetros que determinan las características **organolépticas** del mismo como **rancamiento**, **pardeamiento**, descomposición, licuación, etcétera.

3.- LÍPIDOS

CITA TEXTUAL



¿Podrías imaginar un mundo sin chocolate?. Pues si bien los aztecas no lo consumían en la forma que lo hacemos hoy en día, de cualquier manera recibían sus beneficios. ¿Sabías que al comer 40 g de chocolate con leche, 400mg de antioxidantes flavonoides pasan a tu torrente sanguíneo?

¿Sabías que con la misma cantidad de chocolate oscuro, duplicas el consumo de antioxidantes, más o menos la dosis que hay en una taza de té negro. Entre los flavonoides que componen al chocolate se encuentran las procianidinas y la epicatequina, que ayudan a mantener la salud cardiovascular? (2).

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Ilustración que resalta la importancia de los aceites esenciales, en la industria de los perfumes y cosméticos, a partir de productos naturales. (1)

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- Define qué es un lípido.
- 2).- ¿Cuál es la prueba fundamental de los lípidos?
- 3).- ¿Cuáles son los grupos funcionales principales de una grasa?

COMENTARIOS



Los lípidos desempeñan múltiples funciones como tejido, como constituyentes celulares, como mensajeros químicos, como transportadores de nutrientes, vitaminas, pigmentos y hasta como fragancias esenciales; aunque su principal función es la de aportar de energía; en donde cada g de grasa genera 9 Kcal de energía.

Tanto las grasas como los aceites contribuyen determinadamente a dar las propiedades sensoriales. Encontrándose éstos en frutos secos, semillas oleaginosas y tejidos animales; dado que las hortalizas y las frutas jugosas presentan muy bajas concentraciones de estas.

El uso de las esencias se puede rastrear a través del tiempo en las prácticas religiosas, médicas y hasta de protocolo social; en las principales civilizaciones de la antigüedad desde Asia, América, África y Europa, como un común denominador. Sin embargo, el mérito de haber reconocido y explotado las fragancias o "espíritus" a partir de la herbaria, corresponde a los egipcios los cuales usaron mirra, sándalo y jazmines principalmente. Posteriormente se heredó éste conocimiento a Turquía, Persia y Siria.

Un dato interesante, recién descubierto es que los aceites ω - 3 son antidepresivos naturales, alivian el dolor y la rigidez en los casos de artritis reumatoide, reducen el nivel de triglicéridos en la sangre y disminuyen las enfermedades cardiovasculares, entre otras cosas.

FUENTES.



- 1.- CHIAZZAR Susi, Colores y aromas, E.E.U.U; Grupo editorial Tomi, 2001
- 2.- LOPEZ. M. Agustín, Alimentos funcionales: Salud a la carta, ¿Cómo Ves?, Año 4, N°42, Mayo, 2002.

¿PARA QUÉ SIRVE?



El alumno asimilará una forma sencilla de extraer lípidos de algunas semillas oleaginosas.

Identifica de manera general a los lípidos a través de una prueba sencilla y cualitativa.

IMPORTANCIA.



Las ventajas de esta técnica es que es económica, se realiza en corto tiempo, no lleva ningún riesgo para los alumnos. No es necesario pesar o medir muestras

Se recomienda usar semillas como la nuez de cáscara de papel, piñones, mantequilla, mantecas o aceites, ya que las pruebas son más evidentes con estas muestras.

¡NOTA IMPORTANTE!



No es recomendable usar cremas comestibles ya que pueden falsear la prueba por su gran contenido de agua.

No se deberán usar semillas con poco contenido de grasa, pues la prueba no es lo suficientemente evidente.

3.A.- PRUEBA DE LA HUELLA TRASLÚCIDA EN PAPEL NO TRANSPARENTE

MÉTODO- TÉCNICA

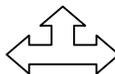


- I.- Seleccionar 5 muestras alimenticias como: Glicerina, Leche, Nuez, Mantequilla y Manzana.
- II.- Cortar 5 trozos de papel, a partir de una hoja de cuaderno.
- III.- Frotar cada una de las muestra (paso I) en un trozo de papel.
- IV.- Anotar sus resultados en un cuadro previamente realizado.

Grasas Insaturadas o Lípidos Simples R = (+)

Grasas Saturadas y Lípidos compuestos R = (-)

FUNDAMENTO



La propiedad que presentan algunos lípidos para permitir el paso de la luz a través de ciertas superficies, por ejemplo papel no transparente.

Dicha propiedad la presentan los lípidos insaturados, esto es, que en su cadena carbonada presentan dobles o triples enlaces.

APLICACIÓN.



Esta técnica es muy socorrida en el nivel básico, aún en ausencia de un laboratorio escolar ya que puede realizarse como una experiencia grupal sin salir del aula escolar.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



CAMPOS. C. G. y DELGADO. B. N. L.; Manual de bioquímica Celular, México, FESC-UNAM, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Observar y determinar las propiedades organolépticas, físicas y químicas de los lípidos

Identifica de manera general a los lípidos a través de una prueba sencilla y cualitativa.

IMPORTANCIA.



Es importante destacar que existen diversas pruebas físicas que nos pueden evidenciar las características de algunas grasas, por ejemplo la de densidad que se determina con un picnómetro o una balanza de Mohr – Westphal, o el índice de refracción, que se mide con un refractómetro de Abbe y nos permite conocer la pureza y la composición de la grasa.

Las ventajas de esta técnica es que es económica, se realiza en corto tiempo, no lleva ningún riesgo para los alumnos.

No es necesario pesar o medir con exactitud las muestras y los reactivos

¡NOTA IMPORTANTE!



Si se trabaja con alumnos del nivel medio básico, es recomendable cuidar que no ingieran los reactivos.

También se debe tomar en cuenta que la homogenización sea suave y se debe observar si hay solubilidad total o parcial

3.B.- PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE LÍPIDOS

MÉTODO- TÉCNICA

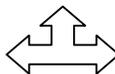


- I.- Preparar en recipientes separados las siguientes muestras:
Glicerina, Aceite comestible, Ácido palmítico, Mantequilla, Colesterol y Ácido esteárico.
- II.- Preparar 6 tubos de ensayo con cada uno de los siguientes reactivos:
Agua, Acetona, Etanol, Benceno y Cloroformo.
- III.- Realizar un cuadro anotando en la parte superior las muestras y en la columna izquierda los reactivos a utilizar
- IV.- Con un agitador agregar un poco de cada muestra a cada reactivo distinto hasta formar 25 combinaciones distintas.
- V.- Agitar cada tubo de ensayo y anote sus resultados.

RESULTADOS.

- Agua, polar = R (-)
Acetona, ligeramente no polar = R (+)
Etanol, polar = R (-)
Benceno, no polar = R (+)
Cloroformo, no polar = R (+)

FUNDAMENTO



Los lípidos son considerados ésteres de ácidos grasos y son relativamente solubles en agua y solubles en solventes no polares como cloroformo, benceno y éter; dada su afinidad.

“Lo igual disuelve a lo igual”

APLICACIÓN.



Esta técnica a pesar de ser muy general es muy útil en los laboratorios de nivel medio elemental ya que si se cuenta con los reactivos, esta resulta ser una práctica muy llamativa para los alumnos.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-CAMPOS. C. G. y DELGADO. B. N. L.; Manual de bioquímica Celular, México, FESC. C1- UNAM, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar por medio de una valoración el número de insaturaciones, ácidos grasos, hidroxilos, esteres que existen en una grasa o el yodo absorbido por la muestra; según sea el caso.

IMPORTANCIA.



En general, los índices aquí descritos nos proporcionan sobre las cantidades de ácidos grasos libres que existen en una grasa y que puede estar expuesta al enranciamiento bacteriano, midiendo el grado de enranciamiento hidrolítico.

Otros índices nos proporcionan datos sobre la longitud promedio de la cadena, y otros sobre el N° de insaturaciones en la cadena.

Cabe aclarar que se han ideado otro tipo de ensayos que nos sirven para medir la cantidad de ácidos grasos de cadena corta que existen en un en un triglicéridos, como en el caso del método de Reichert – Meissl y otro más, que es el índice de acetilo, el cual nos determina el número de grupos hidroxilos

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante resaltar que el valorante debe estar puro para evitar falsos datos, aunque las valoraciones puedan ser indirectas o directas, con blanco de referencia o sin blanco.

3.C.- DETECCIÓN DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS GENERALES DE UNA GRASA POR MEDIO DE SUS ÍNDICES

MÉTODO- TÉCNICA



I.-Montar un equipo para valorar una solución como se muestra en el esquema de la valoración de Kart Fisher

Práctica 1.F.

II.- Colocar un baso de precipitados de 100 ml bajo la bureta.

III.-Prepara una solución, diluyendo 1 ó 10 g de grasa en alcohol según sea el caso.

IV.- Neutralizar los ácidos grasos libres con KOH en medio alcohólico, usando fenolftaleina, Añadir un volumen de KOH conocido en medio alcohólico, refluja por 1 hr.

Seguir el procedimiento según la farmacopea, para el índice que se desee obtener. Método de Hanus o método de Wijs, para los índices de yodo.

V.-Llenar la bureta con reactivo de KOH hasta la marca de 50 ml y comenzar a valorar la mezcla, hasta obtener el punto de equilibrio indicado por el vire de color.

Calcular el contenido de KOH, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, HCl, NaOH; según sea el caso.

FUNDAMENTO



El Índice de Acidez = El N° de mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos en 1 g de grasa. Y también son los ml de Na OH 0.1 M, necesarios para neutralizar los ácidos grasos en 10 g de grasa.

El Índice de Saponificación = El N° de mg de KOH necesarios para saponificar los esteres en 1 g de grasa.

El Índice de Yodo = El N° de g de yodo absorbidos por 100g de grasa.

El Índice de Hidroxilos = El N° de mg de KOH equivalentes para neutralizar los OH presentes en 1g de grasa.

El Índice de Esteres = El N° de mg de KOH necesarios para saponificar los esteres presentes en 1g de grasa.

APLICACIÓN.



Aunque hoy en día existen técnicas más sofisticadas para la detección de grasas, aún no dejan de descartarse los índices, ya que nos dan una muy buena referencia del comportamiento físico químico de una grasa.

Hoy, en la actualidad, estas pruebas se siguen utilizando en los laboratorios de análisis experimental a nivel superior. Mientras que los **Índices de Reichert – Meissl** se utilizan en la industria ya que nos determinan los ácidos grasos de menos de 12 carbonos abundantes en los lácteos y el **Índice de Titer** nos ofrece información acerca del punto de congelación, muy importante en la intensidad de hidrogenación, valoración que reciben los aceites comerciales (ambos índices indicados en la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos).

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

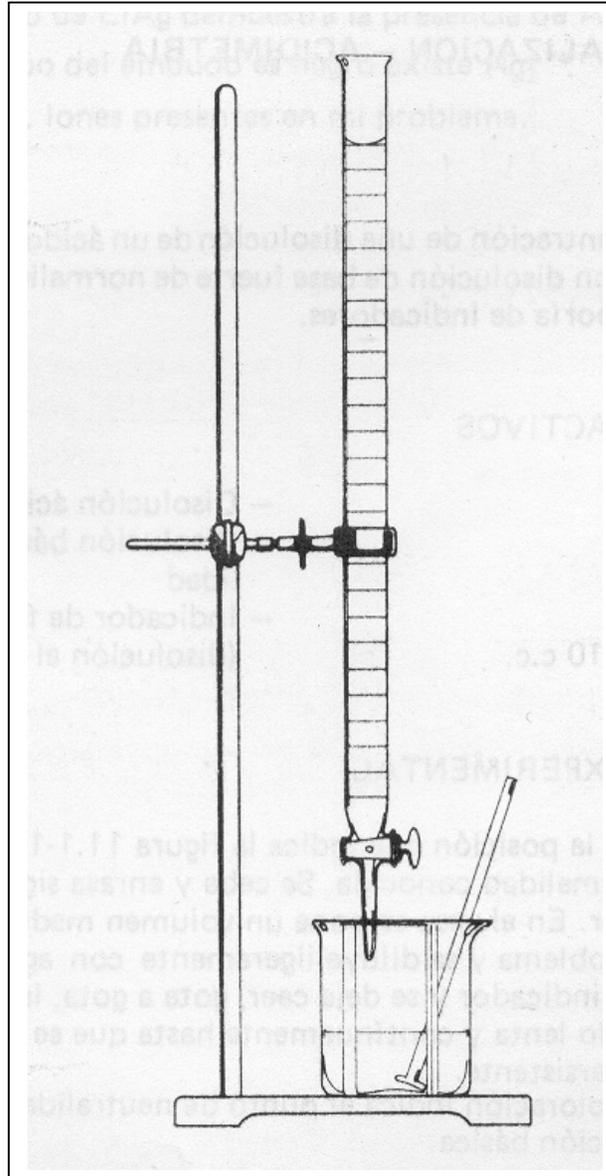
Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- DR. SOBERON A. Guillermo, DR. MARTUSCELLI. Q. Jaime. et. al. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª/e^d, México, SECRETARIA DE SALUD, 1988.

ESQUEMA 3 A



ANGELES. Esquema que nos muestra el montaje para una valoración en los índices de grasa

INTRODUCCIÓN



Los lípidos simples están formados por ácidos grasos y algún alcohol con el cual se esterifican. Los **acilglicéridos** o **grasa neutras** son aquellos ésteres resultantes de la unión entre trialcohol glicerol con 2 ó 3 moléculas de un ácido graso.

Se caracterizan por contar con un ácido carboxílico de cabeza y una cola hidrocarbonada que puede estar saturada o insaturada, lo que les da el carácter de grasas, aceites o ceras en condiciones ambientales.

Entre sus diversas propiedades físico-químicas presentan **isomerismo** Cis-Trans, polimorfismos en sus formas cristalinas, hidrólisis y fenómeno de oxidación.

Los ácidos grasos se pueden nombrar de 5 maneras, según el sistema que se use:

- 1) se pueden denominar de acuerdo al N° de átomos de carbono, sustituyendo la terminación "o" por "oico". Cuando la cadena carbonada tiene 2 grupos carboxílicos, el sufijo debe ser "dioico"
- 2) Cuando los ácidos carboxílicos se unen a otro grupo, el ácido graso, el carbono N° 1 es el adyacente al grupo carboxilo terminal, en cuyo caso también se puede denotar con la literales $\alpha, \beta, \gamma, \delta$, etcétera.
- 3) Se pueden denotar por 3 expresiones numéricas pares, separadas por 2 puntos en donde el primer N° nos indica el número de átomos de carbono y el segundo, el N° de dobles enlaces.
- 4) Otra forma es utilizar literales que representen a los ácidos grasos, por ejemplo, la letra P representa al ácido palmítico y la literal L representa al ácido linoléico.
- 5) Por último, se les puede connotar por su nombre común, como butírico, esteárico y linoléico.

3.1.- LÍPIDOS SIMPLES

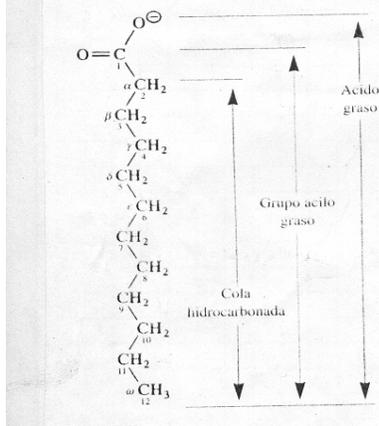
CITA TEXTUAL



Como enfrentarse a la celulitis.

No se trata de imponer cuerpos de atleta sin un gramo de grasa y capaces de soportar las estrecheces de una moda que marca cualquier imperfección. Se trata de conocer las causas de aparición de la celulitis, como prevenirla y que puede hacerse una vez que ha aparecido. Porque contrariamente a lo que muchos piensan, tener celulitis no es algo natural; ni siquiera en la mujer aunque genéticamente este más predispuesta a sufrirla. (2)

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Estructura básica que nos puntualiza la nomenclatura de los ácidos grasos, formado por un grupo carboxilo o ácido graso aunado a su larga cola hidrocarbonada (1).

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Qué grupo funcional reacciona con el Sulfuro III y IV?
- 2).- Defina qué es un lípido insaturado.
- 3).- Defina qué es un detergente.
- 4).- Defina qué es un índice.

COMENTARIOS



Los lípidos simples están compuestos principalmente por ésteres de ácido grasos y alcoholes, que a su vez derivan en: Grasas y Aceites. Ésteres de glicerol con ácido monocarboxílico. Ceras, Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.

La principal función de los triglicéridos consiste en actuar como reserva energética de en animales y plantas, ya que los triglicéridos son los lípidos que más frecuentemente están implicados en el almacenamiento de la energía, ya que producen más calorías por gramo que cualquier **carbohidrato** o **proteína**, por ejemplo un hombre normal de 70 Kg contiene más de 10 Kg de **triacilglicérols**, equivalentes a 100 000 Kcal, las necesarias para 2 meses de gasto en energía basal.

Tanto los ácidos grasos como los ésteres, que se encuentran en una proporción de un 99% en los lípidos de origen vegetal y animal, han sido clasificados como grasas y aceites, dependiendo del estado que presenten a temperatura ambiental.

Los lípidos regularmente se consumen en forma de quesos, mantequillas, grasa plastificantes; aceites de soja, algodón oliva, cacahuate, coco y nuez entre otros. Los triglicéridos constituyen aproximadamente el 98% de los lípidos del tejido adiposo de los mamíferos y el 30% del plasma y del hígado; y aproximadamente el 10% se encuentra en glóbulos rojos.

Los **glicéridos** de origen acuático contienen un alto número de ácidos insaturados y un bajo contenido de ácidos saturados.

FUENTES.



- 1).- MACARULLA. M. J; Biomoléculas lecciones de bioquímica estructural, Revete, 3ª/e, España, Pearson, 1993.
- 2).- G. ARIAS. Raquel, Como enfrentar a la celulitis, DISCOVERY SALUD, N° 18 Julio 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar los ésteres de ácidos carboxílicos mediante una reacción básica en medio alcohólico.



IMPORTANCIA.

Los varios tipos de ceras están formados predominantemente de ácidos carboxílicos monobásicos superiores con alcoholes monovalentes superiores y pueden detectarse mediante esta prueba, la cual es muy sensible.

Cuando el sodio metálico se pone en contacto con la solución bencénica o etérea de un éster, que también contenga 1,2-dinitrobenzoceno, casi inmediatamente aparece un producto rojo. Posiblemente, aquí haya producción directa de la sal anhidra de la forma "aci" del nitrosnitrobenzoceno.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante considerar que el ácido hidroxámico liberado por la acidificación colorida con cloruro férrico. Mientras, las **lactonas**, se pueden considerar como ésteres internos ya que reaccionan de manera muy semejante a los ésteres.

3.1.A.- DETECCIÓN DE ÉSTERES DE ÁCIDOS CARBOXÍlicos EN GRASAS Y CERAS

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Agregar una solución etérea del éster a tratar en un micro crisol de porcelana y en seguida agregar una gota de solución saturada de clorhidrato de hidroxilamina en alcohol, más una micro gota de potasa cáustica en alcohol.

II.- Calentar la mezcla en una micro flama hasta que ocurra un ligero burbujeo. Después de enfriar, acidificar con ácido clorhídrico 0.5 N agregar una gota de solución de cloruro férrico al 1% .

Presencia del éster R = (+) Color violeta intenso.

III.- Otra prueba rápida y sensible para las grasas, los aceites y las ceras, se puede realizar mediante la producción de amoniaco como sigue.

Poner una pequeña parte de la muestra a calentar en un tubo de ensayo con una temperatura que oscile entre 130°C- 160°C con unas gotas de Biuret y dejar calentar hasta fase gaseosa. Para detectar el color poner en contacto un indicador ácido base o un papel mojado previamente con reactivo de Nessler.

Cera de abeja = Violeta pardo

Cera de candelilla = Lila

Bálsamo de Tolú = Pardo verdoso

Copal de congo = Pardo

Cera de carnauba = Pardo Violeta oscuro

Cera de montana = Verde amarillento

Brea = Pardo verdoso

"Soromina" (éster sintético) = Violeta

FUNDAMENTO



Cuando se lleva a cabo una reacción de **amono lisis**, las amidas de los respectivos ácidos grasos se forman liberando glicerol o alcoholes monovalentes superiores, dichos alcoholes se condensan con el Biuret produciendo uretanos y, por lo tanto, amoniaco.

Los éteres de los ácidos carboxílicos se pueden convertir en sale de álcalis de los ácidos hidroxámicos por tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina y un hidróxido.

APLICACIÓN.



En los procedimientos de química legal esta técnica es muy valiosa ya que se trabaja con el mínimo de muestras y la identificación es de alta sensibilidad.

Mientras que en los laboratorios de medio superior y superior resulta ser una práctica muy ilustrativa y de corto tiempo.

CLASIFICACIÓN.

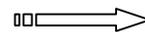
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7ª/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Detectar la presencia de esteres de ácidos carboxílicos mediante una reacción que las convierta en sales álcalis, al tratarse con clorhidrato de hidroxilamina y un hidróxido.

IMPORTANCIA.



La importancia que presenta esta prueba es, indudablemente el gasto mínimo de reactivo y el corto tiempo de realización de tal manera que, teniendo los reactivos necesarios se puede adaptar muy bien a cualquier circunstancia.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se cuidaran las condiciones de la flama ya que esta puede consumir rápidamente el reactivo, también se deberá cuidar la aparición del vire de color.

3.1.B.- DETECCIÓN DE LOS ÉSTERES DE LOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (GRUPO FUNCIONAL DE LAS GRASAS)

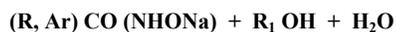
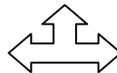
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Agregar una gota de solución del éster en prueba a un crisol limpio.
- II.- En seguida, añadir una gota de solución alcohólica saturada de clorhidrato de hidroxilamina y a continuación poner una micro gota de solución alcohólica de potasa cáustica.
- III.- Calentar la mezcla en una micro flama hasta que aparezca un ligero burbujeo.
- IV.- Después de enfriar se acidifica la mezcla con ácido clorhídrico 0.5 N y luego Agregar una gota de solución de cloruro férrico al 1% hasta que aparezca un vire de color.

Presencia de esteres R = (+) Color violeta variable.

FUNDAMENTO



El ácido hidroxámico liberado por la acidificación se puede identificar con una reacción colorida con cloruro férrico. Mientras que las lactonas, que se consideran como esteres internos, reaccionan muy semejantes a los esteres normales.

APLICACIÓN.



La aplicación que presenta esta práctica es relevante dado que podemos adaptarla muy bien a los laboratorios escolares, siempre y cuando se tomen en consideración las condiciones necesarias.

Muy bien se puede adaptar a nivel medio superior y superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7ª/e^d, México – UNAM, Manual Moderno, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar por medio de una reacción colorimétrica, la presencia de lípidos (ácidos grasos y grasas neutras), usando una prueba cualitativa.

Evidenciar la prueba de Sudan en un medio de etanol en donde la reacción es más afin entre las grasas y el rojo escarlata dado que es un colorante débilmente ácido, permitiendo que la reacción sea rápida.



IMPORTANCIA.

Sus ventajas son variadas, entre estas tenemos su corta realización, su sencillez, su sensibilidad y además se pueden usar muestras biológicas fáciles de conseguir y a un bajo costo.

Tanto el sudan III como el sudan IV son colorantes selectivos para determinar grasas en células, tiñendo los núcleos de color azul, el citoplasma verde brillante y los eritrocitos verdes; mientras que las grasas individuales las tiñe de naranja o rojo.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se debe revisar la caducidad del reactivo y procurar que los tubos de ensayo estén bien limpios y secos.

En caso de tener contacto con las manos se recomienda lavarse con etanol.

3.1.C.- PRUEBA DE SUDAN III Y IV

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Preparar 5 tubos de ensayo etiquetados según la muestra que se va a agregar:

II.- Agregar 3ml de agua destilada a cada tubo.

III.- Agregar a cada tubo de ensayo una pequeña muestra de leche, mantequilla, jugo, Chocolate sólido, aceite vegetal.

IV.- Agregar 20 gotas de ácido oléico.

V.- Agregar 1 gota de 1 reactivo de SUDAN III Ó IV a cada tubo.

VI.- Mezclar y agitar durante 1' min. Cada tubo.

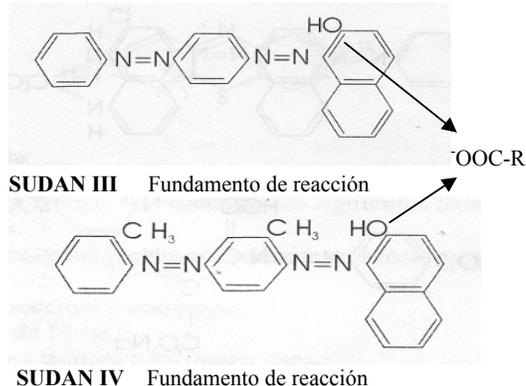
Color del reactivo = rojo

Ácidos grasos R = (+) Rosa – Rojo

Grasas Neutras R = (+) Negro

Las grasas son afines a los colorante SUDAN III y SUDAN IV, realizando un ataque directo del grupo hidroxilo del indicador al grupo carbonilo de las grasas, dando como resultado la formación de un éster

FUNDAMENTO



APLICACIÓN.



Es colorante de elección para determinar grasas en las prácticas de biología para diferenciar tejidos.

Es una técnica muy socorrida en los laboratorios escolares desde el nivel medio básico hasta el nivel superior en las áreas biológicas y de ciencias de la salud.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-CAMPOS. C. G. y DELGADO. B. N. L.; Manual de bioquímica Celular, México, FESC. C1- UNAM, 1993.

2.-GARRIDO. F. German. et. al. Manual de Colorantes para laboratorios de Ciencia Básica, México, UNAM – FESC, 2003

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la presencia de esteres mixtos naturales a partir de aceite de coco.

Generalmente un aceite o grasa proporciona una mezcla de 4 ó más ácidos grasos, en algunos casos es posible que se separaren forma de sus esteres metílicos o como complejos de urea y glicerina.

Se conocen algunas grasas y aceites en los que predomina un ácido graso o una amina, por lo que se utilizan como una fuente para obtener fijadores en perfumería.



IMPORTANCIA.

Esta prueba a pesar de no presentar muchas ventajas, nos muestra como se separan algunos esteres metílicos para formar jabonaduras.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se debe cuidar el manejo de HCl y KOH por los alumnos ya que dichas sustancias son muy corrosivas e irritantes para piel y ojos

3.1.D.- SAPONIFICACIÓN DE UNA GRASA: OBTENCIÓN DE ÁCIDO PALMITICO (LÁURICO - MIRÍSTICO) Y SUS ÉSTERES (I)

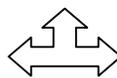
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Preparar un baño maría y colocar en su interior un vaso de precipitados de 1000 ml.
- II.- En otro vaso de precipitados de 250ml, disolver 26 g de hidróxido de potasio en 26 ml de agua.
- III.- Agregar en el primer vaso, 30 g. de aceite de coco, agitar constantemente y agregar poco a poco la solución de hidróxido de potasio previamente disuelta.
- IV.- Terminada la adición continuar calentando en baño maría y agitar durante 50 minutos, en seguida, añadir 500 ml de agua hirviendo, agitar bien.
- V.- *Separar 30 ml. de esta solución*
- VI.- A la solución que quedó, añadir lentamente 80ml de ácido clorhídrico concentrado y continuar calentando hasta que flote una masa aceitosa de color café.
- VII.- Enfriar la suspensión, separar la masa y secarla entre 2 hojas de papel filtro.
- VIII.- Por último fundir la masa en una cápsula de porcelana y decantar para separar el residuo de agua que haya quedado atrapado.

Etiquetar un frasco con tapa y verter la mezcla de ácidos grasos en su interior, aplicar una prueba colorimétrica para identificar la presencia de grasas.

FUNDAMENTO

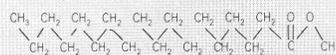
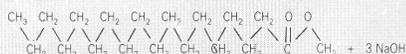
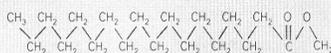


Reacción de saponificación de una grasa para obtener un jabón

Química del jabón

Según hemos dicho, al reaccionar una grasa con una base (reacción

de saponificación) se obtiene jabón y glicerina: grasa + álcali → jabón + glicerina. Así por ejemplo:



APLICACIÓN.



En la segunda mitad del siglo XIX diversos factores, sobre todo económicos, científicos y técnicos produjeron el desarrollo del los jabones y detergentes. El proceso industrial difiere un poco del casero, ya que las cenizas se substituyen por hidróxido de potasa o de sodio. Su combinación con diferentes grasas como cebo, aceite de olivo o aceite de coco, producen diferentes tipos de jabones a los que se les añade perfumes, colorantes, emolientes y desinfectantes.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- DOMÍNGUEZ. Xorge A. Experimentos de química orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.- BARRAL. T. Adela. et. al. ¿Eso es química?, México, biblioteca de recursos didácticos, Alambra, 1988.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la presencia de sales de ácidos grasos.

A las sales de un ácido graso, se le llaman jabones.

A las sales de ácidos grasos que contienen sodio y potasio, se les llaman detergentes.

Y a las sales de metales pesados se les conoce como lubricantes.

IMPORTANCIA.



Es sabido que los goteros producen gotas esféricas con soluciones jabonosas, todo esto se debe a un estado de tensión en la superficie libre de los líquidos. Este fenómeno es bien aprovechado en el presente experimento para valorar de manera cualitativa la cantidad de sales de un ácido graso en una solución acuosa a través de la observación.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se debe cuidar que la solución de cloruro de calcio este preparada previamente y al porcentaje que se pide, antes de iniciar la práctica.

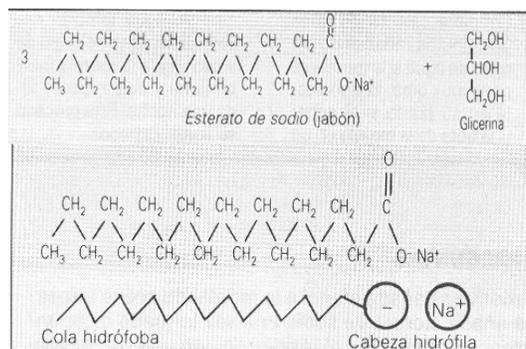
3.1.E.- SAPONIFICACIÓN DE UNA GRASA: OBTENCIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO (LÁURICO - MIRÍSTICO) Y SUS ÉSTERES (II)

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- *De la solución previamente preparada, divídala en 3 tubos de ensaye con 10 ml cada uno.
- II.- Al primer tubo añadir 10 gramos de sal fina (casera), y observar la separación de un jabón por efecto del "salado"
- III.- Al segundo tubo taponarlo y agitarlo durante 2' min., dejarlo reposar y anotar el que tarda en desaparecer la espuma.
- IV.- Al tercer tubo añadir 5 ml. de una solución de cloruro de calcio al 10%. Agitar la mezcla y observar si se forma espuma. Continuar agregando cloruro de calcio en solución hasta que no se observe más espuma.
- V.- Haga una solución al 2% de cualquier detergente comercial, separe en 2 tubos de ensaye y repetir los experimentos II y III.

FUNDAMENTO



Saponificación y subproductos de reacción de un detergente.

APLICACIÓN.



La preparación de jabón es una de las más antiguas reacciones químicas de las que se tiene noticia, fue conocida por Griegos y Romanos. Hoy en, día existen diversidad de marcas y presentaciones muy elaboradas en la industria de la limpieza.

Mientras que en los laboratorios resulta ser una de las prácticas más ilustrativas.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- DOMÍNGUEZ. Xorge A. Experimentos de química orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.- BARRAL. T. Adela. et. al. ¿Eso es química?, México, biblioteca de recursos didácticos, Alambra, 1988.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener por medio de calentamiento enantaldehído y ácido undecílico a partir de aceite de ricino, mediante una técnica conocida como **pirólisis**

IMPORTANCIA.



Solo cuando algunos compuestos orgánicos (aceites), se someten a temperaturas elevadas, ya sea en presencia o en ausencia de catalizadores, es posible obtener la ruptura de cadenas carbonadas largas a estructuras más simples.

¡NOTA IMPORTANTE!



Podemos notar que el destilado empezado cuando se desprendan vapores blanquecinos.

Una vez obtenidos los ml deseados, se suspende la destilación para evitar que se endurezca la resina amarilla.

El calentamiento debe hacerse rápido para obtener buenos rendimientos.

3.1.F.- PIRÓLISIS O CRACKING DEL ACEITE DE RICINO

MÉTODO- TÉCNICA



I.-Montar un equipo de destilación como el que se muestra en el esquema con un matraz para destilado de 250ml, un matraz Kitazato de 500 ml, un refrigerante, un embudo de pera y 2 soportes universales.

II.-Colocar en el matraz para destilado 75 g de aceite de ricino comercial más 6g de brea (colofonio) y tapar con un corcho bioradado.

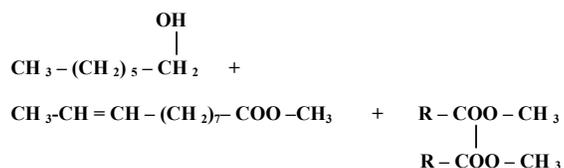
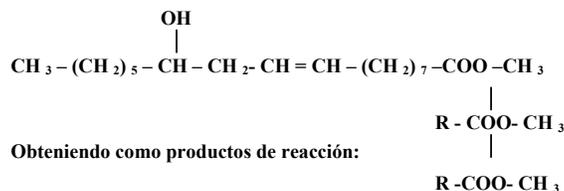
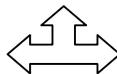
En un orificio, colocar un termómetro (0- 360° C) y en el otro orificio colocar el embudo de separación de tallo largo (embudo de pera) para reducir la presión del sistema por medio de una trompa de agua.

III.- Calentar de 5'- 7'min.

Durante este tiempo recoger de 80- 100ml del destilado.

Simultáneamente hay que agregar otros 75g de aceite de ricino al embudo de separación

FUNDAMENTO



Reacción de pirólisis con sus subproductos.

APLICACIÓN.



Esta práctica en su tiempo fue muy socorrida, cuando se realizaba este tipo de pirólisis con el aceite de ricino, se obtenía enantaldehído y ácido undecilénico a, este último muy socorrido como principio activo en algunas micosis del cuero cabelludo.

CLASIFICACIÓN.

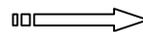
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

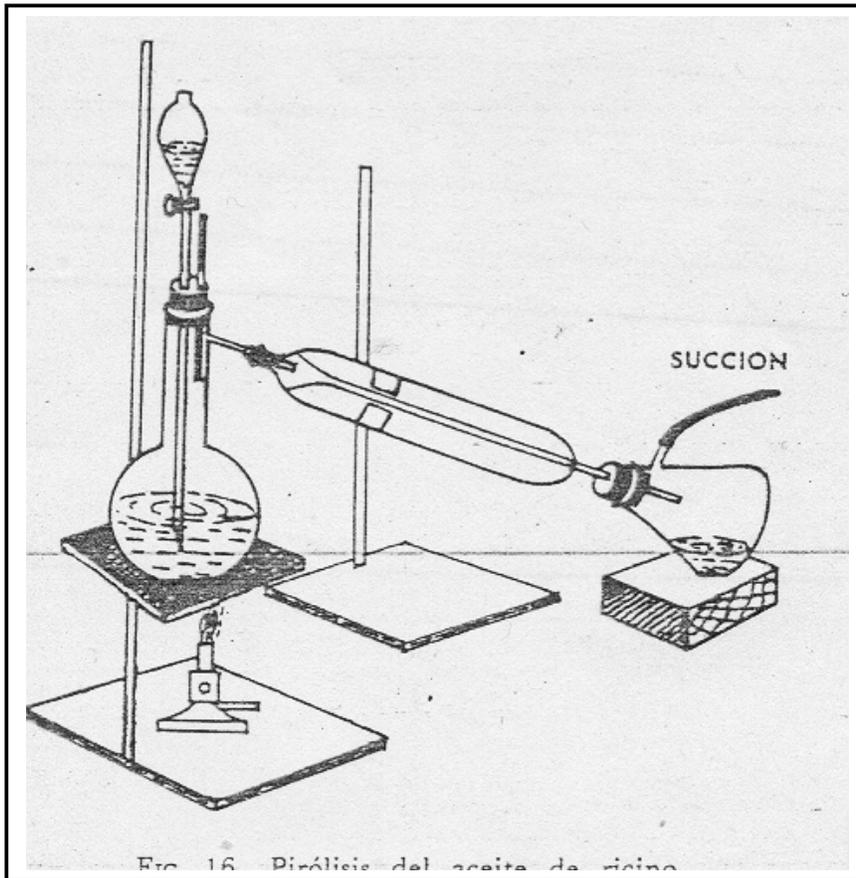
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- DOMÍNGUEZ. Xorge A. Experimentos de química orgánica, 5ª/e^d, México, limusa, 1984.

ESQUEMA 3 B



DOMINGUEZ. 35. Equipo de destilación para una pirólisis del aceite de ricino

¿PARA QUÉ SIRVE?



Detectar la presencia de glicerol mediante su transformación en acroleína.



IMPORTANCIA.

Cuando el glicerol se calienta con agente deshidratante como el bisulfato de potasio, el glicerol se transforma en un aldehído insaturado llamado acroleína, el cual presenta nuevas propiedades fisicoquímicas.

El límite de identificación es de mucha sensibilidad ya que identifica hasta 5 microgramos de glicerol.

3.1.G.- DETECCIÓN DEL GLICEROL MEDIANTE LA CONVERSIÓN EN ACROLEINA

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Colocar un tubo de ensayo largo y resistente a los cambios de temperatura en un agujero redondo de una placa de asbesto (que se emplea cuando se requiere de altas temperaturas o de incineración para liberar un gas). El cubrir el extremo abierto del tubo con una pieza de papel reactivo y se mantener en posición con un casquete de vidrio.

II.- Colocar una pequeña muestra de glicerol y enseguida mezclar con un poco de bisulfato de potasio finamente pulverizado.

III.- Colocar en el extremo abierto del tubo un trozo de papel filtro humedecido con el reactivo 1 (previamente preparado) y cubrir con la tapa de vidrio.

IV.- La acroleína producida en el calentamiento colorea el papel de un “azul intenso” Cuando se trata con hidróxido de sodio 2N, el área azul cambia a “color durazno”

V.- Si se procede a agregar el reactivo 2 se forma una mancha amarilla o pardo rojiza en el papel.

Reactivo 1.- Mezcle una gota de nitroprusiato de sodio al 5% con una gota de piperidina o morfina al 20%.

Reactivo 2.- Prepare una solución de O-Dianisidina en ácido acético glacial.

¡NOTA IMPORTANTE!

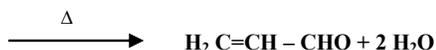


Se debe cuidar que el material este perfectamente limpio y seco, además se deberá tener mucho cuidado para no contaminar los reactivos 1 y 2.

También se procurará no tener contacto con el Nitroprusiato de Sodio, la O- Dianisidina y el Ac. Acético glacial ya que resultan tóxicos para piel y ojos.

El procedimiento aquí mencionado, hace uso de la volatilidad de la acroleína y de sus reacciones de color y no puede emplearse en presencia de etilenglicol o de ácido láctico, ya que estos se descomponen en las condiciones antes descritas dándonos acetaldehído con las mismas reacciones de color y en consecuencia un falso (+).

FUNDAMENTO



Cuando se calienta el glicerol con un agente deshidratante como el bisulfato de potasio, el glicerol produce acroleína que es un aldehído insaturado.

APLICACIÓN.



En los procedimientos de química legal esta técnica es muy valiosa ya que se trabaja con el mínimo de muestras y la identificación es de alta sensibilidad.

Mientras que en los laboratorios de medio superior y superior resulta ser una práctica muy ilustrativa y de corto tiempo.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de ácido esteárico o de ácido palmítico mediante una reacción de coloración con rodamina B y vaselina o parafina, o ambas.

IMPORTANCIA.



Se considera una prueba rápida para los ácidos grasos superiores tanto en parafina, vaselina o similares.

Si una solución neutra de uranilo se agita con una solución saturada incolora de rodamina B en benceno, la capa bencénica se vuelve roja y fluoresce de color naranja en presencia de luz ultra violeta si están presentes los ácidos carboxílicos solubles en el benceno.

¡NOTA IMPORTANTE!



¡Cuidado!, tanto la cera de parafina pura como la vaselina no deben contener mezclados ácidos grasos superiores y con punto de fusión bajos; aunque estos pueden estar presentes debido a los aceites y grasas saponificadas, en algunos casos.

3.1.H.- DETECCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS SUPERIORES EN PARAFINA Y VASELINA

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- En un micro tubo de ensayo colocar una gota de solución bencénica con la muestra y enseguida agregar una gota de solución saturada de rodamina B en benceno.
- II.- Mezclar tratar con 1 ó 2 gotas de una solución acuosa al 1% de nitrato de uranilo o de acetato de uranilo.
- III.- Agitar la mezcla y si los ácidos grasos están presentes, la capa bencénica se vuelve roja o rosada dependiendo de la cantidad del ácidos grasos.
- V.- Si cuenta con una lámpara de luz ultravioleta y la muestra se expone a esta luz, la capa bencénica presenta una fluorescencia anaranjada.
- VI.- En caso de presentarse una emulsión, la capa de benceno y agua se separa mediante un centrifugado, este procedimiento revela una cantidad aproximada de 5 microgramos de ácido palmítico o bien de ácido esteárico.

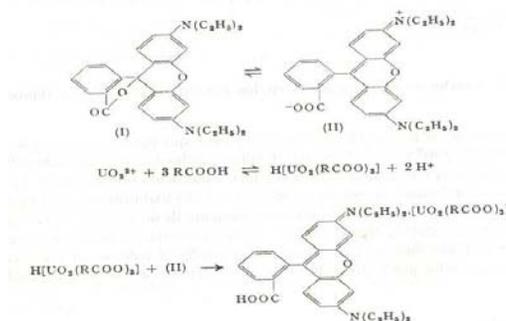
Presencia de ácido esteárico o ácido palmítico R (+) = Rojo o rosado.

En presencia de Luz Ultravioleta R (+) = Naranja fluorescente.

FUNDAMENTO



Reacción de fluorescencia con ác. Esteárico y ácido Palmítico.



APLICACIÓN.



En los procedimientos de química legal esta técnica es muy valiosa ya que se trabaja con el mínimo de muestras y la identificación es de alta sensibilidad.

Mientras que en los laboratorios de medio superior y superior resulta ser una práctica muy ilustrativa y de corto tiempo.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978

INTRODUCCIÓN



Los lípidos compuestos son considerados lípidos simples conjugados, unidas a moléculas no lipídicas entre los cuales encontramos:

Fosfolípidos.-Son esteres que contienen ácido fosfórico en lugar de un ácido graso, combinado con una base nitrogenada.

Glicolípidos.-Son compuestos de Carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrosidos.

Lipoproteínas.-son combinaciones que se dan entre lípidos y proteínas.

Muchos de los lípidos complejos que se encuentran en la naturaleza contienen fósforo en su estructura, estando soportados por un esqueleto de glicerina (fosfoglicéridos) o de esfingosina (esfingolípidos), estos son considerados lípidos más polares que los glicéridos simples por tener algunos componentes hidrofílicos, diferente a los fosfoglicéridos que por el contrario se distinguen por tener una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, muy bien diferenciadas. Además de este carácter anfipático, en la parte polar puede coexistir la carga eléctrica negativa del fosfórico y la carga positiva de un amonio total o parcial, constituyendo un ión eléctrico mixto o “**zwitterion**”.

Los fosfoglicéridos naturales son ópticamente activos y, salvo unos cuantos, se ha encontrado que todos pertenecen a la misma serie **enantiomérica**. Cuando se utiliza el sistema de Cahn- Ingold- Prelog para determinar la configuración, existe una confusión semejante en el siguiente aspecto; los fosfoglicéridos naturales poseen una configuración R en el carbono -2 de la glicerina, mientras que los diglicéridos obtenidos a partir de estos mismos, por una defosforilación tienen una configuración S, contrariamente a lo esperado.

PIE DE FOTO.



Estructura de un fosfolípido que nos muestra las cargas parciales, así como sus respectivos grupos nitro y fósforo (1).

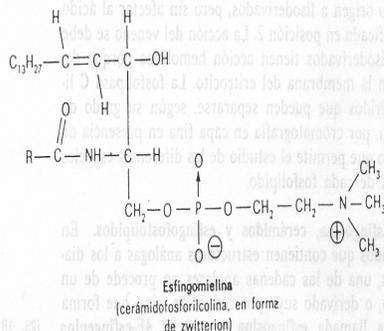
3.2.- LÍPIDOS COMPUESTOS

CITA TEXTUAL



Las investigaciones realizadas para determinar el lugar en el que la célula produce su síntesis de lípidos, mediante el estudio de tejidos in vitro, indican que el hígado y el intestino son los centros más activos en la síntesis de fosfoglicéridos. Usando técnicas de marcaje, se ha demostrado que casi todas las células tienen la capacidad de sintetizar dicho compuesto, excepto los glóbulos rojos. Pareciera como si cada tejido fuese una factoría de creación de fosfolípidos, que recibe del plasma las unidades estructurales (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿A que se le llama Rf en una cromatografía?
- 2).- ¿Qué cuidados personales se deben tener en una reacción de Liebermann -Buchard y Salkowski?
- 3).- ¿Cuál es la importancia de los fosfoglicéridos en el metabolismo?

FUENTES.



- 1).-MACARULLA. M. J; Biomoléculas lecciones de bioquímica estructural, Reverte, 3ª/eª, España, Pearson, 1993.
- 2).-DURAN .M. / FAVART. P; La célula – estructura y anatomía molecular, Omega, España, 1978.

COMENTARIOS



A pesar de la actual acertividad que existe, acerca de las membranas biológicas, se han creado algunos modelos virtuales que explican mejor la estructura de la membrana celular. El estudio combinado con los análisis químicos derivados a partir de homogenizados celulares y aunado a las investigaciones citológicas en microscopio electrónico, ayudan a comprender mejor el funcionamiento y sus mecanismos.

Algunas funciones importantes son: la regulación de contracciones, la asimilación de nutrientes y la excreción de desechos metabólicos en la célula. Los fosfolípidos naturales, tales como los existentes en las mitocondrias, contienen restos de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que a temperaturas ambientales se les encuentra en fase líquido – cristalina, es decir, están fundidas en un estado muy fluido.

Actualmente se sabe que algunos grupos polares de los fosfoglicéridos pueden interaccionar fuertemente con iones metálicos como Ca^{++} , y Mg^{++} , adoptando en el agua una configuración líquido – cristalina característica; mientras que ciertos grupos polares pueden estar relacionados con el transporte iónico de Na^+ y de K^+ , siendo esta última mas alta en el interior de la célula (regulando la bomba sodio – potasio).

Al existir un desequilibrio en la regulación de sodio y potasio, esta se manifiesta como una “perdida parcial o total de la fuerza muscular”, que en realidad es una perdida de comunicación sináptica en las terminaciones nerviosas que controlan la relajación y contracción del sistema nervioso.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Detectar la presencia de colesterol mediante 2 reacciones cuantitativas

Lieberman - Buchard y Salkowski.

IMPORTANCIA.



La importancia de esta prueba radica en su prontitud y su sencillez para llevarla a cabo.

Además se pueden usar muestras alimenticias, muestras biológicas tratadas y algunos fármacos que presenten estas características y que además no presenten alguna interferencia. Dadas las características anteriores, resulta muy útil desde el nivel medio superior y el nivel superior, mientras que en el nivel básico se recomienda que solo sea demostrativa por su riesgo.

La coloración que se obtiene en esta reacción se debe prácticamente al movimiento de electrones que hay dentro de los anillos aromáticos, sobre todo donde existen enlaces conjugados.

¡NOTA IMPORTANTE!



¡Cuidado! los tubos de ensayo a utilizar deberán estar perfectamente secos y libres de contaminación ya que se puede proyectar la reacción o el tubo puede estallar.

Por otro lado se deberá tener cuidado al trabajar con el anhídrido acético y el ácido, ya que pueden dañar la piel y los ojos con el contacto directo.

3.2.A.- REACCIÓN DEL COLESTEROL POR LIEBERMAN-BUCHARD Y SALKOWSKI

MÉTODO- TÉCNICA



REACCIÓN DE LIEBERMAN Y BUCHARD

I.- Tomar un tubo de ensayo de 10 ml agregar 1 ml de una solución de colesterol al 1 % en cloroformo.

II.- Enseguida agregar 2 ml de anhídrido acético más 0.2 ml de ácido sulfúrico concentrado, mezclar correctamente hasta la aparición de un color violeta que cambia de color.

R = (+) Verde Esmeralda

REACCIÓN DE SALKOWSKI

I.- Tomar un tubo de ensayo de 10 ml y agregar 1 ml de una solución de colesterol al 1 % en cloroformo.

II.- Enseguida se añaden 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y mezclar cuidadosamente, esperar el viraje de color.

La fase clorofórmica adquiere un tono rojo mientras que la fase sulfúrica es amarilla con fluorescencia verde.

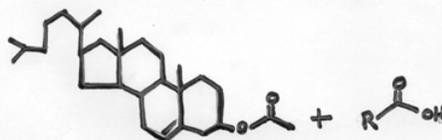
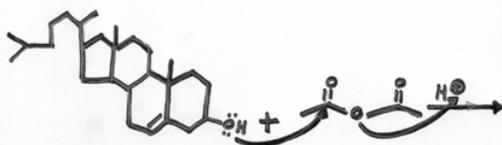
Otras moléculas de la familia de los esteroides difieren en color en cuanto a esta prueba.

R = (+) Rojo

FUNDAMENTO



- 1.- Reacción de Lieberman
- 2.- reacción de Buchard



APLICACIÓN.



Es importante mencionar que la **reacción de Lieberman - Buchard**, también puede realizarse de forma cuantitativa. Si se construye una curva patrón a diferentes concentraciones de colesterol con distintas intensidades de color. Con esta propiedad se puede proceder a leer en un espectro para su cuantificación.

Y por esta razón se puede apropiarse muy bien a los laboratorios del nivel superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- MACARULLA, M. J. y GONI, M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Evidenciar la presencia de diferentes fosfolípidos mediante una técnica cromatográfica en placa de sílica gel a partir de sus Rf y evaluar la placa con el método de cromatografía bidimensional.



IMPORTANCIA.

Con lo que respecta al método de cromatografía bidimensional, a diferencia de los métodos convencionales, después de haber realizado la primera cromatografía en una dirección (con cloroformo/metanol); se seca el papel o placa y se repite el proceso (con una mezcla de cloroformo/metanol/ácido acético/agua), solo que esta vez en ángulo recto con referencia a la dirección original del flujo, de esta forma las sustancias no separadas en el primer disolvente, se separan en el segundo. Además, otra variante son los reveladores que se utilizan como el molibdeno, ninhidrina y bismuto.

¡NOTA IMPORTANTE!



La desventaja que presenta es que al revelarse con yodo, la lectura de Rf debe ser rápida, ya que el revelado no es permanente.

3.2.B.- EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE FOSFOLÍPIDOS

MÉTODO- TÉCNICA



I.-Tomar el tejido del que se van a extraer los fosfolípidos y homogenizar en un mortero con una mezcla de cloroformo – metanol – ácido clorhídrico al 200: 100: 1. Al realizar la homogenización añadir un volumen doble de ácido clorhídrico al 0.1 M.

II.-Después de terminar el homogenado filtrar la mezcla y centrifugar a 2500 – 3000 rpm de 10 -15' min. para obtener los fosfolípidos.

III.-Del centrifugado se debe obtener la fase inferior (cloroformo / fosfolípidos) y evaporar hasta obtener solamente un volumen pequeño.

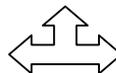
IV.-Aplicar el volumen obtenido con la ayuda de un capilar (de 3 – 5 puntos), en la parte baja de la placa cromatográfica de sílica gel “G”.

V.-Montar la placa en una cámara saturada con una mezcla cloroformo – metanol – agua, al 65: 25: 4 . Donde la solución llegue a la parte baja de la placa.

Cuando la mezcla (la fase móvil) alcanza el borde superior, la placa (la fase estacionaria) Se debe sacar, se seca bien y se expone a vapores de yodo para obtener el revelado.

VI.-Observar la serie de manchas que aparecen en la placa y comparar por bibliografía los Rf (Relación de frentes) que aparecen de lisoderivados, Fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, lípidos neutros y fosfatidil inositol + fosfatidil colina.

FUNDAMENTO



Al igual que en una cromatografía de columna un soluto más polar está más atraído por un adsorbente que un soluto menos polar. De esta manera los compuestos como los alcoholes, los ácidos carboxílicos y las aminas son atraídos con más fuerza que los hidrocarburos o los compuestos halogenados. También la polaridad del disolvente influye en la velocidad a la que asciende el soluto por la capa del adsorbente. Para un soluto y un adsorbente dados el cambio de un disolvente menos polar a uno más polar llega a producir una atracción mayor del disolvente por el soluto y en consecuencia se desplazará con mayor velocidad.

APLICACIÓN.



Su aplicación es muy variable en los niveles medios superior y superior, ya que la interpretación y manejo de información no es del todo sencilla para los niveles básicos, por esta razón se recomienda realizar las prácticas de manera cualitativa y / o demostrativa

CLASIFICACIÓN.

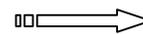
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

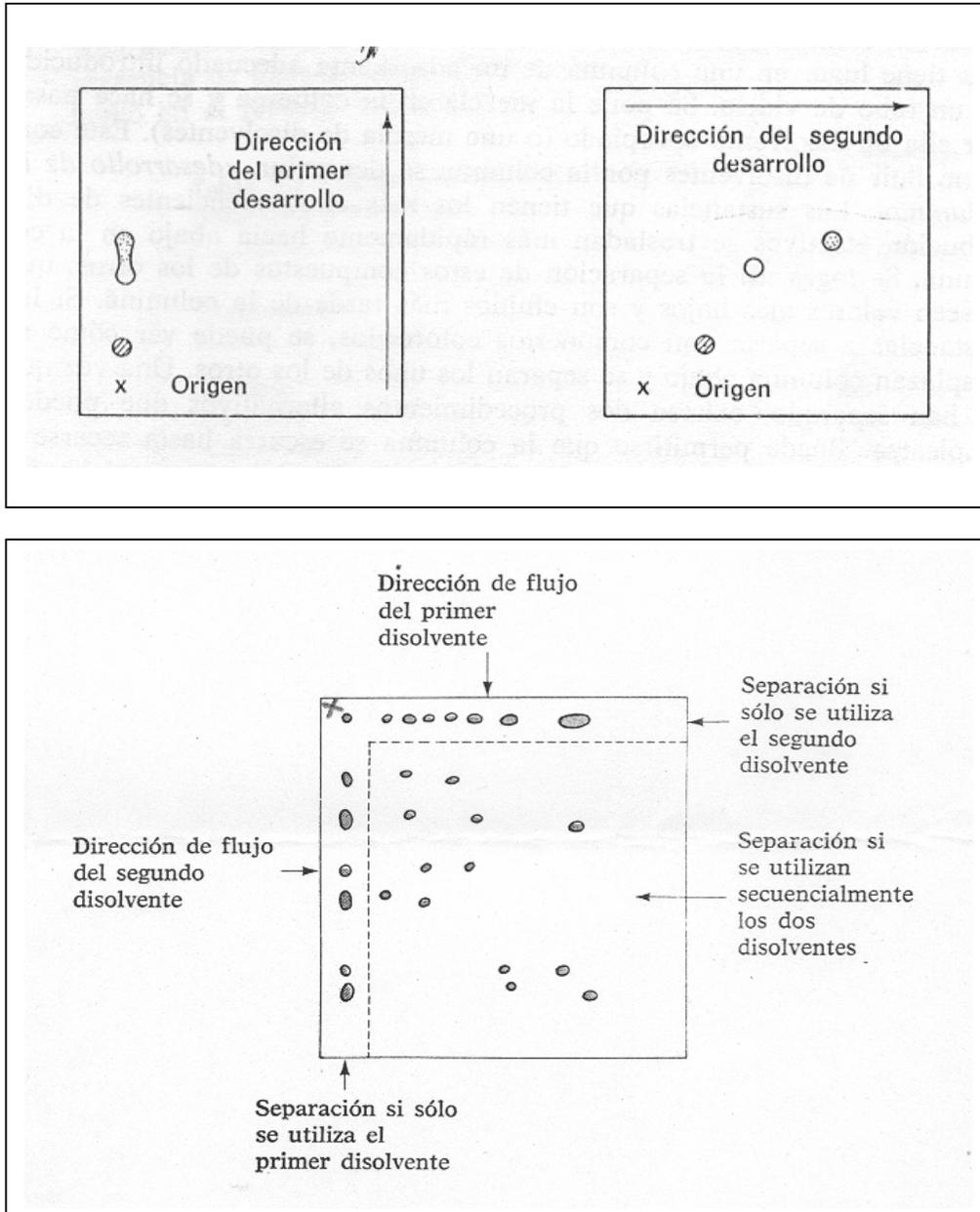
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

ESQUEMA 3 C



FREIFELDER. Cromatografía Bidimensional de Fosfolípidos. En la cromatografía bidimensional se debe de tomar en cuenta que una vez marcado el punto de origen con la "X", ésta correrá en forma diagonal hacia la contra esquina, por ésta razón es muy importante marcar bien el punto de partida (superior izquierdo o inferior izquierdo). Esta cromatografía es muy útil cuando se trabajan mezclas de disolventes en distintas proporciones, y lo mismo sirve para identificar fosfolípidos, mezclas de aminoácidos y mezclas de nucleótidos.

INTRODUCCIÓN



Los lípidos asociados o derivados son considerados como un grupo heterogéneo, pero que aún así se comportan como lípidos, entre estos se encuentran:

Los pigmentos, las vitaminas liposolubles, los esteroides, los hidrocarburos y en ocasiones entran los ácidos grasos.

Los pigmentos y las vitaminas son **fitoquímicos** derivados de lípidos que se encuentran regularmente en un **organelo** celular llamado vacuola celular

Comúnmente los esteroides están formados por 4 anillos de 6 carbonos unidos entre sí, con grupos funcionales adicionados. También se les conoce como derivados del ciclopentano perhidrofenantreno.

Cabe mencionar que estos no son todos los lípidos derivados que intervienen en el metabolismo, ya que existen otros como los lípidos pirrólicos (hemoglobina), que se encuentra en la sangre en los animales.

Por lo que respecta a los hidrocarburos son mejor conocidos como derivados del petróleo u oleoductos.

Estos últimos representan una parte sustancial en la economía de un país, ya que su déficit influye determinadamente en el fondo interno bruto de una nación.

Muchos energéticos y derivados del "oro negro" como los polivinilos, polietilenos o poliésteres son quienes; determinan la inclinación diaria de la bolsa de valores en el mercado libre.

Existe un gran número de análisis para evaluar las características fisicoquímicas de las grasas, sin embargo los tradicionalmente empleados en los laboratorios químicos, ofrecen gran información sobre su naturaleza, comportamiento y origen; como por ejemplo su solubilidad en solventes polares no polares, si son saturados o insaturados y su efectiva reacción ante sales inorgánicas como el KOH, NaOH y I_2 principalmente.

PIE DE FOTO.



Representación de 2 estructuras unicíclicas y policíclicas, una de origen vegetal (limoneno y alcanfor) y otra de origen animal (colesterol) (1)

3.3.- DERIVADOS DE LÍPIDOS

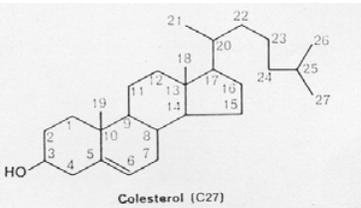
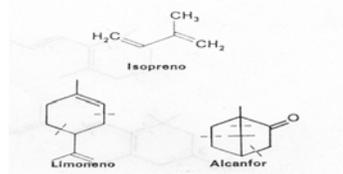
CITA TEXTUAL



EL ACEITE DE ORÉGANO FRENA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN LOS ALIMENTOS

Según una investigación de la universidad de chihuahua (México). La investigación se centró en el estudio de los componentes antimicrobiales de las plantas medicinales usadas en la alimentación. El descubrimiento abre nuevas posibilidades a las técnicas de conservación de los alimentos a partir de productos naturales (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- Diga cuáles son los 4 grupos más importantes de los aceites volátiles?
- 2).- Defina Isómero
- 3).- Diga cuál es la importancia de los índices para una grasa?

FUENTES.



- 1).-MACARULLA. M. J; Biomoléculas lecciones de bioquímica estructural, Reverte, 3ª/e^d, España, Pearson, 1993
- 2).- UNIVERS. De Chi. El aceite de orégano. DISCOVERI DE SALUD N° 18/ Jul / 2000

COMENTARIOS



ESTEROLES. Estas sustancias están integradas por el grupo de los **fenantrenos**, entre los cuales destacan los **isoprenos** quienes derivan de una planta muy conocida por la industria farmacéutica, el barbasco del cual se obtienen varias hormonas que son sintetizadas por medios químicos.

Los aceites que portan las esencias son más que simples moléculas orgánicas, dado que estas comparten la presencia de anillos carbonados de 6 átomos con dobles enlaces (semejantes a los anillos de los esteroides – los **flavonoles**), lo cual les profiere el carácter de aromaticidad a los compuestos.

Suelen incluirse algunas moléculas formadas por condensación de unas cuantas unidades de isoprenos. Químicamente son hidrocarburos como el pineno y el limoneno y algunos cumplen funciones oxidativas como el alcanfor. Otros **terpenoides** de interés fisiológico

En el reino vegetal reciben el nombre de **fitoesteróles**, entre los cuales destacan el **sitoesterol**, el **estigmasterol** y los aceites etéreos, que comprenden a 4 grupos: terpenos relacionados con el **isopreno** y el **isopenteno**, compuestos carbonados de cadena lineal sin cadenas laterales, derivados del benceno. Mientras que en el reino animal destacan el colesterol, la vitamina D, el **cortisol**, el **estradiol** y la testosterona principalmente, todos ellos importantes en el metabolismo de animales y vegetales.

Hoy en día, gran parte del interés enfocado sobre el colesterol, se debe a la relación entre esta sustancia y la presencia de placas de material lipido y fibroso acumuladas en el interior de las arterias coronarias, la aorta y otros vasos. En la actualidad no existe un procedimiento seguro para impedir el depósito de colesterol, y disminuirlo en el suero no garantiza el depósito en los vasos. Los mecanismos de ajuste son muy complejos; cuando se reducen en la dieta, aumenta la síntesis del colesterol hepático y se eleva el colesterol sérico en sangre.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener una grasa sólida a partir de una líquida mediante una transformación de **isomería cis – trans** a través de una reacción orgánica con un **catalizador inorgánico**.

IMPORTANCIA.



El líquido obtenido en las prácticas de saponificación se puede presenciar por una reacción de Molish cuya presencia se nota por un vire de color. Esta reacción es clásica en la evidencia de azúcares, por ende, si existen azúcares presentes en la **alícuota**, esta puede darnos un falso (+).

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure no exponer el tubo de ensayo durante tiempos prolongados, caliente suavemente y retire de vez en vez.
Procure no aspirar los vapores de ácido nitroso ya que son tóxicos y no tenga contacto directo con el ácido en pie y ojos.

3.3.A.- DETERMINACIÓN DE GRASAS POR SU ISOMERÍA CIS - TRANS

MÉTODO- TÉCNICA



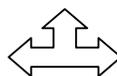
I).-Tomar un tubo de ensayo de 10 ml, agregar 2 ml de aceite de oliva, 1 gota de mercurio y 3ml de ácido nitroso diluido al 1:1; calentar suavemente y esperar el cambio.

II.- Para la siguiente práctica tomar 2ml del líquido obtenido en la práctica de saponificación que contenga glicerol o agregue directamente el glicerol, u otro aceite en un tubo de ensayo de 10ml.

III.-Enseguida agregar un poco de bisulfato de potasio o sulfato de sodio anhidro (deshidratante)

III.- Poner a calentar la mezcla hasta que se liberen humos blancos de olor típico, retirar la mezcla y después de un tiempo, ésta solidifica.

FUNDAMENTO



Es sabido que las grasas que contienen ácidos insaturados en forma “cis” son líquidas a T ° ambiente pero, al inducir la transformación química con un catalizador, la grasa se transforma en “trans” y por lo tanto se solidifica, siendo su punto de fusión más elevado. Por ejemplo

Ácido oleico (liq.) + Catalizador (Ac. Nitroso) →

Ácido heliaco (sol.)

9 – Cis octadecenoico (liq) + ác. Nitroso →

9 – Trans Octadecenoico (sol)

APLICACIÓN.



Esta prueba además de ser muy sencilla, suele ser cualitativa por lo que su aplicación es muy válida en los niveles básico y medio superior para la identificación de ácidos grasos.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener un aceite esencial (limoneno) a partir de cáscara de limón fresca, mediante una técnica de bidestilación por arrastre de vapor.



IMPORTANCIA.

La mayoría de los vegetales superiores contiene aceites esenciales en sus cortezas raíces, pétalos, flores, frutos y hojas. Estos aceites son una mezcla de terpenos que se obtienen con trampas por arrastre de vapor y con distintos solventes orgánicos.

Los monoterpenos se encuentran muy distribuidos en la naturaleza. Los 2 esqueletos de isopreno se pueden disponer en varias formas, aunque en unión cabeza cola. Se tienen hidrocarburos lineales como el mirceno, monocíclicos como el limoneno y bicíclicos como el canfeno, el α - tuyenol o sabineno. A los terpenos oxigenados se les llamó alcanfor. El término se usa regularmente para las cetonas que se obtienen con arrastre de vapor del árbol del alcanfor.

Los terpenos oxigenados pueden tener funciones alcohol, aldehído, ésteres y fenoles y por ésta razón también pueden extraerse con éter de petróleo directamente de la planta fresca.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuide que el alcohol no falte en ninguno de los 2 matraces, que las mangueras del refrigerante estén correctamente conectadas. Cuide también que el bulbo del termómetro no toque las paredes ni el fondo, pero si el alcohol.

3.3.B.- EXTRACCIÓN DE UN ACEITE ESENCIAL -DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Montar un equipo de destilación como sigue:

Montar 3 soportes universales. Alinear los 3 soportes universales con la plancha a tu frente. A tu izquierda tendrás el soporte n°1, al centro el soporte n° 2 y a tu derecha el soporte n° 3; en ese orden.

II.- Colocar en los 2 primeros, un aro de hierro, una rejilla de asbesto para cada uno, un mechero para cada uno y una pinza de goma para cada uno. Al 1° colocar un matraz de balón de 500ml más 250ml de etanol, taponarlo con un tapón de goma con 2 orificios; en un orificio colocar un termómetro de 100 ° C y dejar libre el otro. En el 2° soporte, colocar un matraz de balón para destilado y unirlo con el 3er soporte mediante un tapón que esté insertado en un refrigerante de serpentín sostenido a su vez por una pinza de goma. Unir los matraces de balón 1 y 2, mediante un tubo de vidrio doblado en forma de "u" y colocar un matraz Erlen Meyer de 250ml debajo de la boquilla del refrigerante.

III.- Colocar en el matraz n° 2, 300ml de etanol y las cáscaras suficientes de limón hasta 2/3 partes del matraz; taponarlos bien, conectar las mangueras del refrigerante, abrir la llave de agua y prenda los mecheros.

IV.- Echar a andar la destilación, cuidar que el alcohol no falte en ninguno de los 2 matraces, que las mangueras del refrigerante estén correctamente conectadas. Cuidar también que el bulbo del termómetro no toque las paredes ni el fondo, pero si el alcohol.

V.- El proceso de destilado lleva de 90' – 180' min, aproximadamente, todo dependerá del aceite esencial que se esté extrayendo. La primera fracción será opaca conocida como cabeza (se desecha), la 2ª fracción se recolecta en un frasco ámbar, su destilado será más lento y de color cristalino (con olor a la fragancia), tápelo. En tercera instancia obtendrá la cabeza del destilado, que puede juntar con la cabeza del destilado. Otra manera se puede dar a través del arrastre de vapor con un Soxhlet como se muestra a continuación

FUNDAMENTO



La extracción por arrastre de vapor se fundamenta básicamente en el manejo de temperaturas del solvente orgánico ya que el punto de ebullición deberá ser menor al punto de fusión del aceite esencial, de lo contrario se corre el riesgo de descomponer a las moléculas que componen la fragancia.

APLICACIÓN.



Resulta ser una práctica muy ilustrativa para los 3 niveles. Esta prueba además de ser muy sencilla, suele ser semicuantitativa por lo que su aplicación es muy válida en el nivel superior y el medio superior para la extracción de fragancias naturales en el área biológica.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

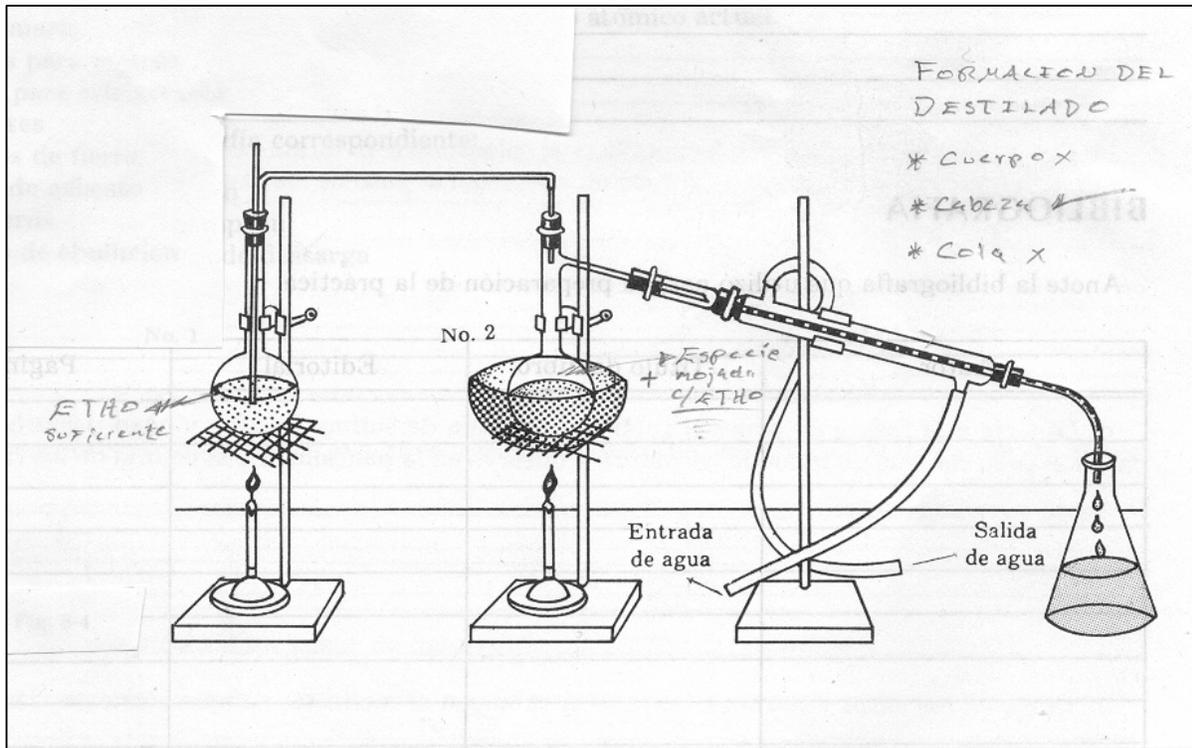
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



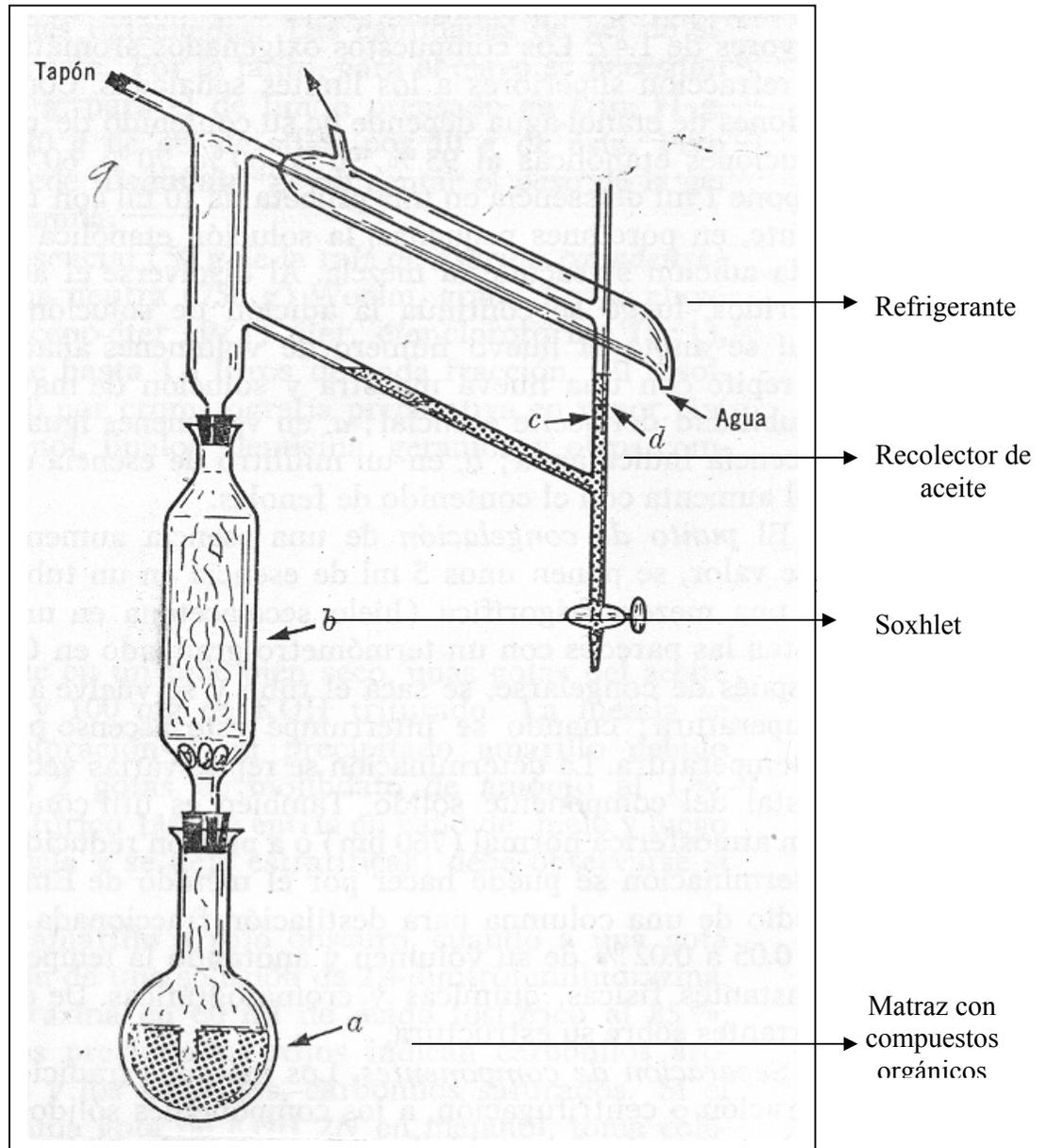
1.- Q.B.P. ANGELES. O. Glafira, Prácticas de química 1 -2, Tronco común del bachillerato, 4ª/eª, México, Publicaciones culturales, 1998.

ESQUEMA 3 D



ANGELES. Montaje para bidestilación de un aceite esencial de un producto natural

ESQUEMA 3 E



35. DOMINGUEZ. Montaje de un soxhlet para la extracción un aceite esencial por arrastre de vapor

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinarla presencia de flavonoides en una muestra vegetal en medio alcohol y otra en medio acuoso mediante una reacción con morina en medio básico y un agente **quelante**.



IMPORTANCIA.

La capacidad que tienen los derivados de hidroxilo de la flavona y el flavonol para actuar como colorantes que requieren mordientes, es decir, que pueden ser fijados por la alúmina y otros hidróxidos metálicos, esta relacionada con la posición quelante de los grupos OH con respecto a los grupos CO. El grupo OH en la posición 5 es particularmente activo.

Cabe aclarar que los aceites esenciales como pino, limón, rosa geraniol, menta, etc., pueden definirse, también como aceites volátiles y se clasifican como lípidos, debido a su solubilidad y a su origen en la planta viva. De estos se conocen 4 grupos relevantes. Terpenos relacionados con el isopreno o el isopenteno. Compuestos de cadena lineal sin cadenas laterales. Derivados del benceno. Y otros no incluidos en los 3 grupos anteriores.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante mencionar que esta práctica requiere de una lámpara de luz ultravioleta para evidenciar la presencia de la morina.

3.3.C.- REACCIÓN DE IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN VEGETALES

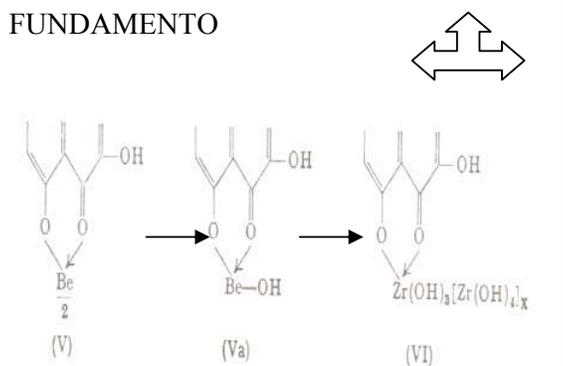
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Investigar previamente que vegetales contienen derivados de la flavona I y del flavonol II (5 - Hidroxiflavonoles).
- II.- Macerar en 2 mortero diferentes una muestra de esta planta, una en alcohol y otra en agua.
- III.- En una placa con 3 posos colocar: 3 gotas de una solución ácida al 0.01% de cloruro de circonio en cada 3 depresión.
- IV.- Posteriormente, tratar con una gota de solución de prueba en alcohol con el flavonoide, otra se trata con el flavonoide en medio acuoso y la última se debe tratar con una gota de agua sola.
- V.- Por último, exponer las posas a una lámpara de luz ultravioleta, y si la morina está presente, puede observarse una fluorescencia amarilla verdosa cuya intensidad de luminiscencia es directamente proporcional a la concentración presente en la muestra.

*Cantidades muy pequeñas dan una fluorescencia azul-verdosa.

FUNDAMENTO



Reacción que nos muestra la formación de hidroxiflavonoles (morina)

APLICACIÓN.



Esta prueba además de ser muy sencilla, suele ser semicuantitativa por lo que su aplicación es muy válida en el nivel superior y el medio superior para la identificación de flavonoides en el área biológica.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

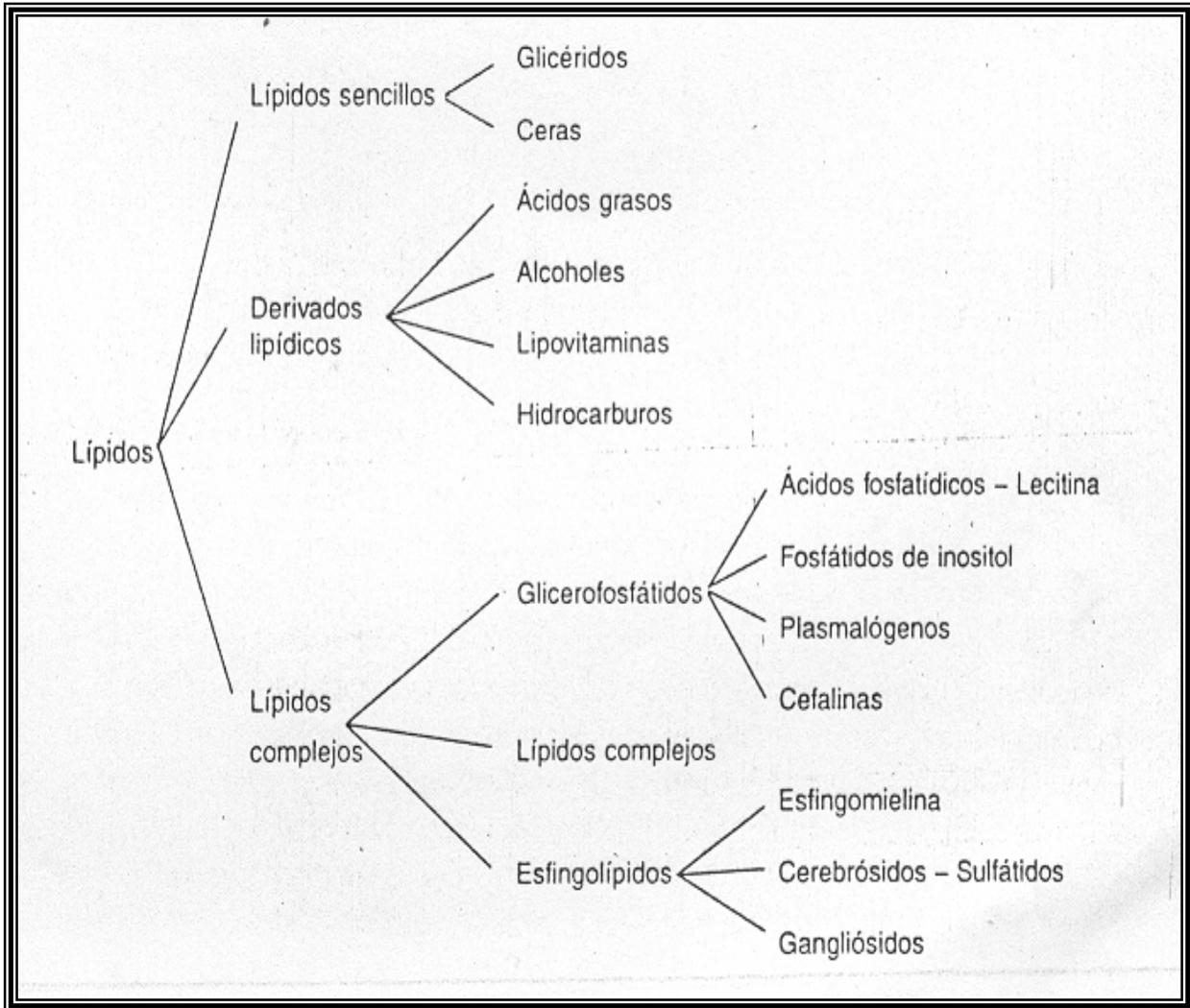
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7ª/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

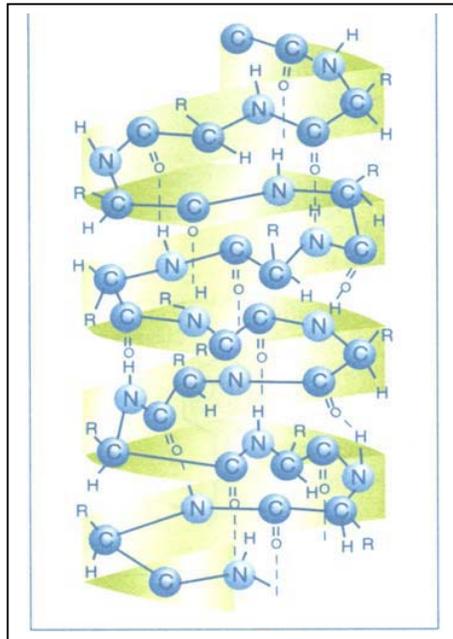
ESQUEMA 3 F



REINHARD Esquema que nos muestra una clasificación de los lípidos

CAPITULO 4

AMINOACIDOS



Aer Urinosum

INTRODUCCIÓN



En 1900 Emil Fischer sintetizó un polipéptido con 18 aminoácidos, y un alumno suyo uno de 19 aminoácidos. Este polipéptido (PM = 1326) mostró un comportamiento físico y químico semejante al de los productos de degradación de las proteínas, las llamadas proteasas o peptonas.

Como tal, el término **aminoácido**, proveniente del grupo **amino** (NH_2), **antes amida**, originalmente de **amonia** y derivada de **aer urinosum**, aplicado a las sales de amonio provenientes de la orina pútrida, dado que destilaban un olor característico; y **ácido** por **oxigene**, del Griego **ὄξύς**, cuyo grupo adyacente característico es (**COO H**). Ambos le dan un carácter de bipolaridad.

Cuando se tienen el mismo número de cargas positivas y negativas a un pH específico para cada aminoácido, se dice que el aminoácido está en su punto isoelectrónico.

Los **elementos biogénicos** que lo componen son C, H, N, O y S principalmente aunque existen otros elementos que le dan estabilidad a la unión formada entre aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares y grasas como son: P, Fe, Cu, Mg, etc. La fórmula de los aminoácidos generalmente se representa como sigue (**RCH(NH₂)COOH**). En donde **R** corresponde a la cadena lateral.

La hidrólisis producida a diversas proteínas animales y vegetales, ha comprobado que los productos aislados han sido casi en su totalidad α - aminoácidos (tanto el grupo amino como el grupo carboxilo se encuentran en el carbono α) y está demostrado por síntesis total que constituyen las unidades estructurales de las proteínas. Se conocen más de 140 aminoácidos aislados, pero solo 20 funcionan como **monómeros** o constituyentes básicos de las proteínas de los cuales hay 19 aminoácidos y 1 **iminoácido** (la **Prolina**) ya que su estructura no permite la migración en una electroforesis).

Un enlace peptídico se forma cuando un grupo carboxilo de un aminoácido se une a un extremo amino de otro aminoácido, desprendiendo una molécula de agua en la reacción (proceso de deshidratación). Cuando 50 ó más aminoácidos se unen, se dice que se ha formado una proteína.

4.- AMINOÁCIDOS

CITA TEXTUAL



En 1864 cayó un meteorito en el pueblo de Origueil, cerca de Mountauban, Francia. En 1963, J. R. Kaplan raspo un poco de polvo de la superficie del meteorito y lo analizó, encontrando una multitud de aminoácidos que, hasta entonces, se consideraban particulares de los organismos vivos (los aminoácidos son las moléculas con las que se construyen las proteínas. Los que encontró Kaplan en el meteorito fueron glicina, alanina, valina, prolina, ácido aspártico y ácido glutámico). De hecho, los encontró incluso en mayores cantidades que las que se obtienen en experimentos de tipo Millar - Urey. Además, encontró 2 de las 4 bases nitrogenadas que conforman al ADN y al ARN (adenina y guanina) (2).

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



William Latam basa su programa Mutador para crear formas en base a algoritmos genéticos. Modelo virtual de algunos aminoácidos unidos entre sí formando un péptido (1)

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1.-¿Con qué reacción se identifica a los aa's de manera genética?
- 2.-¿A que aa. se le conoce como iminoácido?

COMENTARIOS



Puesto que el grupo amino es adyacente al carbono, se dice que son compuestos **quirales** u óptimamente activos. Es importante puntualizar que el uso de las convenciones L y D, se refiere solo a la configuración relativa y no proporciona información respecto a la dirección en que se desvía la luz polarizada del compuesto.

La facilidad que tiene cada a.a. para reaccionar se debe a la naturaleza química de su radical, la cual lo hace más estable.

En tanto, los nombres de los aminoácidos se designan con las 3 primeras iniciales, en donde la primera inicial siempre se escribe con mayúscula y las 2 siguientes con minúsculas, en forma de abreviatura. Aunque estas derivan del inglés tienen un carácter universal y no deben de sustituirse por las letras del nombre en español.

Los aminoácidos son regularmente compuestos incoloros y cristalinos que tienen el aspecto de un polvo blanco. Las formas cristalinas que toman son variadas, desde haces y agujas delgadas (Tirosina) hasta formas hexagonales (Cistina). Los sabores varían desde el amargo (Arginina), pasando por el insípido (Tirosina) hasta el dulce azucarado (Glicina y Alanina).

Hoy en día, existe una demanda creciente de aminoácidos individuales puros para su empleo en medicamentos, alimentos sintéticos, y para usos de investigación en nutrición y metabolismo. Dicha demanda ha mejorado el aislamiento y síntesis de aminoácidos. Los productos comercialmente disponibles, varían en precio desde unos centavos por cada gramo hasta varios dólares por miligramo, dependiendo del grado de pureza.

FUENTES.



- 1).-KANTOR Jhonathan (foto), Maquinas que piensan, Las Computadoras como artistas, Discover en español, Febrero 2001.
- 2).-ALDANA Maximino et. al, La vida... ¿se origina en la tierra?, ¿Cómo Ves?, Año 2, N°23. Octubre 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar el comportamiento de la urea en un medio básico y en un medio ácido, como un producto aminado.



IMPORTANCIA.

La urea es encontrada frecuentemente en los vegetales como un producto intermedio de reacciones bioquímicas, por ende su importancia, ya que de esto dependerá el buen desarrollo y fructificación de los mismos. Dicho compuesto se encuentra en las raíces de los vegetales y es biotransformado por algunos hongos y bacterias para la obtención de oxígeno de la planta.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tenga cuidado al manejar el ácido y la base ya que éstas son corrosivas. Sus productos de reacción generan algunos gases que son tóxicos.

4.A.- PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE UREA Y FORMACIÓN DE UN COMPUESTO DE UREA

MÉTODO- TÉCNICA



Hidrólisis de la urea

I.- Añadir a un tubo de ensaye 5ml de una solución de hidróxido de sodio al 5% + 0.5 g de urea y calentar suavemente.

II.- Esperar un momento a que se desprenda el gas.

Formación de un compuesto de urea

I.- Poner en un tubo de ensaye 2g de urea en un poco de agua + unos ml de ácido nítrico concentrado.

R (+) = Precipitado de nitrato de urea

FUNDAMENTO



Muchos compuestos aminados son susceptibles a los cambios de pH como la urea, formando nuevos compuestos (1er caso) o el nitrato de urea (en el 2º caso); los cuales formaron una.

1er caso $\text{H}_2\text{N} - \text{CO} - \text{NH}_2$

2º caso $\text{NO}_3 - \text{HN} - \text{CO} - \text{NH}_2$

APLICACIÓN.



A pesar de ser una prueba muy sencilla y rápida no se recomienda aplicarse en los niveles básico ni medio superior dada la naturaleza de los reactivos, pero bien se puede aplicar en el nivel superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- BREWSTER Q. Ray, Curso de Química Orgánica experimental, España, Alhambra, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Preparar una resina de urea con formaldehído, valiéndose de un medio ácido.

IMPORTANCIA.



Las resinas de urea formaldehído se emplea particularmente para artículos de moldeo y para cintas adhesivas que hoy están en boga en la industria del pegamento y que también es útil para la industria papelera.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tenga cuidado al manejar los reactivos y sus productos ya que pueden ocasionar daño.

4.B.- FORMACIÓN DE RESINA DE UREA

MÉTODO- TÉCNICA

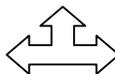


I.- Agregar a un tubo de ensayo 3g de urea + 5ml de ácido clorhídrico concentrado en 30ml de agua.

II.- Añadir unas gotas de anaranjado de metilo + 3ml de formalina, mezclar bien los reactivos por agitación y dejar reposar el tubo por varios minutos hasta que aparezca una resina.

R (+) = Aparición de una sustancia viscosa (resina de urea)

FUNDAMENTO



La formación de resina de urea consiste en la repetición múltiple de la reacción entre la urea y el formaldehído en un medio ácido.

APLICACIÓN.



Ésta práctica es de fácil aplicación, por lo cual se puede llevar a cabo bien en los tres niveles, siempre y cuando se tenga el cuidado adecuado con los reactivos. Hoy en día se aplica en la industria de algunas cintas adhesivas.

CLASIFICACIÓN.

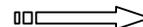
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-BREWSTER Q. Ray, Curso de Química Orgánica experimental, España, Alhambra, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar las purinas presentes en el ácido úrico, mediante una reacción conocida como "Ensayo de la Murexida", la cual hace evidentes a los productos de la purina por un vire de color.



IMPORTANCIA.

Es conocido que las purinas comprenden a un grupo numeroso de compuestos entre los cuales figuran, la cafeína, las bases púricas provenientes de unja hidrólisis de los ácidos nucleicos y por supuesto, el ácido úrico.

Por lo demás es una práctica muy sencilla y rápida, que bien puede llevarse del nivel cualitativo hasta el nivel cuantitativo.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tenga cuidado de manejar muy bien la muestra de ácido úrico para no contaminarlas, trabaje con guantes de látex, no tenga contacto directo con el amoníaco, trabájelo en una campana extractora; además procure no tener contacto directo ni con el ácido nítrico ni con la murexida.

4.C.- IDENTIFICACION DE ÁCIDO ÚRICO POR ENSAYO DE LA MUREXIDA

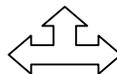
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Colocar en una cápsula de porcelana 200 mg de ácido úrico
- II.- Agitarlos con una varilla de vidrio y agregar 1ml de ácido nítrico concentrado.
- III.- Calentar muy suavemente las pozas o las cápsulas de porcelana con un mechero (en caso De que lo haya hecho por separado), hasta que el contenido se evapora casi hasta la sequedad.
- IV.- Secar un frasco de amoníaco concentrado en el interior de una campana y exponer las Muestras a los vapores, esperar los resultados.
Identificar la presencia de color, su ausencia y la intensidad del mismo.

R (+) = Aparición de un color rojo púrpura característico de la reacción de las murexidas.

FUNDAMENTO



Muchas de las purinas dan una reacción coloreada que se le conoce con el nombre de "Ensayo de la Murexida". Bien se sabe que las purinas, al ser estructuras aminadas y con dobles enlaces, se vuelven resonantes en un medio ácido, promoviendo el movimiento electrónico.

De esto, se deduce que "a mayor número de estructuras resonantes, mayor será el color y mayor será la estabilidad de la molécula".

Aunque es muy poca la información que se conoce de sus productos, es cierto que identifica muy bien a los derivados de purinas como la cafeína y el ácido úrico.

APLICACIÓN.



Ésta práctica bien puede aplicarse a os niveles básico y medio superior ya que no es necesario contar con todas las condiciones sofisticadas de un laboratorio ni con la pureza de la muestra; bien se puede adaptar a las necesidades del laboratorio escolar con el número y selección de muestras deseadas.

CLASIFICACIÓN.

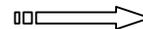
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-BREWSTER Q. Ray, Curso de Química Orgánica experimental, España, Alhambra, 1978.

INTRODUCCIÓN



Grupo III. En este grupo existen 2 aminoácidos principalmente:

Ácido aspártico y **Ácido glutámico**; ambos tienen un grupo carboxílico en la cadena lateral que les confiere sus propiedades ácidas. En el pH fisiológico, los 3 grupos funcionales de estos aminoácidos se encuentran ionizados en una especie con carga neta de -1, por ejemplo aspartato y glutamato.

También se les conoce como a.a.'s con carga (-)

En la dieta normal, los a.a.'s no son biomoléculas combustibles muy importantes. Sin embargo, en determinadas circunstancias son una fuente significativa de energía metabólica.

Cuando los a.a.'s de la dieta exceden la demanda requerida para la síntesis de proteínas, los organismos, con excepción de las plantas son incapaces de almacenarlos.

En el lenguaje bioquímico, el **anabolismo** es el proceso de fabricación de tejidos a partir de los alimentos, dicho de otra manera, es el proceso de creación de nueva masa muscular.

Por el contrario, el **catabolismo** corresponde al inverso del anabolismo y ocurre cuando falta energía, ya que se descomponen los azúcares, las grasas y los tejidos musculares (proteínas) para suministrar los nutrientes necesarios a la sangre. La hormona clave en este proceso es la insulina, quien regula la entrada de azúcar en la sangre. En cualquier ser vivo, las proteínas del músculo se forman y se degradan de manera constante (anabolismo y catabolismo) en un equilibrio dinámico.

PIE DE FOTO.



Molécula del ácido aspártico (Asp), PM = 133, pK = 2.09, 3.86, 9.82; pI = 2.97; también conocido como ácido α-aminosuccínico. (1)

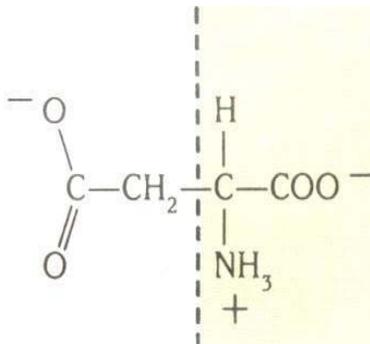
4.1.- a.a. CON CADENAS LATERALES ÁCIDAS

CITA TEXTUAL



Durante 1991 se dieron a conocer los resultados de varias vacunas. Una de ellas fue la más alentadora. El equipo del instituto de investigaciones Walter Reed, de la ciudad de Washington, experimentó con 30 enfermos una vacuna basada en una recombinación del antígeno del VIH, una secuencia de aminoácidos llamada GP 160. Los resultados demostraron que 19 personas reaccionaron positivamente a la vacuna, pues habían tenido incrementos celulares - en la generación de células blancas encargadas de la defensa del organismo - y respuestas inmunes al VIH, además de una estabilización del número de células del tipo CD4, encargadas de luchar contra la infección. Pero realmente todavía es poco lo que se ha hecho en ese sentido (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Qué es anabolismo?
- 2).- ¿Qué aminoácido favorece la eliminación del grupo amino?
- 3).- ¿Qué es el catabolismo?
- 4).- ¿Cuál es el fundamento de la cromatografía bidimensional?
- 5).- ¿de qué otra manera se les clasifica a los aminoácidos aspártico y glutámico?
- 6).- ¿Cuál es el punto iso eléctrico del ácido aspártico?

COMENTARIOS



Los **a.a. esenciales**- son aquellos que no se sintetizan por un proceso metabólico, y por lo tanto se tiene que ingerir en la dieta. Hoy se sabe que la biosíntesis de a.a. esenciales tanto en bacterias como en plantas, requiere de rutas largas y complejas que las de los a.a. no esenciales. A diferencia de las plantas y las bacterias, nosotros, los seres humanos carecemos de por lo menos una enzima que nos ayude a sintetizarlas.

Los a.a.'s que ingieren o sintetizan los organismos superiores están para satisfacer todas sus necesidades prioritarias. Por esta razón se utilizan principalmente en la síntesis de proteínas y de bases para los ácidos nucleicos. Aunque existen diversos factores de control, el principal de estos es por retroinhibición.

En la mayoría de los casos, el primer paso de la ruta biosintética de un a.a. lo inhibe el producto final, esto permite que el organismo pueda ajustar su nivel de a.a.'s según sus necesidades específicas.

Por ejemplo la **L - Glutamina** actúa de forma anabólica en la síntesis proteica, activa el rendimiento muscular, la memoria y fortalece la función inmunológica, previene la pérdida de masa corporal y mantiene la masa muscular ganada.

Al hablar de los a.a., se marca una gran diferencia con respecto a los carbohidratos y los lípidos. En los a.a.'s se debe eliminar precisamente el grupo amino, que no se encuentra en las otras biomoléculas y que es favorecida su eliminación por la L - Glutamina.

FUENTES.



1).- ONDARZA Raúl, Biología Moderna, 10ª/e^d, México, TRILLAS, 1996.

2).- LEYVA José Ángel, El doctor Sidaharta pregunta y responde ¿Y las vacunas?, ¿Cómo Ves?, Año 2, N°17, Abril 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la presencia de 7 a.a.'s mediante una reacción con tiocianato y acetato de plomo.

IMPORTANCIA.



Aunque ésta sea una prueba cualitativa, no deja de perder importancia ya que se pueden identificar todos los a.a.'s que no den falsos positivos o falsos negativos. Tiene otras ventajas, ya que, es sencilla de realizarse y muy rápida.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuide que el a.a. que ponga a reaccionar no contenga compuestos que reaccionan con cianuro mercúrico conjuntamente con el desprendimiento de ácido cianhídrico. Tenga mucho cuidado al trabajar con estos 2 reactivos ya que ambos son peligrosos.

4.1.A.- DESENMASCARAMIENTO DE LOS GRUPOS ÁCIDOS EN LOS AMINOÁCIDOS.

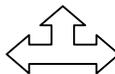
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Tomar los microtubos necesarios y agregar una gota de las muestras o un poco de los sólidos y llevar hasta la sequedad, introducir varios cg de paraformaldehído (mantener los tubos durante 5') en un horno para desecar a 120°C.
- II.- Después de volver a dar un calentamiento por 10' min. a 140°C. , dejar enfriar.
- III.- Enseguida agregar varios cg de cianuro mercúrico así como una gota de acetona.
- IV.- Evaporar nuevamente la mezcla hasta sequedad y sumerja los tubos a 0.5 cm en un baño de glicerol que se haya calentado a 160°C.
- V.- Cubrir la boca del disco con un papel humedecido con ácido cianhídrico.

R (+) = 5 a 10 μ g el color de la mancha es azul.

FUNDAMENTO



El grupo NCH_2 tiene carácter básico a diferencia del grupo NH_2 , por lo tanto, la metilación es acompañada por la liberación o “desenmascaramiento” de los grupos carboxílicos y sulfonílicos que están salificados en mayor o menor grado, en el a.a. Los ácidos que quedan después de la exposición al formaldehído, producen ácido clorhídrico cuando se calientan en seco con cianuro mercúrico y pueden ser detectados fácilmente en la fase gaseosa por una reacción de color con una mezcla de acetato de bencidina y cobre.

Cuando los a.a.'s son calentados entre 130°- 140° C con el P – formaldehído, el formaldehído resultante se metilena con el grupo NH_2 .

APLICACIÓN.



A pesar de ser una prueba muy sencilla y rápida no se recomienda aplicarse en los niveles básico ni medio superior dada la naturaleza de los reactivos, pero bien se puede aplicar en el nivel superior.

CLASIFICACIÓN.

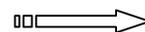
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7ª/e^d, México – UNAM, Manual Moderno, 1978.

INTRODUCCIÓN



Grupo IV. Los aminoácidos característicos de éste grupo son: **Lisina, Arginina e Histidina** cada cadena lateral es de naturaleza básica por lo que cada una de estas puede aceptar un protón. La cadena lateral imidazol de la histidina tiene un pKa cercano al pH fisiológico, de modo que pueden existir 2 formas iónicas, dependiendo de las condiciones en que se presenten in vivo. La lisina tiene un grupo amino en la cadena lateral, y existe principalmente en el estado iónico +1 a pH neutro. El grupo guanidino de la cadena lateral de la arginina es el más básico de todos los grupos R (pKa = 12.5). Los aminoácidos II, III y IV son hidrofílicos y en un medio acuoso tienden a agruparse en la parte exterior de una proteína.

También se les conoce como a.a.'s con carga (+), todos ellos tienen grupos R característicos con una carga (+) a pH = 7 y están conformados por 6 átomos de carbono. Es importante puntualizar que la Histidina se encuentra en la línea límite de sus propiedades, puesto que a un pH = 6, un poco más del 50% de las moléculas tienen un grupo R cargado (+) en forma protonada, pero a un pH = 7, menos del 10% tienen una carga (+).

Los a.a.'s participan en la formación de diversas sustancias nitrogenadas de gran importancia fisiológica. Por ejemplo, la **creatina**, juegan un papel muy importante en la fosforilación y en su forma de excreción (la **creatinina**) en el metabolismo de las proteínas para determinar masa muscular, además se encuentra en cerebro y sangre.

PIE DE FOTO.



Molécula del aminoácido Histidina (His), PM = 155, pK = 1.82, 6.0, 9.17; p I. = 7.58; también conocido como ac. α -amino β -imidazolpropiónico (1).

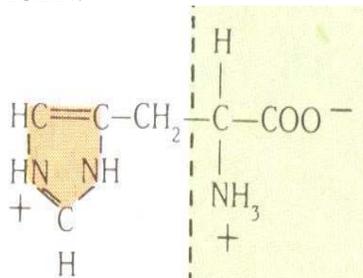
4.2.- a.a. CON CADENAS LATERALES BÁSICAS

CITA TEXTUAL



*Si bien los investigadores de la industria han buscado intensamente en el laboratorio la síntesis de sustancias inocuas con alto poder edulcorante, los resultados más interesantes han surgido del análisis -con las herramientas de la biología moderna- de lo que existe en la naturaleza. Es así como se han descubierto media docena de **proteínas** dulces en frutas tropicales de diversos países de África y Asia, con una capacidad edulcorante: 2000 a 3000 veces más potente que la sacarosa. Recientemente, al analizar la estructura de la **brazzeína**, proteína de la planta *Pentadiplandra brazzeana*, originalmente también de África, que tiene la propiedad de ser 2000 veces más dulce que el azúcar de caña, hubo sorpresas. La **brazzeína** es la más pequeña de todas las proteínas (sólo con 54 aminoácidos) y no se parece a ninguna de las proteínas dulces conocidas, sin embargo es semejante en su estructura a la proteína tóxica del veneno de alacrán. ¿Una proteína que quizá alguna vez sirvió como defensa a la planta y evolucionó hacia la dulzura? (2).*

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Con qué prueba se detecta aminolípidos?
- 2).- ¿Qué función juega la creatina en el organismo?
- 3).- ¿Qué es un aminoácido no esencial?

COMENTARIOS



a.a. no esencia.- son aquellos que si se sintetizan por un proceso metabólico.

Las reacciones de biosíntesis de los a.a.'s no esenciales son sencillas e idénticas en todos los organismos, desde los más elementales hasta los más complejos como los seres humanos. Los seres humanos no podemos sintetizar el complejo sistema de anillos de piridina del FH₄, así que debemos obtenerlo de nuestra dieta o bien de las bacterias que se encuentran en nuestro sistema digestivo.

Algunas vitaminas funcionan como portadoras de unidades de carbono activadas en varios estados de oxidación. Por ejemplo en la conversión que se da de serina a glicina, se transfiere al tetrahidrofolato una unidad de un solo carbono de la serina, a traves de una reducción que se utiliza para la síntesis de metionina.

Hoy se sabe que la **creatina** es el suplemento de moda entre los deportistas, puesto que es un compuesto de a.a.'s (Arginina - Glicina - Metionina), que regularmente se forma en el hígado, páncreas y riñón. La fosfocreatina se utiliza para obtener energía inmediata en el músculo porque mantiene el nivel de adenosintrifosfato (ATP), que es la fuente de energía más común en nuestras células. Se le encuentra de forma natural en el arenque, salmón, atún, bacalao, vaca y cerdo.

FUENTES.



- 1).- ONDARZA Raúl, Biología Moderna, 10^a/e^d, México, TRILLAS, 1996.
- 2).- LOPEZ. M. Agustín, ¿Cómo te supo? La ciencia de la dulzura, ¿Cómo Ves?, Año 2, N°22, Septiembre 2000.

INTRODUCCIÓN



Los aminoácidos del grupo II son: Hidroxiaminos derivados de grupo OH (**Treonina, Serina**), Sulfa aminos derivados de grupo azufre (**Cisteina**), Alifáticos de cadena lineal (**Glicina**), Derivados de anillo aromático (**Tirosina**), Heterocíclicos con cadena lineal y cíclica (**Asparagina y Glutamina**).

También se les conoce como a.a.'s neutros (sin carga).

Al examinar las cadenas laterales de los aminoácidos de éste grupo, se encuentran grupos funcionales muy variados; pero la mayoría tiene por lo menos un **hetero-átomo** (N, O ó S) con un par de electrones disponible para formar puentes de hidrógeno con el agua o con otras moléculas. Quizá el aminoácido más interesante de éste grupo es la cisterna, que posee un grupo menos - SH (sulfidrilo) en la cadena lateral. El grupo - SH puede reaccionar en condiciones oxidantes con un grupo - SH de otra Cisteína y forma un enlace disulfuro. Los agentes reductores transforman de nuevo este enlace en grupos sulfidrilos. El enlace disulfuro que se forma entre las Cisteínas tiene importancia en las estructuras tridimensionales de las proteínas.

Estos grupos tienden a perder fácilmente sus protones por ionización a diferencia de los grupos R de otros a.a.; se encuentran ligeramente ionizados a un pH = 7.

En algunas proteínas las Cisteínas se encuentran frecuentemente en forma oxidada, esto es, unidas a otra Cisteína (unidas por un puente de disulfuro) por medio de un enlace covalente, conocido como residuo de **Cistina**.

PIE DE FOTO.



Molécula del aminoácido Tirosina (Tyr), PM = 181, pK = 2.2, 9.11.10.07; p.I. = 5.65 también conocido como ácido α -amino β -Hidroxifenilpropionico (1).

4.3.- a.a. CON CADENAS LATERALES POLARES, SIN CARGA EN EL pH FISIOLÓGICO

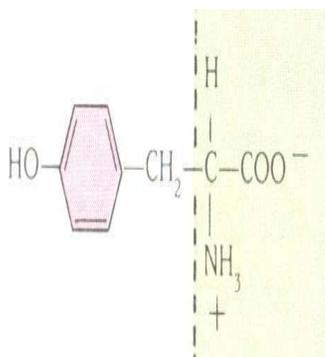
CITA TEXTUAL



Tanto la dopamina como la serotonina son 2 neurotransmisores provenientes de 2 aminoácidos, el primero del triptofano y el segundo de la serotonina.

El Dr. Nicolini señala que se ha encontrado que individuos con ciertas alteraciones en los genes que regulan la acción en el cerebro de estas 2 sustancias, presentan una acentuada agresividad la cual puede estar asociada a patologías mentales. Tal es el caso de trastornos como la psicosis. En el caso de agresión contra uno mismo, el suicidio, se ha descubierto que la serotonina está involucrada. Incluso se presume que alteraciones en el gen responsable de la fabricación de la molécula que transporta la serotonina al interior de la neurona puede afectar el funcionamiento de este neurotransmisor de manera que haya una predisposición a atentar contra la propia vida. (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cómo interviene la tirosina en la pigmentación de la piel?
- 2).- Prueba que da como producto nitrato de urea?

COMENTARIOS



Los a.a. glucogénico.- son aquellos que al metabolizarse en el organismo dan origen a la gluconeogenesis, esto es, desencadenan la nueva síntesis de glucosa (azúcar).

La solubilidad depende de la capacidad que tenga el a.a. para establecer puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, aquellos que tienen grupos polares se hidratan más fácilmente que aquellos que tienen radicales no polares o **hidrófobos**.

La Tirosina es un a.a. no esencial en la especie humana, ya que normalmente es sintetizado a partir de la Fenilalanina. Es importante recalcar que, precisamente, la Tirosina interviene en el metabolismo generando importantes **neurotransmisores** como la dopamina, adrenalina y la noradrenalina. El **pigmento** de la piel oscura, melanina también es generado por los **melanocitos** a partir de este a.a., gracias a los ciclos de luz - oscuridad.

La misma Tirosina sirve como un ladrillo de construcción para la síntesis de la **hormona** tiroidea (**tiroxina**) que se encarga de regular el **metabolismo basal**, esto es, regula la temperatura del cuerpo cuando hace frío o calor entre otras cosas.

También la Tirosina y la Fenilalanina funcionan como precursores de las sustancias pigmentadas, de color oscuro, que son muy abundantes en los animales, mejor conocidas como las melaninas.

FUENTES.



- 1).- ONDARZA Raúl, Biología Moderna, 10ª/e^d, México, TRILLAS, 1996.
- 2).- BRISE Luis Felipe, El cerebro agresivo, ¿Cómo Ves?, Año 2, N°17, Abril 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar al a.a. Glicina mediante una reacción con tiobarbiturico o tiocetato de Michler por medio de la aparición de una mancha de color.

IMPORTANCIA.



Aunque ésta sea una prueba menor, no deja de perder importancia ya que puede identificar además de la Glicina a la úrea y al ácido cítrico. Tiene otra ventajas ya que es sencilla de realizarse y muy rápida.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure no tener contacto con los productos de reacción. Cuide que las temperaturas de reacción sean las adecuadas.

4.3.A.- IDENTIFICACIÓN DE GLICINA

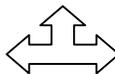
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Tomar 3 micro tubos de ensayo y colocar una pequeña cantidad de (puede ser líquida o sólida): 1.- urea 2.- ácido cítrico 3.- Glicina
- II.- Agregar una pequeña cantidad de ácido tiobarbiturico o tiocetato de Michler.
- III.- Enseguida agregar varias gotas de benceno de alta pureza o de cloroformo.
- IV.- Preparar previamente un baño maría a 120°C y coloque ahí su tubo de ensayo para eliminar su solvente.
- V.- Colocar un trozo de papel de acetato de plomo en la boquilla del tubo, elevar la temperatura a 180°C y esperar el resultado (de 2'-3'min).

R (+) = Mancha parda o negra, después de que la temperatura oscile entre 180° - 190°C

FUNDAMENTO



Existen algunos compuestos que al reaccionar con calor en seco ceden agua, incluyendo a los alcoholes cíclicos secundarios para producir compuestos cíclicos no saturados. A éste tipo de reacciones se les conoce como topoquímicas y ocurren cuando 2 sólidos se inician en un punto de contacto a una temperatura específica.



APLICACIÓN.



Es una prueba sencilla y rápida que bien se puede aplicar en cualquier nivel escolar, siempre y cuando se cuente con el cuidado adecuado y con los reactivos necesarios.

CLASIFICACIÓN.

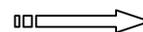
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas a la gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

INTRODUCCIÓN



Los aminoácidos se clasifican en 4 grandes grupos de acuerdo a su carácter eléctrico o de ionización: los ácidos, los básicos y los neutros.

Grupo I. Los aminoácidos de éste grupo son: Alifáticos de cadena lineal (**Alanina**, **Valina**, **Leucina**, **Isoleucina**), Heterocíclicos con cadena lineal y cíclica (**Triptófano** y **Prolina**), Derivados de anillo aromático (**Fenilalanina**), Sulfá aminos derivados de grupo azufre (**Metionina**). También suele llamarse a a.a.'s **hidrofóbicos**

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos del grupo I tienen grupos alifáticos o aromáticos y, por consiguiente, son hidrofóbicos. Dado que estas cadenas son en su mayoría **hidrocarbonadas**, su reactividad química es menos importante. Las proteínas disueltas en medio acuoso se pliegan en una forma tridimensional que oculta en su interior los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos de este grupo.

Estos a.a. se caracterizan por ser menos solubles en agua, en donde el menos soluble de todos estos es la Alanina, que representa el extremo de los a.a.'s no polares sin carga. Mientras tanto la Prolina es considerado un alfa a.a. en el cual su grupo R es remplazado por un grupo amino.

Dentro de la bioquímica, la degradación del Triptófano en los mamíferos suele ser muy compleja. Regularmente, la mayor parte de éste, se elimina en forma de los derivados del indol o del ácido quinurénico. En consecuencia, el Triptófano puede abrir su anillo bencénico y cerrarlo en otra posición.

PIE DE FOTO.



Molécula del aminoácido Triptófano (Try), PM = 204, pK = 2.38 y 9.39; p.I. = 5.88 también conocido como ac. α -amino β -Indolpropiónico (1).

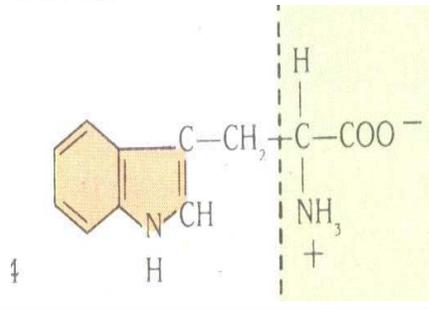
4.4.- a.a. - CON CADENAS LATERALES NO POLARES O HIDROFOBAS

CITA TEXTUAL



Prusiner propuso desde 1982 que una proteína denominada prión era el agente infeccioso causante de las encefalopatías espongiformes. Los priones son proteínas que se hubican naturalmente en la superficie de la membrana de las células nervios, en particular las del cerebro, de casi todos los mamíferos. Tienen en su forma benigna una estructura en la que predomina un arreglo espacial que se conoce como de β - hélice, y sirven como moléculas de señalación. De acuerdo con el descubrimiento de Prusiner, cuando los aminoácidos que forman las hélices del prión sufren un rearrreglo y adquieren una nueva estructura en la que predominan las hojas plegadas, la proteína se vuelve infecciosa y produce las encefalopatías espongiformes (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

(Cuestionario.)

- 1).-¿Qué prueba identifica ácido úrico?
- 2).-¿Qué aminoácido deriva de anillo aromático?
- 3).-¿A qué compuesto le llaman "el devorador de grasa"?

FUENTES.



- 1).- ONDARZA Raúl, Biología Moderna, 10ªed, México, TRILLAS, 1996.
- 2).-LOPEZ. M. Agustín, Las vacas locas, ¿Cómo Ves?, Año 3, N° 30, Mayo 2001.

COMENTARIOS



Los a.a. **Citogénico**.- son aquellos que al metabolizarse en el organismo, dan origen a la síntesis de lípidos.

En repetidas ocasiones se escucha a la gente deportista quejarse de haber perdido una competencia por retención de agua. Aunque esto llega a suceder en muchas circunstancias, también con gran frecuencia lo que se estaba reteniendo era grasa, y no agua.

Un plan sencillo es balancear la dieta con un menor número de alimentos que contengan a.a.'s citogénicos, colesterol y grasas de origen animal (carnes rojas).

La **L - Carnitina** es conocida como la "devoradora de grasa".

Se compone de dos a.a.'s: Lisina y Metionina. Los deportistas la usan para afinar o perder grasa porque tiene la particularidad de transportar los ácidos grasos de cadena larga al interior de las mitocondrias que se encuentran dentro de las células, para que se combusiones y produzcan energía.

La carnitina ayuda a adelgazar si se combina alguna actividad física intensa. Se le encuentra de forma natural en la leche, en la carne roja, levadura, cacahuete, coliflor y germen de trigo.

Por otro lado los a.a.'s ramificados (BCCAAs) forman el 30% del total de los a.a.'s de las proteínas musculares (L - Isoleucina, L - Leucina y L- Valina). Tienen una gran función anabólica que favorece la regeneración muscular y la recuperación depuse del esfuerzo. Se usa como fuente de energía cuando el glucógeno se acaba después de esfuerzos largos o de resistencia. Ayuda a disminuir la fatiga por el aumento de los niveles de **neurotrasmisores**.

Es recomendable tomarlo con fuentes que proporcionen azúcares, para favorecer la regeneración de niveles de glucógeno en el músculo.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de a.a.'s mediante la existencia de aminas libres utilizando tiocianato de potasio fundido.



IMPORTANCIA.

De acuerdo con su naturaleza de a.a.'s, las sulfanilamidas, las sulfonamidas, el ácido barbitúrico y sus derivados (con excepción del ácido 5 - nitrobarbitúrico) dan una respuesta positiva.

Las sales tetrasódicas no reaccionan con el tiocianato de potasio fundido.

Cuando las sales de amonio se ponen en reacción con el tiocianato fundido, inicialmente producen sales de amonio sustituidas del ácido tiocianico y posterior al calentamiento dan tioureas sustituidas (en forma de isoteureas). De acuerdo a éste concepto, todos los compuestos orgánicos derivados de ácidos aminocarboxílicos, aromáticos y aminosulfónicos aromáticos, se comportan como sales de amina, de tal manera que los compuestos pueden considerarse como a.a.'s utilizando el término en su acepción más exacta. Lo mismo sucede con los compuestos en los cuales esta presente un H ácido y con los grupos NH, OH, COOH y As O₃H₂.

¡NOTA IMPORTANTE!



Las sales de aminas provenientes de las sales de amonio, así como los ácidos carboxílicos no deben existir en esta reacción, ni tampoco aquellas que son derivadas de productos orgánicos, ya que producen agua a la temperatura de fusión, y con el tiocianato de potasio forman ácido sulfinico.

4.4. A.- DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS CON TIOCIANATO DE POTASIO FUNDIDO

MÉTODO- TÉCNICA



I.- En un microtubo, poner a secar una solución de prueba durante corto tiempo a una Temperatura = 110 °C

II.-Adicionar un exceso de tiocianato de potasio bien seco, calentar en un baño maría a 200 - 250 °C

III.- Colocar sobre la boquillas de un tubo de ensayo un papel humedecido previamente con una solución al 10% de acetato de plomo y observar el cambio de color producido por la reacción.

REACCIÓN (+) = En presencia de a.a.'s se puede observar una mancha negra en el papel.

IV.- Probar una solución alcalina de los a.a.'s, cuando la extracción es con éter o cloroformo, se procede a evaporar una gota de ésta solución con ácido clorhídrico 1: 1 a 110 °C

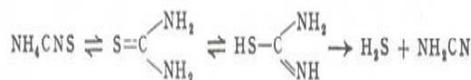
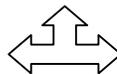
1er ORDEN DE REACCIONES (+)

Glicina Acetilglicina
Ácido antranílico
Ácido sulfanílico

2º ORDEN DE REACCIONES (+)

Fenilalanina Tirosina Ácido aspártico
Metionina Leucina Tiramina

FUNDAMENTO



APLICACIÓN.



Esta prueba es muy útil en laboratorios de determinación de compuestos orgánicos como en investigación, ya que proporciona una facilidad para el manejo de muestras.

CLASIFICACIÓN.

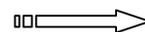
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la presencia de 7 a.a's mediante una reacción con tiocianato y acetato de plomo.

IMPORTANCIA.



Aunque ésta sea una prueba cualitativa, no deja de perder importancia ya que se pueden identificar a 7 a.a's. Tiene otras ventajas ya que es sencilla de realizarse y muy rápida.

4.4.B.- PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE 7 AMINOÁCIDOS

MÉTODO- TÉCNICA

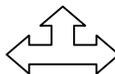


- I.- Tomar 7 micro tubos de ensayo y colocar una pequeña cantidad de (puede ser líquida o sólida): 1.- Fenilalanina 2.- Tirosina 3.- Glicina 4.- Alanina 5.- Ácido aspártico 6.- Metionina 7.- leucina
- II.- Mantener las muestra a una temperatura de 110°C y agregar una pequeña cantidad de tiocianato de potasio bien seco
- III.- Preparar previamente un baño maría a 200°- 250°C y colocar sus tubos de ensayo para eliminar su solvente.
- IV.- Colocar un trozo de papel filtro con una solución al 10% de acetato de plomo, en la boquilla de los tubos, elevar la temperatura a 180°C y esperar el resultado (de 2'-3' min).

R (+) = Aparece mancha parda o negra, después de que la temperatura oscila entre 180° - 190°C

En caso necesario de que se deseen probar soluciones alcalinas de los aminácidos (en una extracción previa con éter o cloroformo), evaporar una gota de la solución con una gota de ácido clorhídrico 1:1 y el residuo se seca a 110°C

FUNDAMENTO



De acuerdo con su naturaleza, algunos a.a's y otras sulfonamidas dan una respuesta positiva, mientras que la sal disódica de algunos ácidos produce ácido sulfídrico inmediatamente con el tiocianato de potasio fundido; por lo tanto éstas sales alcalinas pueden ser fácilmente distinguidas.

Se debe tomar en cuenta que la sal es tetrasódica.

APLICACIÓN.



Es una prueba sencilla y rápida que bien se puede aplicar en cualquier nivel escolar, siempre y cuando se cuente con el cuidado adecuado y con los reactivos necesarios.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure no tener contacto con los productos de reacción. Cuide que las temperaturas de reacción sean las adecuadas.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México – UNAM, Manual Moderno, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la presencia de 9 a.a's mediante una reacción con piridina - 2 - aldehído y nitrato de cobalto.



IMPORTANCIA.

Aunque ésta sea una prueba cualitativa, no deja de perder importancia ya que se pueden identificar a 7 a.a's. Tiene otra ventajas ya que es sencilla de realizarse y muy rápida.

Un aspecto muy importante en bioquímica es que también identifica la Monoyodo - L - tirosina, la Valina, la citrulina, la Arginina, la Fenilalanina, el triptófano y el ácido 2- amino - n - octanóico.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure no tener contacto con los productos de reacción. Cuide que las temperaturas de reacción sean las adecuadas.

4.4.C.- PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE 9 AMINOÁCIDOS

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación del reactivo

Preparar una solución acuosa de piridina -2- aldehído al 5% y mezclar 5 gotas de ésta solución con 1 gota de piridina de nitrato de cobalto al 0.1 M y mantener durante una semana en buenas condiciones.

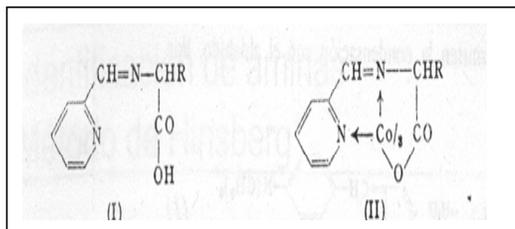
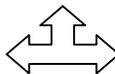
I.- Preparar 9 microtubos y agregar lo siguiente: 1) 3µg Cisteína 2.) 2.5µg Metionina 3) 5µg α - Alanina 4) 2µg lisina 5) 5µg Asparagina 6) 1µg Glicina 7) 3µg Tirosina 8) 1µg L- Leucina 9) 5µg Ácido aspártico.

II.- Colocar en un microtubo 1 gota de cada a.a. + 1 gota del reactivo preparado + de piridina, mezclar bien y calentar a baño maría de 1'-3'min. Dejar enfriar hasta que aparezca color.

R (+) = Si el a.a. $\geq 80 \mu g$ el color es azul o violeta.

R (+) = Si el a.a. $\leq 10 \mu g$ el color es rosa, naranja o amarillo.

FUNDAMENTO



El color intenso de la sal de cobalto es el resultado de la unión por quelación de 2 anillos condensados. La aparición gradual de colores está dada por la autooxidación al agregar aniones voluminosos.

APLICACIÓN.



Es una prueba sencilla y rápida que bien se puede aplicar en cualquier nivel escolar, siempre y cuando se cuente con el cuidado adecuado y con los reactivos necesarios

CLASIFICACIÓN.

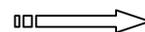
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas a la gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

INTRODUCCIÓN



Grupo V. Los aminoácidos que tienen la configuración D existen también en el enlace peptídico en la naturaleza pero no como componentes de macromoléculas proteínicas. Su presencia parece limitarse a **péptidos** cíclicos más pequeños o como componentes de **peptidoglicanos** de paredes celulares bacterianas. El antibiótico Gramicidina – S es un ejemplo de péptido que contiene 2 residuos de un D- aminoácido, D-fenilalanina.

La Gramicidina – S contiene también el aminoácido no proteico L – Ornitina, que es un intermediario metabólico importante en la síntesis de aminoácidos y otros compuestos.

La D- Valina de la actinomicina D, actúa como un potente inhibidor de la síntesis de RNA, mientras que la D-alanina y el ácido D – Glutámico se encuentran en el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias G (+).

Un isómero de la alanina, la β – alanina, se encuentra libre en la naturaleza y como un componente de la vitamina ácido pantoténico la coenzima A y una proteína acarreadora de acilos. La amina cuaternaria creatina, un derivado de la glicina, tiene una función fundamental en el proceso de almacenamiento de energía de los vertebrados donde es fosforilada y convertida en fosfato de creatina.

Aparte de estos aminoácidos no proteínicos, para los que se han descrito funciones metabólicas, se han detectado productos naturales varios cientos de otros aminoácidos no proteínicos. Las plantas superiores son una fuente particularmente rica de estos aminoácidos.

PIE DE FOTO.



Modelo virtual de la molécula de 2 aminoácidos visto en 3 dimensiones (1).

4.5.- a.a. NO PROTEICOS

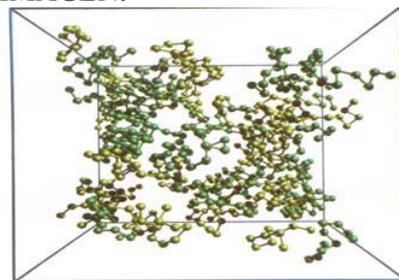
CITA TEXTUAL



La archilamida es uno de esos productos que la sociedad moderna llama "de primera necesidad". En el mundo se producen cerca de 136 mil toneladas anualmente, más de la mitad de las cuales se destinan, en forma de poliacrilamida (PAA), a la purificación de agua. El gel que forman las cadenas de poliacrilamida al agregarse al agua, atrapa las impurezas y retiene los sólidos, dejando el agua pura. La archilamida no debe quedar libre, y en general, no se tolera más de 1 mg por litro de agua. La segunda aplicación es en el proceso de producción de papel, ya que se adiciona a la pulpa de la celulosa para aumentar la resistencia del papel y su calidad para impresión.

En los pozos petroleros se inyecta gel de poliacrilamida para "empujar" y así extraer el petróleo que aún queda, pero no sale ya de manera natural con la presión del pozo. Los geles de poliacrilamida son también la herramienta más importante de quienes trabajan con genes y proteínas, pues constituyen la forma más rápida y eficiente para separarlos y purificarlos. (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

1).- ¿Cómo se llama el aminoácido que está presente en la gramacidina?

2).- De el fundamento de la formación de la resina

COMENTARIOS



Casos curiosos:

En 1953 Du Vignaud, Sintetizó el primer polipéptido natural, la oxitocina, que es una hormona aislada de la **hipófisis**.

La asparagina es un aminoácido no esencial que forma a las proteínas y curiosamente la acrilamida es la imagen **especial** de la asparagina, esto es, su **estereoisómero**.

¿El aminoácido N° 21?

Algunos aminoácidos que están presentes en el ciclo de la urea, como la citrulina o la ornitina, no son constituyentes de las proteínas.

Otros aminoácidos como la hidroxiprolina se forman por un proceso postraducciona. A principios de los 90', se detectó otro aminoácido en las proteínas de células eucariotas y procariotas, incluyendo a la especie humana.

La selenocisteína resultó ser un residuo de cisteína que tiene un átomo de selenio que sustituye al de azufre original. El mecanismo por el cual se determinó que la selenocisteína, se formaba era a través de una serina colocada sobre una molécula especial de ARNt sec. Una vez que se enlaza el oxígeno de la cadena lateral de la serina sobre la molécula especial de ARNtsec, es reemplazado por el selenio. Este ARNt sec cuenta con un **anticodon** UGA que no se lee como stop, sino que se carga en el sitio A y la lectura continúa. Por lo tanto algunos científicos llamaron a la seleno-cisteína el aminoácido N° 21 No se conocen aún los mecanismos precisos de cuando se sustituye este aminoácido por el **codon** UGA de stop. Aún se sigue investigando.

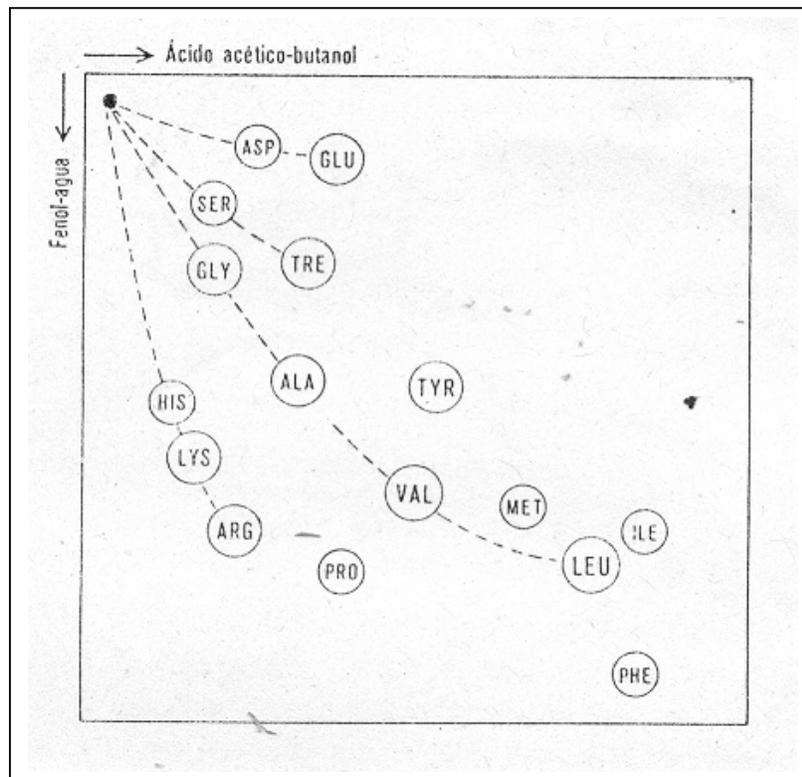
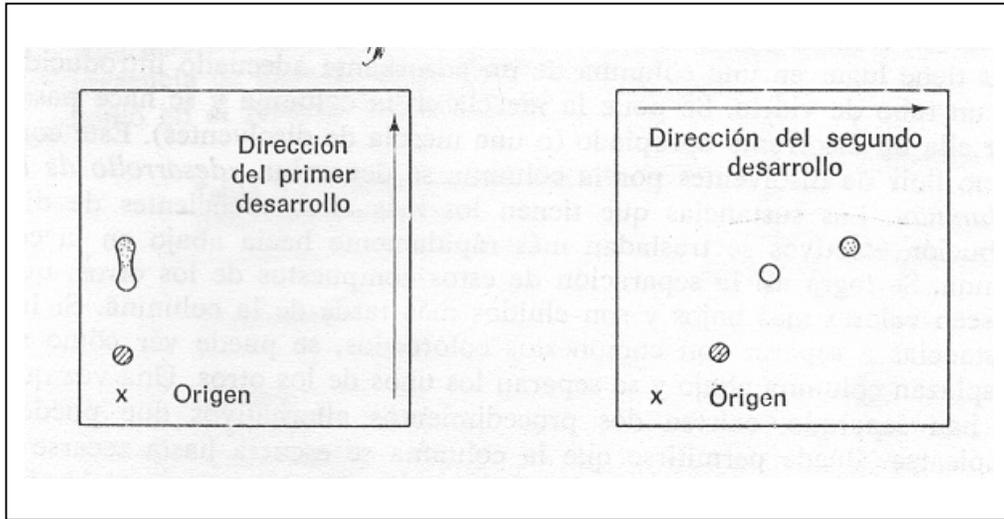
FUENTES.



1).-BIRO Susana, Modelos, Manual del Usuario, ¿Cómo Ves?, Año 5, N° 51.

2).-LOPEZ. M. Agustín, Cáncer, acrilamida y papas fritas, ¿Cómo Ves?, Año 5, N° 56, Julio 2003.

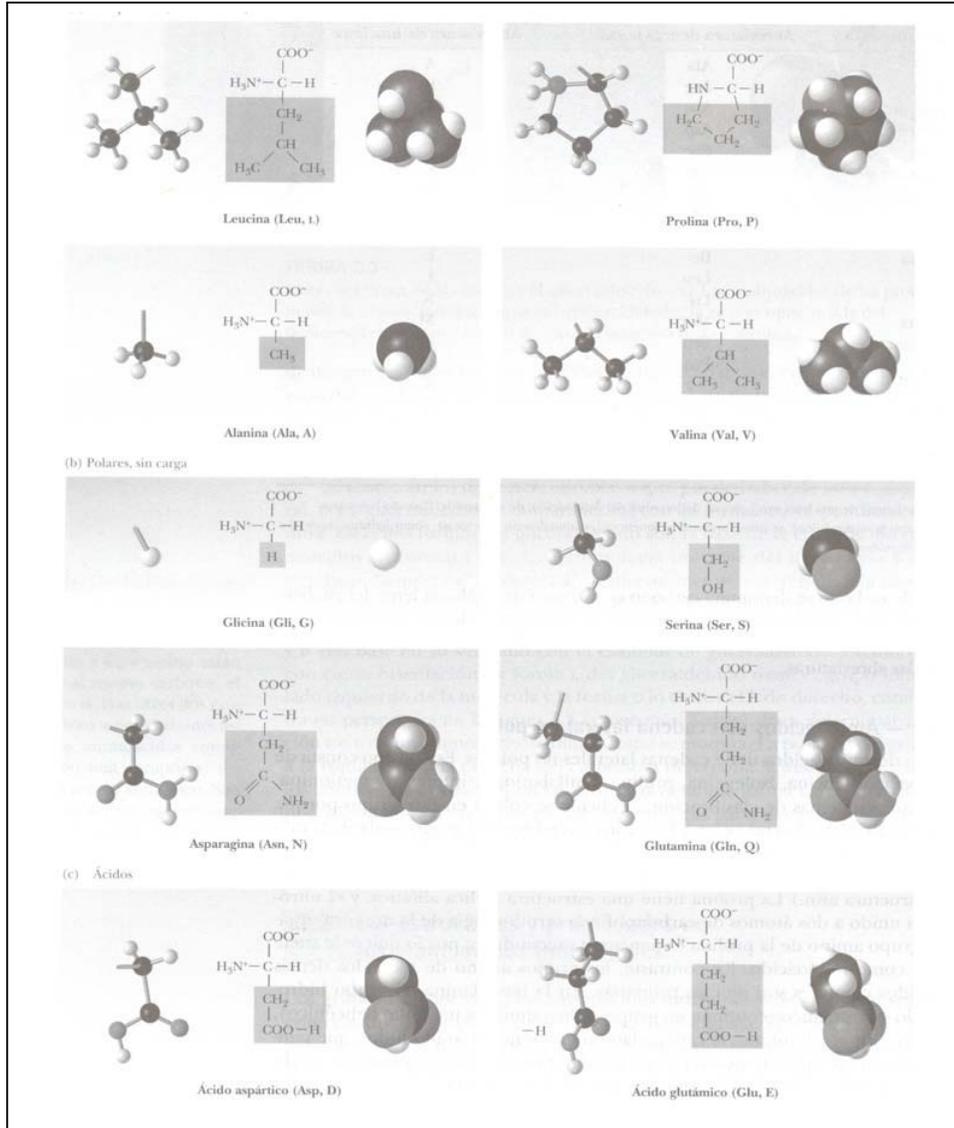
ESQUEMA 4 A



FREIFELDER. Cromatografía Bidimensional de Aminoácidos.

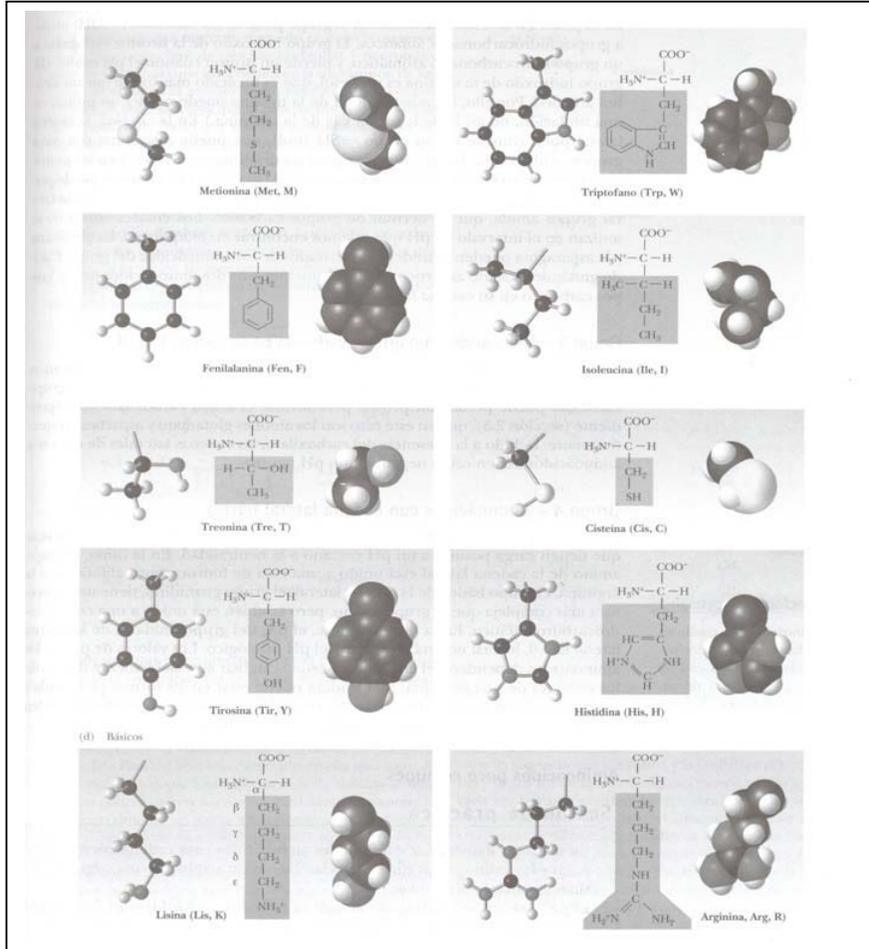
En la cromatografía bidimensional se debe de tomar en cuenta que una vez marcado el punto de origen con la "X", ésta correrá en forma diagonal hacia la contra esquina, por ésta razón es muy importante marcar bien el punto de partida (superior izquierdo o inferior izquierdo). Esta cromatografía es muy útil cuando se trabajan mezclas de disolventes en distintas proporciones, y lo mismo sirve para identificar aminoácidos, mezclas de aminoácidos y mezclas de nucleótidos.

ESQUEMA 4B



CAMPBELL A. Estructuras moleculares de los aminoácidos primera parte.

ESQUEMA 4C



CAMPBELL B Estructuras moleculares de los aminoácidos segunda parte.

ESQUEMA 4 D

Grupo*	Nombre trivial	Abreviatura	pK	pI	Fórmula
A.	Glicina	Gly	2.34; 9.78	6.06	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Alanina	Ala	2.35; 9.69	6.02	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Valina	Val	2.32; 9.62	5.97	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Leucina	Leu	2.36; 9.60	5.98	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Isoleucina	Ile	2.36; 9.68	6.02	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
B.	Serina	Ser	2.21; 9.15	5.68	$\begin{array}{c} \text{OH} \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Treonina	Thr	2.63; 10.43	6.53	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{O} \\ \text{H} \end{array}$
C.	Ác. aspártico	Asp	2.09 (carboxilos α) 3.86 (carboxilos β) 9.82	2.97	$\begin{array}{c} \text{COOH} \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Asparraguina	Asn	2.02; 8.8	5.41	$\begin{array}{c} \text{CONH}_2 \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Ác. glutámico	Glu	2.19 (carboxilos α) 4.25 (carboxilos γ) 9.67	3.22	$\begin{array}{c} \text{COOH} \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Glutamina	Gln	2.17; 9.13	5.65	$\begin{array}{c} \text{CONH}_2 \text{ NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$

BADUI A Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos primera parte.

ESQUEMA 4 E

Grupo*	Nombre trivial	Abreviatura	pK	pI	Formúla
D.	Lisina	Lys	2.18 8.95 (amino α) 10.51 (amino ε)	9.74	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Hidroxilisina		2.13 8.62 (amino α) 9.67 (amino ε)	9.15	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{OH} \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \quad \qquad \qquad \quad \\ \text{CH}_2-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Arginina	Arg	2.17 9.04 (amino α) 12.48 (guanidino)	10.76	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \quad \\ \text{CNHC} \text{---} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH} \end{array}$
E.	Cisteína	Cys	1.71 8.33 (-SH) 10.78 (amino α)	5.02	$\begin{array}{c} \text{SH} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Cistina	CySSCy	1.65; 2.26 (carboxilos) 7.85; 9.85 (aminos)	5.06	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Metionina	Met	2.28; 9.21	5.75	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
F.	Fenilalanina	Phe	1.83; 9.13	5.48	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Tirosina	Tyr	2.20 9.11 (amino α) 10.07 (fenólico)	5.65	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Triptofano	Try	2.38; 9.39	5.88	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Histidina	His	1.82 6.0 (imidazol) 9.17	7.58	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Prolina	Pro	1.99; 10.60	6.30	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$
	Hidroxiprolina	Hypro	1.92; 9.73	5.82	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO} \text{---} \text{C} \text{---} \text{H} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$

BADUI B Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos segunda parte.

ESQUEMA 4F

Nombres y abreviaturas de los aminoácidos comunes		
AMINOÁCIDO	ABREVIATURA DE TRES LETRAS	ABREVIATURA DE UNA LETRA
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutámico	Gln	Q
Glutamina	Glu	E
Glicina	Gli	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lis	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Tre	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tir	Y

CAMPBELL

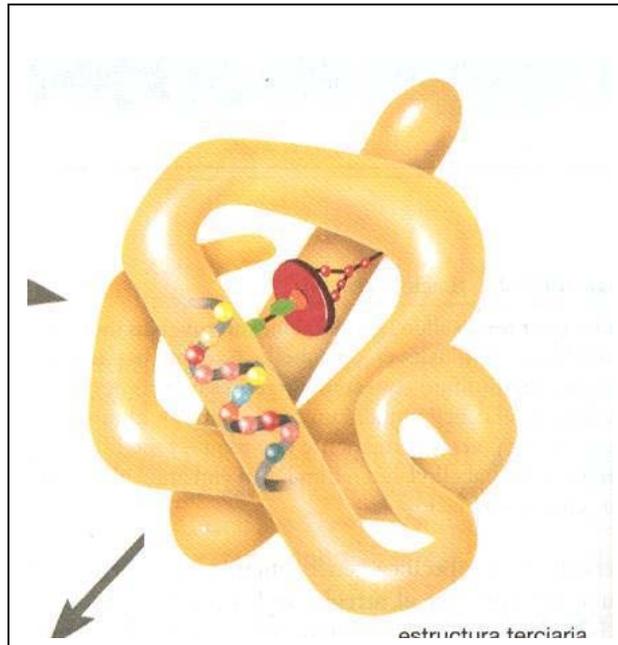
a.a. Abreviatura	<i>Hidrófilo</i>	<i>Hidrófobo</i>	<i>Ácido</i>	<i>Neutro</i>	<i>Básico</i>	<i>Esencial</i>	<i>No esencial</i>	<i>Metabolismo</i>
Ala (A)		X		X			X	G
Arg (R)	X				X	X*		G
Asn (N)	X			X			X	G
Asp (D)	X		X				X	G
Cis (C)	X			X			X	G
Gln (Q)	X		X				X	G
Glu (E)	X			X			X	G
Gli (G)	X			X			X	G
His (H)	X				X	X*		G
Ile (I)		X		X		X		G
Leu (L)		X		X		X		C
Lis (K)	X				X	X		C
Met (M)		X		X		X		G
Fen (F)		X		X		X		C
Pro (P)		X		X			X	G
Ser (S)	X			X			X	G
Tre (T)	X			X		X		G
Trp (W)		X		X		X		C
Tir (Y)	X			X			X	C
Val (V)		X		X		X		G
Propalina								
Selenocisteína								

C = Cetogénicos G = Glucogénicos X* = Son esenciales solo para los niños, no para los adultos

Abreviaturas para los aminoácidos y sus propiedades biofísicas.

CAPÍTULO 5

PROTEÍNAS



Protéios πρώτου

INTRODUCCIÓN



El nombre proteína del griego **τῦ πρῶτου**, **proteios** que significa “**lo primero**”, fue propuesto por Berzelius en 1838.

Regularmente son **polímeros** lineales compuestos por α – aminoácidos con una alta diversidad de funciones y formas. A diferencia de los carbohidratos (polisacáridos), que están formados por polímeros repetitivos, de uno o dos **monómeros**, con periodicidad constante, casi todas las proteínas contienen 20 α – aminoácidos distintos y sin periodicidad, pero con una orientación exacta.

Las proteínas son biomacromoléculas formadas por polipéptidos, en donde un polipéptido consta de 50 ó más a.a. los cuales pueden ser variables en su combinación. Cada polímero está constituido por varios **polipéptidos** que en conjunto forman a las proteínas.

Es importante denotar que el plegamiento de las proteínas se produce mediante una progresiva estabilización de estructuras tridimensionales intermedias, en algunos casos la necesidad de camuflar las cadenas laterales hidrófobas obedece a cuestiones del medio, del pH o de conformación electrostática entre grupos, quedando expuestos solo algunos de ellos (NH_2 Y COO^-). Estas unidades estabilizan a otros intermediarios estructurales para formar plegamientos, **subdominios**, **dominios** y **protómeros** finalmente (las llamadas **PROTEINAS 1^{as}**, **2^{as}**, **3^{as}** y **4^{as}**). Estos **plegamientos** que están, en la mayor parte de las proteínas de las células están asistidos por enzimas.

Las proteínas son compuestos altamente Polimerizados, que están formados por α – a.a. de configuración L.

En ocasiones suelen unírseles compuestos no proteicos. Las proteínas se encuentran entre los nutrientes más importantes, junto con los lípidos y los azúcares.

PIE DE FOTO.



Foto que nos muestra a un físico constructivista campeón mundial Mr. Olimpic, haciendo alusión al desarrollo muscular (1).

5.- PROTEÍNAS

CITA TEXTUAL



*Las células están compuestas en un 90 % de agua. Pero una vez deshidratadas, el 50 % del peso seco de la materia viva son proteínas de muchísimos tipos distintos. Por ejemplo la bacteria *Escherichia coli*, que es uno de los organismos más simple que existen, cuenta con más 40, 000 proteínas diferentes.*

Cada célula fabrica las proteínas que necesita para hacer un trabajo específico, usando la información codificada en sus genes. Ya terminada la proteína viaja a la parte de la célula (o del cuerpo) donde se necesita y empieza a hacer su trabajo.

Las proteínas cumple miles de funciones distintas: son el principal material estructural de los animales (el colágeno, la elastina y la queratina, por ejemplo, son proteínas) Y transportan numerosos materiales a través del sistema circulatorio (La hemoglobina es una proteína que transporta O_2 y CO_2 en la sangre) (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1.- Defina que es una proteína
- 2.- De una clasificación conocida de las proteínas
- 3.- De acuerdo a sus grupos funcionales y unidades monoméricas diga qué características fisicoquímicas presentan las proteínas?

COMENTARIOS



¿Cuántas proteínas necesito yo?

Nuestro cuerpo no tiene una reserva de proteínas comparable con los depósitos de azúcares o de grasas. Las proteínas tienen múltiples funciones, constituyen la piel, los músculos, la sangre, se encuentran en el interior de las células, en algunas hormonas y desde luego en las enzimas.

A groso modo las proteínas se clasifican como:

Proteínas sencillas compuestas a su vez por:

Escleroproteínas o **proteínas fibrilares** (miosina, queratina, elastina, colágeno, fibrinógeno y fibroína de la seda) y por las

Proteínas globulares o **sencillas** (albúminas, globulinas, prolaminas, histonas, protaminas y gluteínas).

Por otra parte se encuentran los **Proteidos** (Gucoproteínas, Cromoproteínas, Lipoproteínas, Fofoproteínas, Nucleoproteínas y Metaloproteínas).

Todas ellas son de gran importancia a la hora de elegir una dieta, dado que los deportistas de alto rendimiento deberían aumentar su ingesta de proteínas hasta los 1.6 – 1.8 g / Kg de peso corporal por día, si el entrenamiento es muy fuerte. Así una persona de 70Kg deberá tomar unos 112 – 126g / día. Más de 2g de proteínas/ Kg de peso diarios pueden provocar lesiones y agotamiento del hígado y del riñón.

Hoy en día se conoce la secuencia completa de más de 10,000 proteínas diferentes y cada una tiene una secuencia única de a.a's.

FUENTES.



- 1).- Foto- PITER Bernal, **MUSCLE & FITNESS**, Año XVIII. N° 220, 2004
- 2).- M.D, **Las Proteínas, ¿Cómo Ves?**, Año 4, N° 37, Diciembre 2001.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de proteínas totales en una muestra biológica, mediante una solución de sulfato de cobre e hidróxido de sodio.

IMPORTANCIA.



El nombre de Biuret es referido a un derivado de la urea que también da positiva esta reacción.

Esta reacción puede modificarse ligeramente para permitir la determinación cuantitativa de las proteínas.

Las proteínas y en especial, los péptidos, en medio alcalino, forman complejos con el ión Cu^{++} con colores característicos.

5.A.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR PRUEBA DE BIURET

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Preparar una dilución de proteína 1:10, tomar 1ml de ésta solución y ponerla en un tubo de ensayo.

II.- En un segundo tubo agregar 3ml de gredetina al 1%

III.- Agregar a los tubos de ensayo de 2 a 10 ml del reactivo de Biuret, en caso de querer intensificar el color, incubar a 50°C hasta que aparezca un color más intenso.

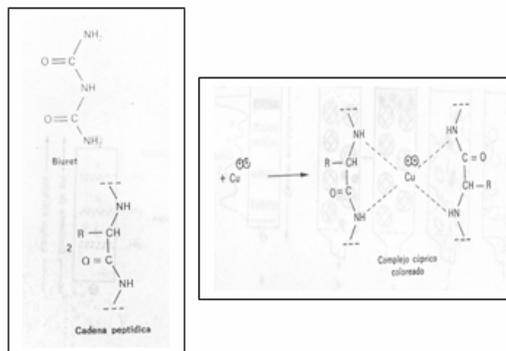
III.- Leer la solución en el espectro a un rango de 500 -570 nm. Si la práctica se desea hacer solo cualitativa, basta con comparar la intensidad de color que hay entre los tubos

R (+) = Del azul intenso al Violeta o rosa.

a).-Preparación del reactivo de Biuret: Hidróxido de sodio al 10% y Sulfato de cobre la 1 %.

b).- Hidróxido de sodio 2M y Sulfato de cobre al 0.01M

FUNDAMENTO



APLICACIÓN.



Es una prueba de rutina muy usual en los laboratorios escolares. Solo en algunos laboratorios de la industria se llega a utilizar cuando no se cuenta con sistemas automatizados.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se debe cuidar el orden de en el que se van colocando los reactivos y se debe manejar la temperatura que se indica, por lo demás, no es una prueba delicada.

CLASIFICACIÓN.

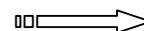
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Evidenciar la presencia de una proteína al ponerla a reaccionar con hidrato de tricetohidrindeno (ninhidrina) en caliente, mediante su reducción en una técnica cromatográfica.

IMPORTANCIA.



Es importante resaltar que es posible realizar una comparación colorimétrica producidos por las cantidades conocidas de una muestra de a.a.'s puros conocidos y tratados de la misma forma.

5.B.- REACCIÓN DE LA NINHIDRINA II – DETECCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS DE UNA PROTEÍNA

MÉTODO- TÉCNICA



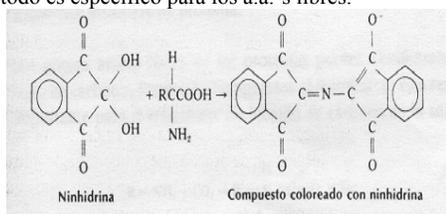
ELECTROFORESIS EN PAPEL

- I.- Cortar una tira de papel de 3x 25 cm y marque el centro (zona de aplicación de la muestra); anotar en el extremo superior derecho la dirección del ánodo (+) y del cátodo (-), con lápiz.
- II.- Tomar una cámara de electroforesis y agregar buffer de boratos a un pH = 8.6, sujetar con unas pinzas la tira de papel y sumergirla en la tina de la cámara; sacarla y escurirla. Colocar la tira en la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones del profesor.
- III.- En la zona de aplicación (marcada con el lápiz), colocar con un tubo capilar una pequeña gota de solución de a.a.'s o de la proteína tratada.
- IV.- Colocar la tapa de la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de poder (negro- negro y rojo – rojo), cerrando el circuito. Realizar la separación a 200 volts. Durante 40' min.
- V.- Pasado el tiempo, desconectar y destapar la cámara, sacar con una pinza la tira de papel (electroforegrama), dejar secar 2' y revelar con ninhidrina a 100° C sobre una parrilla al raz, sin pegar completamente, hasta que aparezca una coloración morada o azulada.

FUNDAMENTO



La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) se reduce, cuando se calienta la solución acuosa con a.a.'s libres. Estos son oxidados con aldehídos, que contienen un carbono menos; permitiendo la liberación de amoníaco y dióxido de carbono. El grupo amino deberá ser alfa respecto al grupo carboxilo, y ambos deberán estar libres. Si el CO₂ liberado se mide cuantitativamente, el método es específico para los a.a.'s libres.



APLICACIÓN.



Su aplicación es todavía valiosa en los laboratorios de nivel superior, de bioquímica, ciencias de la salud y nivel medio superior. Permite llevar la prueba hasta donde el docente lo desee; esto es, puede dejarla en cualitativa o bien, puede hacerla cuantitativa.

¡NOTA IMPORTANTE!



¡Peligro!, el circuito es de alto voltaje, evite el contacto directo.

CLASIFICACIÓN.

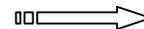
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- MERTZ. T. Edwin, Bioquímica, 3^a/e^d, México, Publicaciones Cultural. S.A., 1977.
- 2.- TOPOREK. R. Milton, bioquímica, 3^a/e^d, México, Intramericana, 1986. (Imagen).
- 3.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM, México, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Hacer presente a los a.a.'s triptofano y tirosina en medio ácido y luego en medio básico.

IMPORTANCIA.



Esta prueba es de gran importancia ya que se utiliza para verificar la presencia de Tirosina libre (por sus grupos fenólicos) y de las proteínas que la contienen.

¡NOTA IMPORTANTE!



No se deberá tomar jamás como indicador de concentración a los colores amarillo (menor concentración) y naranja (mayor concentración), dado que el ácido nítrico produce la aparición del color amarillo y la base, por su parte, evidencia al color naranja.

5.C.- REACCIÓN DE LAS XANTOPROTEÍNAS O REACCIÓN DE MULDER

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Añadir en un tubo de ensayo un pequeño trozo de lana o de seda, enseguida agregar 1ml de ácido nítrico concentrado, calentar y observar el color del tejido.

II.- A continuación alcalinizar la mezcla con una solución de hidróxido de sodio y observar el nuevo virre de color.

R (+) = Amarillo - Naranja

FUNDAMENTO



Al poner a reaccionar una proteína con ácido nítrico y luego con hidróxido de sodio, se hace presente un color amarillo debido a la presencia de los anillos cíclicos y heterocíclicos; posteriormente se transforma en un color naranja.

APLICACIÓN.



Esta prueba resulta de gran utilidad en los prácticas escolares por su corto tiempo de realización, aunque solo se recomienda para los niveles medio superior y medio superior, dada la peligrosidad de sus reactivos.

CLASIFICACIÓN.

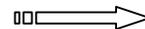
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- BREWSTER. Q .Ray, Curso de química orgánica experimental, España, Alambra, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera semicuantitativa la cantidad de nitrógeno presente en una proteína, proveniente de una muestra biológica.

IMPORTANCIA.



Lo importante de ésta técnica es que se transforman todos los compuestos que contienen nitrógeno en amonio por un proceso oxidativo con ácido sulfúrico concentrado, un catalizador y una sal.

En algunas variantes se acostumbra a agregar un agente oxidante para completar la digestión y hacer transparente la mezcla.

Este procedimiento constituye una importante técnica cuantitativa para la determinación de nitrógeno proteico.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es recomendable que cuando se trabaje con muestras de suero, se utilicen plazos de calentamiento que oscilen entre 30' y 12"; contados a partir del momento en que la mezcla se ha transparentado, es mantenerlas a ebullición durante 30' a 2".

5.D.- REACCIÓN DE KJELDAHL PARTE I

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Agregar 0.2ml de suero sanguíneo (previamente se deja coagular la sangre libremente) en un matraz Kjeldahl de 300ml.
- II.- Añadir 5ml de ácido sulfúrico q. p. 1 g de sulfato de sodio anhidro y 0.2 g de sulfato de cobre en polvo.
- III.- Colocar con cuidado el matraz dentro de una campana de extracción de gases y se procede a la digestión durante 20' min con un mechero o con una parrilla (el matraz debe estar inclinado), dejar enfriar el matraz, agrega 2 ó 3 trozos pequeños limpios de piedra pómez o de tezontle.
- IV.- En seguida agregar 100 ml de agua destilada y 30ml de solución de sosa cáustica al 50%. La adición debe hacerse con el matraz inclinado para que se estratifique en el fondo.
- V.- Conectar el matraz a la bola de Kjendahl del aparato de destilación el tubo el cual debe estar sumergido en un matraz Erlen Meyer de 250ml con 10ml de solución de ácido bórico al 4% más 4 gotas de indicador de Taschiro.
- VI.- Agite le matraz de Kjendahl y aplicarle un micromechero. Destile hasta recoger unos 50ml en el matraz Erlen Meyer y titule su contenido con ácido clorhídrico 0.05N, colocado en una bureta de 50ml, hasta obtener un vire verde o azulado.

FUNDAMENTO



Se transforma el nitrógeno presente de las proteínas por oxidación en una mezcla de digestión que contiene sulfato potásico y sulfato de cobre. Después de alcalinizar se destila el amonio en una solución de ácido bórico y se titula con ácido previamente estandarizado. El nitrógeno proteico se titula como la diferencia entre el nitrógeno no proteico y el nitrógeno total, y posteriormente se transforma en proteínas séricas totales utilizando el factor totalitario.

APLICACIÓN.



Actualmente solo se utiliza en los laboratorios de análisis clínicos para evaluar o estandarizar otras técnicas

CLASIFICACIÓN.

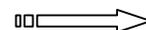
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- HENRY J.Richard et.al., Química Clínica principios y técnicas Tomo I, 2ª/e^d España, Editorial JIMS, 1980.
- 2.- ESCOBAR. Isabel Q.F.B., Química Clínica y pruebas funcionales, procedimientos, México, laboratorios clínicos de México, 1967.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cuantitativa la cantidad de nitrógeno presente en una proteína, proveniente de una muestra biológica.



IMPORTANCIA.

La importancia de ésta técnica consiste en que rescata a la valoración de nitrógeno orgánico (proveniente de aminas y de amidas), así como el nitrógeno no proteico (proveniente de urea, a.a's, etc.).

La valoración se lleva a cabo en un medio muy ácido para finalmente titularse con un álcali de concentración conocida.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante resaltar que las pipetas volumétricas y serológica no deben ser sustituidas o remplazadas. Refiltre el suero cuantas veces sea necesario y use el mismo papel, hasta que éste quede transparente.

5.E.- REACCIÓN DE KJELDAHL PARTE II

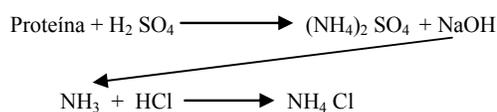
MÉTODO- TÉCNICA



- I.- En un tubo de 15 x 150 ml, agregar con una pipeta volumétrica 0.5 ml de suero sanguíneo.
- II.- En seguida se añadir con una pipeta serológica, 9.5 ml de solución de sulfato de sodio al 22% y mezclar.
- III.- Tapar el tubo y ponerlo en una estufa a 37 °C durante 4 horas por lo menos.
- IV.- Agitar y filtrar el producto en papel Whatman n° 40, colocado en un embudo de vidrio de 5 cm de diámetro, sobre un tubo limpio de 15 X 150 mm. Filtrar las veces necesarias hasta que el líquido quede transparente.
- V.- Con pipeta volumétrica, agregar 4 ml del filtrado anterior, en un matraz Kjendahl de 300ml.
- VI.- A continuación seguir los pasos de la técnica de "Reacción de Kjendahl I," del I al VI.

En ambas técnicas, convertir el total de ml's gastados después de la valoración a gramos de proteínas totales x 100ml de suero multiplicados por el factor 0.875 (que proviene de la fórmula siguiente. $PT = ml \text{ de HCl gastados} \times 100 \times 0.00175 / 0.2$.) Con la fórmula anterior conviene elaborar una tabla en la que se agregue de un lado los ml gastados y del otro lado las concentraciones en g / 100ml de proteínas obtenidas.

FUNDAMENTO



APLICACIÓN.



Es muy útil en los laboratorios de análisis clínicos ya que se utiliza como un patrón de referencia muy fiable en los laboratorios de bioquímica, en las escuelas de nivel superior y en las áreas de las ciencias de la salud.

CLASIFICACIÓN.

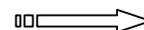
Básico Medio ♦ Superior

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- HENRY J.Richard et.al., Química Clínica principios y técnicas Tomo I, 2ª/e^d España, Editorial JIMS, 1980.
- 2.- ESCOBAR. Isabel Q.F.B, Química Clínica y pruebas funcionales, procedimientos, México, laboratorios clínicos de México, 1967.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar por una técnica colorimétrica la presencia de proteínas libres de amoníaco.



IMPORTANCIA.

Preparar previamente el siguiente reactivo y que por falta de espacio se colocó en éste lugar.

Reactivo de Nessler, según procedimiento de Foling:

Se colocan 30g de yoduro de potasio + 22 g de yodo en 20ml de agua y 30g de mercurio metálico. Todo se coloca en una botella de vidrio con tapón esmerilado y se agita fuertemente durante 7 – 15 min., hasta que se mantenga un color rojo. Se enfría al chorro del agua y de sigue agitando hasta que el rojo cambie a color verde (aproximadamente 15').

Por otro lado se prepara una solución de hidróxido de sodio al 63% y se diluye hasta el 10%, obteniendo 350ml.

Posteriormente se agregan 75ml de la solución de Yoduro doble de mercurio y potasio (I_4HgK_2) + 75 ml de agua destilada. Todo se pasa a un recipiente de 500 ml. Los primeros días se forma un precipitado oscuro en pequeña cantidad que se deposita, se deberá tomar el líquido sobrenadante.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante que tanto en la preparación de los reactivos individuales como en los de la preparación de la práctica no se altere el orden de agregación y se sigan al pie de la letra la calibración del fotocolorímetro.

5.F.- REACCIÓN DE FOLING - WU

MÉTODO- TÉCNICA



I.- El desproteínado de sangre o plasma se debe de tratar por el método de Kejendahl y el amoníaco que se forma, se determina por Nesslerización directa, según las indicaciones de Foling, proceder a preparar simultáneamente el tubo problema y el testigo.

II.- En un tubo de ensayo obtener entre 35 - 50ml de filtrado de sangre libre de proteínas, agregar 1ml de la mezcla de digestión, algunas perlas de vidrio y hervir enérgicamente sobre un mechero, hasta que los humos de anhídrido sulfúrico llenen el tubo (aproximadamente de 3 – 7 min). Reducir la llama manteniendo el líquido en ebullición moderada, tapar el tubo con un embudo y continuar hasta calentar 2' min más, esperar que la solución quede incolora.

III.- Retirar el tubo de la llama, quitar el embudo y dejar enfriar; una vez que la solución quede a temperatura ambiente agregar agua hasta completar 35 ml. Y a continuación, agregar reactivo de Nessler hasta la marca de 50ml.

IV.- Tapar la mezcla con un tapón de goma y mezclar con cuidado, cuando la mezcla sea turbia, proceder a la centrifugación antes de comparar colorimétricamente.

Preparación del testigo: En un matraz de aforo de 100ml de capacidad, agregar 3ml de sulfato de amonio + 2ml de la mezcla de digestión y 50 ml de agua destilada (libre de amoníaco). Agregar 30ml del reactivo de Nessler y terminar de completar con 100ml con agua destilada.

Preparación del blanco: 1ml de mezcla de la digestión + 34 ml de agua y 15 ml de reactivo de Nessler

R (+) = Verde amarillento

Leer al fotocolorímetro con filtro azul (415nm), llevar a cero con un blanco

FUNDAMENTO



La absorción en el espectro visible y sus moléculas coloridas correspondientes, se explican como la energía radiante que es absorbida por las moléculas orgánicas, deslocalizando las nubes electrónicas pi cuando se absorbe radiación ultravioleta y visible. Las absorciones se desplazan hacia la región visible al incrementarse los dobles enlaces pi conjugados. A éste efecto se le conoce como *batocromico*, del griego *bathos*, profundo y *chromos*, color. El color que percibe el ojo humano corresponde al color de la radiación complementaria a la absorbida, si la molécula absorbe una radiación de la región azul (del filtro), el color que percibe el ojo humano es el amarillo (del reactivo) y viceversa.

APLICACIÓN.



Su aplicación es todavía valiosa en los laboratorios de nivel superior, de bioquímica, ciencias de la salud y nivel medio superior. Permite llevar la prueba hasta donde el docente lo desee; esto es, puede dejarla en cualitativa o bien, puede hacerla cuantitativa.

CLASIFICACIÓN.

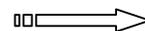
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-VEGA. C .Linda, Manual del laboratorio de bioquímica para M.V.Z; México, UNAM. FESC; ISBN, 1993.

INTRODUCCIÓN



En los últimos años de la década de los 30', los científicos Linus Pauling y Robert Corey realizaron estudios de cristalografía por la técnica de rayos X, precisando la estructura de los aminoácidos, los péptidos y algunas proteínas; entre ellas las del orden primario. Se define como estructura primaria al orden en el que se enlazan en forma covalente los a.a's.

Los péptidos son cadenas lineales de a.a's, que a su vez se mantienen unidas por enlaces iónicos, de hidrogeno y enlaces de Van Der Waals; en donde todos y cada uno de los a.a's llevan un lugar específico a modo de que el péptido sea funcional bioquímicamente hablando.

Por lo general la unión de 2 ó más enlaces péptidicos forman un macropéptido, entre 6 y 50 a.a's, llegan a formar un polipéptido y en algunos casos alcanzan alrededor de los 4000 a.a's. Por ende, una proteína es la unión de varios polipéptidos y está formado por más de 50 a.a's.

Muy importante es reconocer que las proteínas primarias juegan un papel muy importante ya que estas se encuentran como hormonas (insulina con 51 a.a's, gastrina con 34 a.a's, y prolactina y oxitocina con 9 a.a's, etc.)

También están las proteínas de sangre como (las α , β y γ) y aún más importante, las proteínas de membrana celular que permiten la entrada y salida de los nutrientes y otras más como el citocromo con 104 a.a's, la ribonucleasa con 124 a.a's y la lisosima de la clara de huevo con 129 a.a's.

Algunos a.a's son más abundantes en las proteínas primarias como son la Leu, Glu, Ser y Gli; los cuales constituyen el 32% de en estas proteínas de manera general.

Los bioquímicos incluyen en esta definición las interacciones covalentes, incluidos los enlaces de disulfuro que pueden formar las cisteínas.

PIE DE FOTO.



Imagen que representa un collar de cuentas, el cual hace alusión a una proteína primaria (1)

5.1.- PROTEÍNAS SIMPLES – ESTRUCTURA PRIMARIA

CITA TEXTUAL



Operación Proteoma la nueva frontera de la medicina.

Un gen no es otra cosa que una frase formada por combinación de letras en un orden preciso que dicta a la maquinaria celular que proteína tiene que fabricar, por consiguiente, la comprensión básica de la función de las proteínas es esencial para tener una visión completa del proceso genético, y viceversa. En palabras de Vanter, "la proteómica implica el estudio de la función y la relación entre proteínas, así como su papel en las enfermedades". Este tipo de conocimientos empieza a ser explotado por las compañías farmacéuticas para seleccionar los mejores objetivos moleculares, proteínas con las que interactúan selectivamente los fármacos para obtener una respuesta terapéutica favorable.

También ofrece a los bioquímicos la posibilidad de determinar rápidamente el número exacto de objetivos moleculares proteicos efectivos que en ocasiones llegan a contarse hasta 4000 diferentes (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- De el fundamento de Buret
- 2).- ¿Qué es un polipéptido?
- 3).- ¿Cuántos aminoácidos conforman un aminoácido?
- 4).- Prueba que determina proteínas totales.

COMENTARIOS



Las proteínas, como familia de macromoléculas, son las únicas capaces de reconocer e interaccionar con otras macromoléculas muy dispares. Por ejemplo la mioglobina, se une fuertemente a un grupo hemo aún cuando su cadena polipeptídica sólo esté parcialmente plegada.

Otras más sencillas se unen a azúcares o lípidos y hasta a metales. Aunque cada especie animal y vegetal contienen miles de proteínas. Muchas de éstas son iguales en todos los seres vivos, aunque cada especie posea su propio conjunto de proteínas llamadas proteínas específicas.

Dada esta característica tan particular es que gracias a ella se pueden identificar el género y especie de algún animal trasgresor por medio de pruebas bioquímicas que arrojan resultados muy precisos. Hoy en la química legal y en la química forense se puede identificar a un individuo sospechoso gracias a la determinación y clasificación del tipo de cabello.

Otro aspecto importante es reconocer que las glucoproteínas (proteínas unidas a azúcares y que se encuentran en la superficie de los glóbulos rojos) permiten que se lleve a cabo una buena o mala transfusión sanguínea gracias al reconocimiento de estas proteínas de superficie en el laboratorio.

FUENTES.



1).-AUDESIRK Teresa y Gerard, Biología 1, Unidad en la universidad, 4ª/e^d, Printice May, Denver E.E. U.U., 1996.

2).-M. COPEIRAS Enrique, Operación proteoma la nueva frontera de la medicina, Muy Interesante Biotecnología, Año17, N° 04, Abril del 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cualitativa la presencia de proteínas pequeñas presentes en sangre u orina mediante su fragmentación en una electroforesis.



IMPORTANCIA.

Es una técnica sencilla de elaborar y lleva poco tiempo en realizarse, además la muestra utilizada es fácil de obtenerse, aunque cabe aclarar que también se puede usar orina de la mañana concentrada.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuando proceda a tomar por primera vez el papel y a marcar la flecha, hágalo con guantes de látex puestos ya que la grasa e impurezas de las manos pueden interferir en los resultados.

5.1.A.- FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS DEBENCE - JONES

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Extraer de 3- 4 ml de sangre venosa, libre de hemólisis (sin anticoagulante) y separe el suero por centrifugación 2000 r.p.m. durante 10' min.

II.- Proceda a cortar 3 tiras de papel filtro Whatman del N° 1 , de 34 cm de largo x 5 cm de ancho, siguiendo la dirección de las fibras del papel en su longitud, señalar el sentido con una flecha a lápiz.

III.- Tomar con una pipeta de Salí 0.02 ml de suero ó 0.1 ml de orina concentrada; depositar en una tira de papel el volumen de la muestra en forma lineal, como se indica en la siguiente pagina*. Procure que la línea del suero quede a unos 7cm's del extremo de la tira y separada a 1 cm de los bordes de la misma.

IV.- Dejar secar la tira a temperatura ambiente.

V.- Llenar el tanque de "lucita" con un buffer de barbituratos a pH = 8.6 recién preparado, los distintos compartimentos del tanque deberán quedar al mismo nivel.

VI.- Sumergir las tiras las tiras de papel con el suero semi seco y volverlos a sacar.

FUNDAMENTO



Como se sabe todo compuesto químico o bioquímico presenta cargas de polaridad, lo cual le confiere ciertas propiedades de migración en un campo de eléctrico. Las proteínas no son la excepción ya que al tener un extremo carboxilo libre y otro extremo amino libre, conjuntamente con otros grupos funcionales y que además presentan un peso molecular, estos determinarán específicamente hacia donde migrará ésta.

APLICACIÓN.



Es una técnica que se recomienda para los tres niveles escolares, solo que esto dependerá del enfoque que se le de a la misma. Por otro lado la práctica no pierde su importancia en los laboratorios de análisis clínicos.

CLASIFICACIÓN.

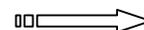
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

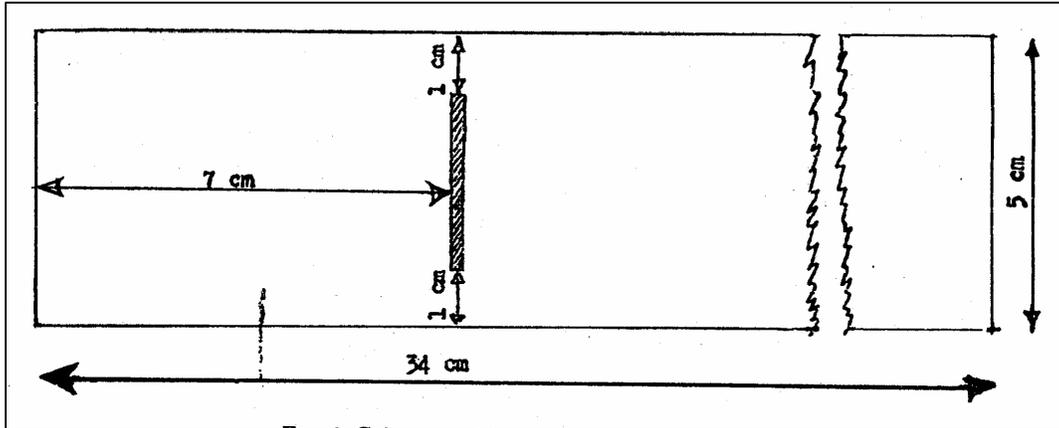
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-ESCOBAR Isabel Q.F.B., Química Clínica y pruebas funcionales, procedimientos, 3^a/e^d, México, Laboratorios Clínicos de México, 1967.

ESQUEMA 5 A



RODIER. Montaje de una electroforesis de Bence – Jones sobre papel filtro Whatman número 1

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la presencia de Triptófano, Tirosina o Fenilalanina en una proteína, valiéndose del reactivo de Millon.

IMPORTANCIA.



Esta prueba se utiliza para evidenciar la presencia de Tirosina libre y de algunas proteínas que lo contienen.

5.1.B.- ENSAYO DE MILLON

MÉTODO- TÉCNICA



I.- En un tubo de ensayo agregar un poco de clara de huevo y en seguida añadir 5 gotas del reactivo de Millon.

II.- Homogeneizar cuidadosamente y después calentar, y observe el vire de color.

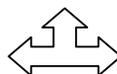
III.- Realiza los pasos I y II nuevamente, pero, ahora con gelatina.

Preparación del reactivo de Millon:

Disolver 10g de mercurio en 20ml de ácido nítrico concentrado y calentar. En seguida diluir la solución resultante en 30ml de agua.

R (+) = Rojo – Anaranjado, para proteínas que contienen Triptófano, Tirosina o Fenilalanina.

FUNDAMENTO



Cuando se pone a reaccionar una mezcla de nitratos y de nítricos mercúrico y mercuroso, se llegan a formar complejos que permiten el reconocimiento de los grupos fenólicos presentes en la tirosina.

APLICACIÓN.



Esta prueba resulta de gran utilidad en los prácticas escolares por su corto tiempo de realización, aunque solo se recomienda para los niveles medio superior y medio superior, dada la peligrosidad de sus reactivos.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tener cuidado con la mezcla de nitratos y nítricos mercuriosos.

CLASIFICACIÓN.

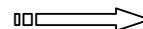
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- BREWSTER. Q. Ray, Curso de química orgánica experimental, España, Alambra, 1978.

INTRODUCCIÓN



Nuevamente en 1951 Pauling y Linus Carl Proponen 2 estructuras periódicas polipépticas llamadas α - hélice y β - plegada lo que les valdría el premio Nobel en 1954.

La β - plegada se caracteriza fundamentalmente de las α - hélice α - hélice en que es una lámina en lugar de un cilindro. Su cadena polipeptídica llamada hebra β , esta completamente extendida en vez de estar estrechamente enrollada. Sus cadenas adyacentes se orientan en la misma dirección o en direcciones opuestas, mientras que la distancia axial entre los a.a's adyacentes es de 3.5 Å. Y una diferencia más es que esta cadena esta estabilizada por puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO de sus mismos filamentos polipeptídicos.

Los giros beta conectan a menudo cadenas β **antiparalelas**; de ahí su nombre. También se les conoce como giros revestidos o pliegues en orquilla.

La α - hélice se considera como una estructura semejante a la de un cilindro, en donde la cadena polipeptídica principal estrechamente forma la parte inferior del cilindro y las cadenas laterales se extienden en una disposición hacia fuera en forma helicoidal. Dicha cadena esta estabilizada por puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO en la misma cadena. El sentido de la hélice va en sentido de las agujas del reloj (dextrógiro). La distancia axial entre los a.a's adyacentes es de 1.5 Å.

Un tipo especial es la triple hélice, esta cadena extracelular contiene 3 cadenas polipeptídicas helicoidales, de unos 1000 residuos de a.a's de longitud, casi cada 3er residuo es Gli. También se encuentra muy presente la Pro, en mayor proporción que en las demás proteínas, además el colágeno contiene 4 - Hidroxiprolina (Hyp), un a.a's que raramente aparece en otros sitios. Una secuencia que aparece regularmente es la de Glicina, Prolina e Hidroxiprolina.

PIE DE FOTO.



Estructura de una secuencia de aminoácidos dispuestos en forma de espiral. Una de las formas relevantes del α de proteínas secundarias (1).

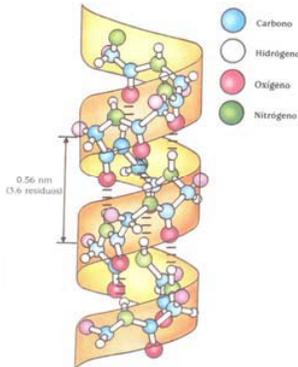
5.2.- PROTEÍNAS SIMPLES - ESTRUCTURA SECUNDARIA

CITA TEXTUAL



Aunque en el ser humano las funciones vitales del pelo son casi nulas y predominan las de carácter psicológico y social, se conserva este ciclo. Al igual que las uñas, el pelo no tiene vida; está constituido por largas cadenas de proteínas, la más importante de las cuales es la queratina. Como todas las proteínas, la queratina está formada por la combinación de aminoácidos. En la queratina en particular predomina el aminoácido llamado cisterna que posee un átomo de azufre. Las cadenas de queratina se acomodan de forma paralela. Si los enlaces se dan de forma paralela y las cadenas proteínicas se mantienen alineadas, tendremos el cabello lacio; si la unión entre azufres se da de forma diagonal, las fibras de queratina forman una especie de espiral y el cabello será rizado. (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1.-¿Con qué muestra se trabaja en la prueba de desnaturalización de proteínas?
- 2.-De el fundamento de la desnaturalización de metaloproteínas.
- 3.- ¿Cuáles son las estructuras de una proteína 2ª?

COMENTARIOS



Las proteínas con estructura α - hélice, se encuentran fácilmente en la **miosina** y la **tropomiosina** del músculo, en la fibrina de los coágulos sanguíneos y en la queratina del cabello y las uñas. Los "cables helicoidales" de estas proteínas ejercen una fuerza mecánica en las fuerzas de las fibras que conforman a estas proteínas los cuales aguantarían varias toneladas si estas se aumentaran al grosor de un cable de alta tensión. Otro ejemplo vivo son las fibras que conforman las púas del puercoespín.

Otro ejemplo relevante es el de la **enzima** digestiva **quimiotripsina** que contiene una proporción de un 10% de α - helicoidal, mientras que la **mioglobina**, contiene más de un 75% de sus residuos a.a's en su forma α - helicoidal, un alto contenido del a.a glicina favorece la formación de α - hélices; a su vez éstas propician la formación de configuraciones β , una forma alterna de la estructura secundaria.

Por otro lado, el colágeno es una proteína fibrosa que compone principalmente la piel, huesos tendones, cartilagos y dientes.

Su triple hélice está formada por 3 cadenas polipeptídicas trenzadas como en una cuerda, es un componente de los huesos y del tejido conectivo en gran proporción; y es la proteína más abundante en los vertebrados. Está organizado de tal manera que forma fibras insolubles en agua, y además es muy resistente.

FUENTES.



- 1).- ONDARZA Raúl, Biología Moderna, 10ª/e^d, México, TRILLAS, 1996.
- 2).-SOSA. R. Ana María, La química del pelo, ¿Cómo Ves?, Año 3, N° 36, Noviembre 2001.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de una proteína con una solución de ácido acético más p-dimetilbenzaldehído, mediante un vire de color conocida como base de ZIF.

IMPORTANCIA.



Las preparaciones de hipófisis dan una reacción positiva al igual que la tiroglobulina mientras que la Tirosina da una reacción negativa.

¡NOTA IMPORTANTE!



El pirrol y sus derivados se volatilizan con los productos de combustión con gran facilidad, por lo tanto no los ponga directamente

5.2.A.- PRUEBA DEL DESDOBLAMIENTO TÉRMICO DE UN IMINOCOMPUUESTO

MÉTODO- TÉCNICA



I.- I.- Se colocan 5 cápsulas de porcelana y agregar unas gotas de la solución a probar:
1) 30 µg de albúmina de huevo 2) 0.1 µg de peptona seca 3) 20 µg de seroalbúmina
4) 100 µg de colágeno modificado 5) 60 µg pancreatina.

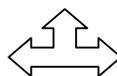
II.- Luego, acidificar con unas gotas de ácido acético glacial saturado más P-dimetilbenzaldehído más una gota de ácido clorhídrico fumante.

R(+) = Vire de color Azul

Poner en contacto un poco de muestra de pirrol impregnado en un papel filtro con una solución al 5% de p - dimetilbenzaldehído en ácido clorhídrico concentrado o en ácido tricloroacético, aparecerá un color violeta.

Los límites de identificación se encuentran cercanos a los 100 µg

FUNDAMENTO



Ya que el triptófano se encuentra casi en todas las proteínas es transformado fácilmente en indol y sus derivados. Y éstos compuestos (amino e iminocompuestos) pueden ser detectados fundiéndolos con cloruro de fluoresceína o con una condensación con el p - dimetilbenzaldehído produciendo así bases coloridas de ZIF.

Las proteínas son fácilmente hidrolizadas por los ácidos minerales fuertes, produciendo finalmente polipéptidos, péptidos y a.a's

APLICACIÓN.



Esta prueba es muy útil en laboratorios de determinación de compuestos orgánicos como en investigación, ya que proporciona una facilidad para el manejo de muestras biológicas.

CLASIFICACIÓN.

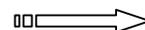
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

INTRODUCCIÓN



Es difícil determinar en donde termina una estructura secundaria y en donde comienza una estructura terciaria, pero es seguro que cuando los elementos de una estructura secundaria interactúan y se repliegan como una unidad globular compacta, se le llama entonces **estructura terciaria**. En estas proteínas el esqueleto se pliega sobre sí mismo para dar una forma esférica, sus secciones helicoidales y de lámina plegada se pueden disponer de modo que los extremos de la cadena queden cercanos entre sí en tres dimensiones.

Estas se refieren a la conformación global de una cadena polipeptídica, o sea, a la disposición tridimensional de todos los restos de a.a.s. Regularmente se estabiliza mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas entre las cadenas laterales no polares y, solo en algunas proteínas, por medio de enlaces disulfuro. Todas estas fuerzas estabilizan las hélices α , las hebras β , los giros y los arrollamientos al azar en un andamiaje interno compacto.

Las proteínas globulares, a diferencia de las fibrosas, son solubles en agua y tienen estructura compacta.

El tamaño y la forma de una proteína de esta naturaleza dependen de la cantidad, el tamaño y la disposición de las estructuras secundarias. Para aquellas proteínas de una única cadena polipeptídica, o proteínas **monoméricas**; dicha estructura suele ser el máximo nivel de organización.

Todas estas interacciones pueden producir cambios sutiles o drásticos en las propiedades de una de la región de un punto distante, en cuanto a su conformación molecular. A las proteínas que presentan esta propiedad se les conoce como **alostéricas**, aunque no todas las proteínas formadas por múltiples subunidades presentan efectos alostéricos.

PIE DE FOTO.



Estructura tridimensional de una proteína terciaria que nos muestra la secuencia de aminoácidos dispuestos en α - hélice (1).

5.3.- PROTEÍNAS SIMPLES - ESTRUCTURA TERCIARIA

CITA TEXTUAL



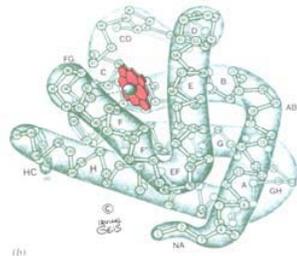
Entre postular la existencia de canales en la membrana de las neuronas y entender como funcionan estos canales hay un mar de conocimiento que era necesario descubrir. El "mar del agua" lo llenó Peter Agre, explicando el funcionamiento de los canales que regulan el tránsito de moléculas de agua hacia y desde la célula - canales a los que llamó "acuaporinas" - , y el "mar del potasio" lo navegó Roderick Mac Kinnon.

Agre diseñó un experimento dramático para examinar la función de la proteína visitante. La real academia lo describe así:

"Colocadas en solución acuosa, las células que tenían la proteína en sus membranas absorbieron agua por ósmosis y se hincharon, mientras que las que carecían de la proteína no resultaron afectadas en absoluto".

Con lo cual coincidió Agre "podremos capitalizar nuestro entendimiento de las acuaporinas para mejorar la medicina", dijo el día que se anunció el premio Nobel. "las posibilidades de (hasta) donde nos llevarán las acuaporinas son ilimitadas". (2)

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Qué es una acuaporina?
- 2).- ¿Cuáles son los 4 aminoácidos que componen a la tropomiosina?

COMENTARIOS



Algunas proteínas no son ni globulares ni fibrosas.

Por ejemplo, la miosina es una proteína del músculo que funciona también en algunos sistemas de contráctiles y es una de las proteínas más grandes que se conocen por poseer más de 1700 residuos de a.a.s en su cadena polipeptídica. La miosina no es una proteína fibrosa, sin embargo, es mucho menos compacta que una proteína globular y parece asumir una conformación extendida en solución.

Un grupo importante de proteínas fibrosas es el de las queratinas, que son considerados los principales componentes de la lana, pezuñas, uñas, garras, escamas, pelo y picos de diferentes aves.

Las colágenas son Glicoproteínas compuestas básicamente por Hidroxiprolina, Prolina, Glicina y Alanina. De la misma manera, la colágena forma una triple hélice unida por enlaces transversales dando un material rígido e inextensible. Por ejemplo, la seda, la tropomiosina y la paramiosina.

La estructura terciaria puntualiza el ordenamiento espacial de subunidades o cadenas polipeptídicas provenientes de estructuras 1^{as} y 2^{as}, y la naturaleza de sus contactos mutuos por los enlaces químicos tienen una principal importancia biológica.

FUENTES.



1).-KARP Gerard, Biología Celular y Molecular, Mc-Graw-Hill Interamericana, Universidad de Florida 1996.

2).-CRUZ Javier, Ciencia de agente aduanal, ¿Cómo Ves?, Año 6, N° 63, Febrero 2004.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Evidenciar la presencia de una proteína valiéndose de la prueba de Maclagan, sacando la diferencia entre un patrón sin suero y la lectura del suero en un espectrofotómetro.

IMPORTANCIA.



Esta prueba es de gran relevancia ya que se vale de métodos y de técnicas de gran precisión para la identificación de una proteína.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante resaltar que la toma de la muestra de suero deberá provenir de una persona en ayunas ya que la digestión altera los resultados.

La conservación de solución amortiguadora y de solución de timol y veronal, se hará a temperatura ambiente y al abrigo del aire, descarte una solución turbia.

5.3.A.- PRUEBA DE TIMOL O PRUEBA DE MACLAGAN

MÉTODO- TÉCNICA



I.-Tomar 2 tubos y etiquetarlos, uno como tubo problema y otro como tubo patrón.

II.-Añadir a ambos 0.1 ml de suero, al problema 6 ml de solución amortiguadora y al tubo patrón agregar 6 ml de solución de timol y veronal mezclar con cuidado.

III.-Dejar reposar 30min, proceder a la lectura con un espectrofotómetro (usar filtro rojo a 750 nm).

Restar la densidad óptica obtenida del tubo patrón menos la densidad óptica del suero.

Construir una curva de calibración previa y compare sus datos problema.

*Preparación de la solución de veronal y timol.

Veronal Sódico = 1.03g

Veronal = 1.38g

Timol pulverizado = 3g

Agua destilada c.s.p. = 500ml

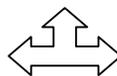
Calentar la mezcla casi hasta ebullición, agitar y dejar enfriar a temperatura ambiente, la solución se enturbia al enfriarse, agregar una pequeña cantidad de timol cristalizado, tapan y dejar reposar toda una noche a temperatura ambiente.

Al siguiente día mezclar de nuevo y filtrar. Ajustar el pH con un pH metro (agregando veronal sódico)

* La preparación de la solución buffer a pH = 7.55, es idéntica al reactivo anterior, pero con la ausencia de timol.

Se recomienda realizar una curva de calibración previa y apropiada al problema, tomando en cuenta la preparación del blanco además del patrón y el problema.

FUNDAMENTO



Esta prueba es considerada como una reacción de floculación a la cual se le agregan diversos reactivos que provocan la precipitación de ciertas proteínas (albúmina, globulina, lipoproteínas, gammaglobulinas y alfa proteínas) debido a la desnaturalización de las mismas.

APLICACIÓN.



Al ser una prueba meramente cuantitativa y que además se apoya en una curva de calibración, la hace una prueba muy útil para los laboratorios de nivel superior y en algunos casos de investigación.

CLASIFICACIÓN.

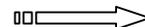
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- RODIER J. y MALLÉN . R., Manual de Bioquímica Práctica, técnicas para el uso de los laboratorios de análisis clínicos, 3^a/e^d España, Editorial JIMS, 1970.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cuantitativa la concentración de una proteína (albúmina) mediante una técnica espectrofotométrica y el método de curva patrón.

IMPORTANCIA.



Es importante que prepare los siguientes reactivos previamente:

Sol. A = Na_2CO_3 al 2% en NaOH al 0.N

Sol. B = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5% en tartrato de sodio y potasio al 1%

Sol. C = 50 partes de A con una parte de B, en el momento de usarse.

Patrón de proteína = albúmina 1g / 100ml

Reactivo de Folin diluido 1:1 con agua destilada en el momento de usarse.

¡NOTA IMPORTANTE!



Elegir la longitud de onda adecuada, calibre el aparato a cero de transmitancia antes de meter la celda con el blanco, no meter las celdas escurriendo, llenar hasta la marca. Las celdas deberán ser correspondientes al grosor y al diámetro que marque el equipo.

5.3.B.- PRUEBA DE LOWRY

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Hacer una dilución previa de calostro 1:1000 con agua destilada

II.- Preparar la siguiente serie de tubos.

Tubo n° 1: 0.05 ml de patrón de proteína, 0.95 ml de agua destilada y 0 ml de calostro.

Tubo n° 2: 0.10 ml de patrón de proteína, 0.90 ml de agua destilada y 0 ml de calostro.

Tubo n° 3: 0.20 ml de patrón de proteína, 0.80 ml de agua destilada y 0 ml de calostro.

Tubo n° 4: 0.30 ml de patrón de proteína, 0.70 ml de agua destilada y 0 ml de calostro.

Tubo n° 5: 0.40 ml de patrón de proteína, 0.60 ml de agua destilada y 0 ml de calostro.

Tubo n° 6: 0.50 ml de patrón de proteína, 0.50 ml de agua destilada y 0 ml de calostro.

Tubo n° 7: 0.00 ml de patrón de proteína, 0.00 ml de agua destilada y 0.3 ml de calostro.

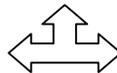
III.- Tomar 0.3 ml de cada uno de los tubos y se pasar a 7 tubos diferentes marcados previamente y añadir 2.5 ml de solución C, dejar reposar durante 15' min a temperatura ambiente.

IV.- Agregar 0.5ml de reactivo de Folin diluido a cada uno de los tubos y esperar un reposo de 20' min.

V.- Tomar la lectura de densidad óptica para cada uno de los tubos en un fotocolorímetro con filtro rojo o usar un espectrofotómetro con longitud de onda de 750 nm.

VI.- Elaborar una curva patrón en donde el eje de las "X" contenga los valores de densidad óptica y en el eje de las "Y" contenga la concentración de proteína en g / 100ml; por último, interpolar el valor del tubo n° 7.

FUNDAMENTO



Es importante destacar que las especies que se van a leer deben presentar color y que la concentración de éste esta directamente relacionada con la transmitancia y ésta a su vez esta en proporción a la concentración de biomoléculas.

APLICACIÓN.



Al ser una prueba meramente cuantitativa y que además se apoya en una curva patrón, la hace una prueba muy útil para los laboratorios de nivel superior y en algunos casos de investigación.

CLASIFICACIÓN.

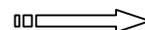
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-VEGA. C .Linda, Manual del laboratorio de bioquímica para M.V.Z; México, UNAM. FESC; ISBN, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de albúmina en una muestra biológica, mediante el enturbiamiento de la misma para demostrar la validez de la prueba.

IMPORTANCIA.



Es importante reconocer que si la orina presenta albúmina y otras proteínas es preferible realizar la investigación de Bence – Jones por electroforesis Siguiendo la misma técnica que para suero sanguíneo, pero agregando solo 0.1ml de muestra de orina concentrada por liofilización o por diálisis.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuando acidifique la orina tenga cuidado de no acidificar demasiado.

5.3.C.- PRUEBA DE HARRISON

MÉTODO- TÉCNICA



* **Determine por la técnica de Bence – Jones la presencia de albúmina en orina y proceder con la prueba de Harrison.**

I.- Tomar un trozo de papel filtro para café, filtrar aproximadamente 20 ml de orina y acidificar con una solución de ácido acético al 33% hasta obtener un pH aproximado a 6.5 (compare con papel indicador pHydrion).

II.- Tomar 3 tubos de ensayo y colocar en 2 de ellos la orina acidificada y el tercero dejarlo como testigo.

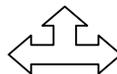
III.- Tomar un tubo de ensayo y colocarle un termómetro dentro, llevar éste tubo a un vaso de precipitados con agua de 250ml, colocar el vaso de precipitados en una fuente de calor. Agitar el agua con un agitador para que la temperatura ascienda homogéneamente.

IV.- Cuando la temperatura de la muestra oscile entre los 40 – 60° C, observar si se produce algún cambio con respecto a la orina acidificada y al control. Si se produce algún enturbiamiento llevar el agua hasta ebullición con lo cual se precipita la albúmina y otras proteínas presentes.

V.- Dejar descender la temperatura aproximadamente a 50° C y si existen proteínas presentes aparece un enturbiamiento en la muestra.

VI.- Filtrar la orina en caliente usando papel filtro para cafetera. Puede resuspender las proteínas y realizar una electroforesis si así lo desea.

FUNDAMENTO



La proteína de Bence – Jones es una globulina que está clasificada entre las β y las γ y debe aparecer un enturbiamiento cuando la temperatura descienda alrededor de los 50° C, debido a los cambios de pH y temperatura que favorecen la desnaturalización de la proteína

APLICACIÓN.



Es una práctica muy útil para el nivel medio superior y sobre todo para el área de las ciencias de la salud ya que hace presente a la albúmina como un metabolito del organismo.

Esta práctica bien puede ser adecuada al nivel medio superior.

CLASIFICACIÓN.

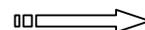
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-ESCOBAR Isabel Q.F.B., Química Clínica y pruebas funcionales, preedimientos, 3^a/e^d, México, Laboratorios Clinicos de México, 1967.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de una proteína con la sal de potasio del éster etílico de la tetrabromofenoltaleína, mediante un vire de color.

IMPORTANCIA.



La reacción parece ser selectiva de las proteínas nativas. Los di, los tripéptidos o las peptonas no reaccionan.

Los alcaloides, cuando están presentes en grandes cantidades, muestran un comportamiento similar al de las proteínas nativas. Probablemente debido a la formación de compuestos de adsorción de los alcaloides dispersos en forma coloidal con el éster de la tetrabromofenoltaleína que son resistentes al ácido acético diluido.

Otros a.a.'s que dan reacción positiva son: La salmina, la edestina, la gliadina y la clupeína.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure no usar muestras a identificar que estén contaminadas con alcaloides, ya que darán un falso positivo.

5.3.D.-- PRUEBA DEL ÉSTER ETÍLICO DE LA TETRABROMOFENOLTALÉINA.

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación de la solución. Solución al 0.1% de la sal de potasio del éster etílico de la tetrabromofenoltaleína en alcohol.

I.- Colocar 4 cápsulas de porcelana y agregar unas gotas de la solución a probar:

- 1) 0.5 µg de albúmina de huevo
- 2) 0.5 µg de hemoglobina
- 3) 0.5 µg de caseína
- 4) 0.35 µg de albúmina serosa

II.- En seguida agregar una gota de la solución y luego acidificar con una gota de ácido acético 0.2 N

Una prueba testigo da color amarillo pero si el color azul verdoso persiste, esto indica que la muestra contiene proteínas.

Una gota de proteínas patológicas incrementadas puede ser detectado en una gota de orina por medio de ésta prueba.

FUNDAMENTO



El éter etílico de la tetrabromofenoltaleína es amarillo (en solución o sólido), mientras que sus sales alcalinas solubles en agua, son de color azul. Pueden descomponerse con el ácido acético diluido con regeneración del fenol. Si el éster se pone en contacto con las proteínas en estado coloidal, aparecerá in color azul. Aparentemente debido la formación de una sal que no se descompone con el ácido acético. Dicho efecto es mostrado fuertemente por el éster de la tetrabromofenoltaleína, en su forma estable de sal de potasio, cuya solución azul vira a amarilla (es el color del éster libre) con el ácido acético diluido, pero el azul persiste en presencia de las proteínas. El color azul cambia cuando se adiciona más ácido acético concentrado o ácidos minerales.

APLICACIÓN.



Esta prueba es muy útil en laboratorios de determinación de compuestos orgánicos como en investigación, ya que proporciona una facilidad para el manejo de muestras biológicas.

CLASIFICACIÓN.

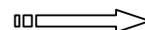
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- FEIGL Fritz, Pruebas ala gota en análisis orgánico, 7^a/e^d, México - UNAM, Manual Moderno, 1978.

INTRODUCCIÓN



La estructura cuaternaria se define como el resultado de las interacciones polipeptídicas individuales de una proteína que contiene más de una **subunidad**. Un ejemplo vivo es la hemoglobina.

La estructura tridimensional de la hemoglobina fue determinada por Perutz en 1936, cuando dejó Austria para realizar su tesis doctoral en el país de Inglaterra con el tema de la hemoglobina.

Perutz escoge principalmente la mioglobina extraída del músculo esquelético del cachalote por ser estable y formar cristales. Los mamíferos nadadores como la foca, el delfín y el cachalote son ricos en mioglobina que les sirve como almacén de oxígeno cuando se sumergen bajo el agua durante largos periodos.

En 1957, Kendrew y sus colaboradores observaron las posiciones de 1260 átomos, que estaban claramente definidas con una gran precisión.

El éxito llegó cuando obtuvieron una imagen de densidad electrostática a baja resolución, de la oxihemoglobina de caballo en 1959.

Esta proteína portadora de oxígeno en el músculo consta de una única cadena polipeptídica de solo 153 a.a.'s y tiene una masa de 18 Kd. Los aa's que más sobresalen son la Lisina, el Glutamato y Histidina; de hecho, las mutaciones se dan específicamente en éstos a.a.'s. Su capacidad para enlazar oxígeno depende de la presencia de un grupo prostético (ayudador), llamado hemo.

Las dimensiones son de 45Å x 35Å x 25Å y consta de ocho α - hélices y cada una de éstas tiene contacto con dos cadenas β ; por el contrario, existen muy pocas interacciones entre las 2 cadenas α o de las 2 cadenas β entre sí.

Los cuatro lugares de unión del oxígeno están separados y la distancia más próxima entre los dos átomos de hierro es de 25Å°, proporcionándole una gran estabilidad.

PIE DE FOTO.



Modelo que nos muestra una estructura tridimensional de una proteína cuaternaria (globular), semejante a la hemoglobina (1).

5.4.- PROTEÍNAS SIMPLES – ESTRUCTURA CUATERNARIA

CITA TEXTUAL

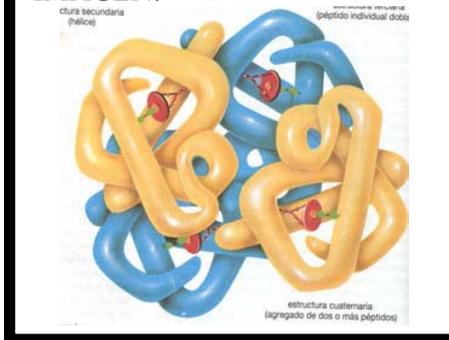


Para que el sistema inmune pueda llevar a cabo sus funciones de manera adecuada debe ser capaz de distinguir las células, tejidos y órganos que son parte del individuo, de aquello que es extraño o "no propio": El complemento, por su parte, está compuesto por más de 30 proteínas distintas que circulan en la sangre. Estas proteínas actúan como "municiones", que en presencia del agente extraño son activadas para reaccionar entre sí en cadena, lo que lleva a la formación de agujeros o poros en la membrana de la célula invasora y resultan en su rompimiento y destrucción.

Además, algunos anticuerpos pueden activar a las proteínas del complemento que son las que forman agujeros en las células invasoras.

Las células plasmáticas mueren tras un par de semanas de secreción intensiva de anticuerpos, mientras que los anticuerpos son gradualmente degradados en semanas o meses (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Qué identifica el ensayo de Millon?
- 2).- ¿Cuál es el color de virre para los Xantoproteínas?
- 3).- ¿Cómo se define a una estructura 2ª?
- 4).- ¿Cómo se le llama a la proteína cuando está formada por 2 subunidades?

COMENTARIOS



Muchos son los ejemplos de proteínas cuaternarias, una de ellas, la que más salta a la vista es que son una serie de cadenas polipeptídicas, en donde cada cadena es una subunidad y, en donde cada subunidad puede variar (sus cadenas pueden ser idénticas o distintas). Básicamente se clasifican en dímeros, trímeros y tetrámeros, formados regularmente por 2,3, ó 4 cadenas polipeptídicas, respectivamente. Cuando la proteína esta formada por 4 subunidades se le llama **oligómero**.

Cabe aclarar que las cadenas del oligómero interactúan entre sí en forma no covalente, mediante atracciones electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Una proteína formada por más de un **protómero** es una proteína oligomérica.

La diferencias entre la hemoglobina y la mioglobina son imperceptibles: Los protómeros α y β de 141 y 146 residuos de a.a.'s, así como la molécula de mioglobina de 153 residuos, son muy semejantes en cuanto a su conformación y secuencia de a.a.'s.

La clave en su diferencia estriba básicamente en su estructura tetramérica (formada por 4 protómeros) $\alpha_2\beta_2$ de la hemoglobina, en particular de las interacciones entre los protómeros; dado que la unión con el oxígeno es muy semejante par ambos casos.

FUENTES.



- 1).- AUDESIRK Teresa y Gerard, Biología 1, Unidad en la universidad, 4ª/e^d, Printice may, Denver E.E. U.U., 1996.
- 2).-VARGAS. P. Laura del Carmen, Las guerras del cuerpo, ¿Cómo Ves?, Año 2, N° 24, Noviembre 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de una proteína conjugada mediante la desnaturalización de la misma valiéndose de distintos agentes físicos y químicos.

IMPORTANCIA.



La desnaturalización de una proteína se puede dar por diversos factores, entre ellos por la adición de solventes orgánicos hidrosolubles, por agentes básicos o ácidos que varíen drásticamente el pH, y la agitación brusca.

Las consecuencias pueden ser variadas entre ellas. Una pérdida de la actividad biológica, un descenso en la solubilidad del punto isoeléctrico, un aumento en la reactividad de algunos grupos funcionales y la modificación asimétrica de las biomoléculas, esto es, un cambio conformacional en su estructura original.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cerciórese que los tubos estén bien secos y tenga cuidado al manejar los ácidos y las bases concentradas ya que son reactivos corrosivos

5.4.A.- PRUEBA DE DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR COAGULACIÓN.

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Poner en una gradilla 5 tubos de ensayo limpios y bien secos, y etiquetarlos.
- II.- Agregar a todos los tubos 2 ml de clara de huevo.
- III.- Colocar un termómetro en su interior, cuidando que no toque el fondo o las paredes, trasladar al fuego bajo y anotar en que temperatura comienza a coagular la clara.
- IV.- Al tubo n° 2, añadir 4ml de etanol y observar que pasa.
- V.- Al tubo n° 3, agregar unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y observar que pasa.
- VI.- Al tubo n° 4, agregar unas gotas de ácido nítrico concentrado y observar que pasa.
- VII.- Por último, al tubo n° 5, agregar unas gotas de solución de hidróxido de sodio concentrado y observar que pasa.

FUNDAMENTO



La desnaturalización es la pérdida de la conformación original de la biomolécula y además, un cambio desde un orden muy específico a una nueva conformación al azar.

APLICACIÓN.



Es muy socorrida en las prácticas del laboratorio escolar para determinar la presencia de proteínas conjugadas, aunque se usa en nivel básico, no es recomendable por la peligrosidad de los reactivos.

CLASIFICACIÓN.

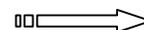
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- BREWSTER. Q. Ray, Curso de química orgánica experimental, España, Alambra, 1978.

INTRODUCCIÓN



En forma natural, las proteínas suelen asociarse con otras biomoléculas (grupos prostéticos) como los carbohidratos, los lípidos, las vitaminas y los minerales; aunque cabe aclarar que algunas asociaciones suelen resultar benéficas o también maléficas por el metabolismo humano. A éstas asociaciones se les conoce como **protéidos** o también como **proteínas conjugadas**.

Suelen dividirse en varias clases dependiendo de la naturaleza del grupo prostético:

Las cromoproteínas. Son proteínas combinadas con pigmentos. Por ejemplo, la **hemoglobina**.

Las glucoproteínas. Se combinan con carbohidratos. Por ejemplo, la **musina**, que esta en la saliva.

Las lipoproteínas. Que son proteínas combinadas con lípidos. Por ejemplo, aquellas que se encuentran en el suero de la sangre y que nos indican una arterioesclerosis cuando se detectan en altas concentraciones.

Las fosfoproteínas. Son aquellas que se combinan con el ácido fosfórico. Por ejemplo, la caseína de la leche.

Las metaloproteínas. Que están combinadas con metales. Por ejemplo, la **ceruloplasmina** (proteína azul del suero con 8 átomos de cobre) que se encarga de regular la distribución del cobre en el organismo.

Las nucleoproteínas. Son proteínas unidas a una biomolécula muy especial, los ácidos nucleicos. Ejemplo, las **histonas** de los **nucleosomas**.

Como se ha visto este tipo de asociaciones permiten una gran diversidad de combinaciones y gracias a esta puede existir la vida como hoy la conocemos. “La naturaleza se perfecciona en cada recapitulación y no deja nada al azar”.

PIE DE FOTO.



Estructura molecular que representa a una proteína o biomolécula en fase de terminación. Biota.org. pretende promover el desarrollo de organismos y ecosistemas sintéticos (1).

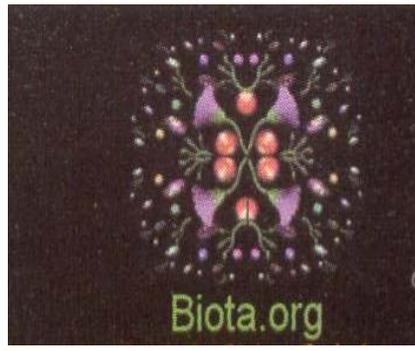
5.5.- LOS PROTÉIDOS

CITA TEXTUAL



La cola de algunas lagartijas es un sitio para almacenar grasas y proteínas, por lo que desprenderse de ella no solo implica un gasto energético para cerrar la herida y crear una cola nueva, también la pérdida de los nutrientes almacenados, la cual puede ocurrir en tiempos críticos, como son la gestación o cuando el alimento es escaso. Sin embargo deshacerse de una parte del cuerpo tiene sus costos: afecta el desarrollo y las posibilidades de reproducción y supervivencia. Se sabe que en las formas juveniles la regeneración de la cola es más fácil y rápida, no obstante, la nueva cola nunca será como la original y siempre existirán cambios en su robustez, coloración y escamación (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Con qué otro nombre se le conoce a la reacción de las Xantoproteínas?
- 2).- ¿Qué es una metaloproteína?
- 3).- Fundamento de la reacción de Kjeldahl

FUENTES.



- 1).- Biota. Org. “The Digital Biology Project” www.biota.org.
- 2).-BALDERAS – VALDIVIA Carlos Jesús, Lo interesante está al final, la cola de los reptiles, ¿Cómo Ves?, Año 4, N° 41, Abril 2002.

COMENTARIOS



Otro tipo de proteínas son, las proteínas globulares conjugadas y se encuentran en la naturaleza unidas a **grupos prostéticos**. Suelen dividirse en varias clases dependiendo de la naturaleza del grupo prostético con el que se asocian. Dichas asociaciones suelen favorecerse cuando se suceden algunos cambios físicos y químicos (agentes oxidantes, reductores, álcalis, actividad acuosa, actividad enzimática, concentración de la proteína y por supuesto temperatura elevada). Por ejemplo, en el caso de la temperatura, cuando esta se eleva, se llegan a producir enlaces covalentes, presentes en los azúcares reductores y en los grupos amino de las proteínas.

Algunas proteínas se asocian con otros complejos, como las vitaminas que forman la **biotina** del huevo; y otras del grupo B que producen **complejos** con las proteínas y a su vez pueden disociarse con algún tratamiento térmico.

La influencia de dichas interacciones se ve marcada entre la **carboximetilcelulosa** (proteína conjugada de origen vegetal) y la β - **lactoglobulina** que hacen que la proteína varíe su punto isoeléctrico, cambiando la estabilidad de la molécula dependiente del pH y de la fuerza iónica de un sistema.

Otro ejemplo es el complejo que se forma entre proteína – pectina que le dan la propiedad de estructura rígida a la membrana celular en el jitomate y su derivados

Aunque no todos los cambios son favorables.

Por ejemplo, la calidad nutritiva de las **proteínas conjugadas** y **no conjugadas** depende de mucho de la **biodisponibilidad** de sus a.a.'s, por ésta razón cuando una proteína se altera pueden suceder algunos cambios químicos que dañen a algunos grupos específicos de los a.a.'s, exponiéndolos o destruyéndolos. Esto reduce la digestibilidad de las proteínas, lo cual es suficiente para reducir su valor nutricional.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar el pH (una solución ácida y una básica) y la cantidad necesarias para disolver una metaloproteína, en caliente y en frío.



IMPORTANCIA.

Estas reacciones son de gran importancia para determinar si el efecto observado obedece a estímulos de pH o de temperatura o de ambos.

En consecuencia, los a.a.'s y las proteínas pueden perder o ganar protones, por ende el pH va a influir en el número de cargas positivas o negativas, determinando el punto isoeléctrico.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cerciórese que los tubos estén bien secos y tenga cuidado al manejar los ácidos y las bases concentradas ya que son reactivos corrosivos.

5.5.A.- DETERMINACIÓN DE METAPROTEÍNAS

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Agregar a un tubo de ensayo 10 ml de solución de clara de huevo y enseguida añadir 10 ml de ácido clorhídrico 0.1M, luego llevar a baño maría durante 10 min.
- II.- Enfriar el tubo cuidadosamente al chorro del agua y añadir una solución de hidróxido de sodio 0.1 M desde una bureta, hasta alcanzar el punto máximo de precipitación de la metaloproteína.
- III.- Determinar el valor de pH de la solución problema utilizando una tira reactiva o con un indicador en solución.
- IV.- Enseguida agitar el tubo hasta formar una suspensión con el precipitado y repartir en partes iguales en 4 tubos de ensayo.
- V.- Calentar 2 de los tubos a baño María durante 10 min.
- VI.- A los 2 tubos fríos, agregar a uno, ácido clorhídrico 0.1 M y al otro hidróxido de sodio 0.1 M; determinando el número de gotas necesarias para disolver la metaloproteína contenida en los tubos.

FUNDAMENTO



Todas las proteínas al igual que los a.a.'s, al contener más de un grupo carboxilo o más de un grupo amino en sus extremos terminales o descubiertos; se vuelven susceptibles a los cambios de pH. Por ésta razón las soluciones ácidas o básicas van a producir un cambio en la metaloproteína.

APLICACIÓN.



Es una prueba muy útil en los niveles medio superior, superior y elemental; aunque en ésta última no es muy recomendable su práctica ya que resulta peligrosa para ese nivel.

CLASIFICACIÓN.

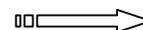
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- BREWSTER. Q. Ray, Curso de química orgánica experimental, España, Alambra, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determine la presencia de una proteína (caseína), mediante una reacción de polimerización con un ácido y una base.

IMPORTANCIA.



El pegamento es tan eficaz como los que se venden en las papelerías de marcas comerciales, solo que tiene una desventaja, su caducidad es muy breve, menor a unos días, para ser precisos 3 días.

¡NOTA IMPORTANTE!



Este pegamento tiene una cohesión mediana de adherencia y su caducidad es de poca duración.

5.5.B.- REACCIÓN DE LA CASEÍNA – PEGAMENTO LACTEO

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Conseguir un cubo de leche y poner a calentar un poco, casi a punto de hervir, esperar a que se forme una natilla.
- II.- Tomar la natilla, agregar un poco de vinagre casero y homogeniza la natilla.
- III.- Observar como se lleva acabo la reacción formándose una fracción líquida y otra sólida constituida por cúmulos de caseína.
- IV.-Una vez obtenidas ambas fracciones, proceder a separarlas con un embudo y un papel filtro. El suero obtenido te puede servir para la determinación de proteínas solubles en otra práctica o para hacer un derivado de “Yakult”.
- V.-Por otro lado, la pasta sólida se escurre bien y se machaca con una cuchara y enseguida añadir una cucharada de agua caliente, un 1/4 de cucharada de bicarbonato de sodio y remover para obtener un pegamento eficaz equivalente a los de barra.

FUNDAMENTO



En la primera fase, al realizares un cambio de pH con el vinagre (ácido acético en agua), se procede a separar los compuestos indeseados en la natilla y posteriormente, el vinagre es neutralizado con el bicarbonato de sodio, quedando la caseína en estado semipastoso; en función de la cantidad de agua agregada.

APLICACIÓN.



En especial es una práctica muy divertida y poco riesgosa por lo cual se recomienda para los niveles básicos y medio superior.

CLASIFICACIÓN.

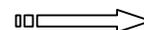
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

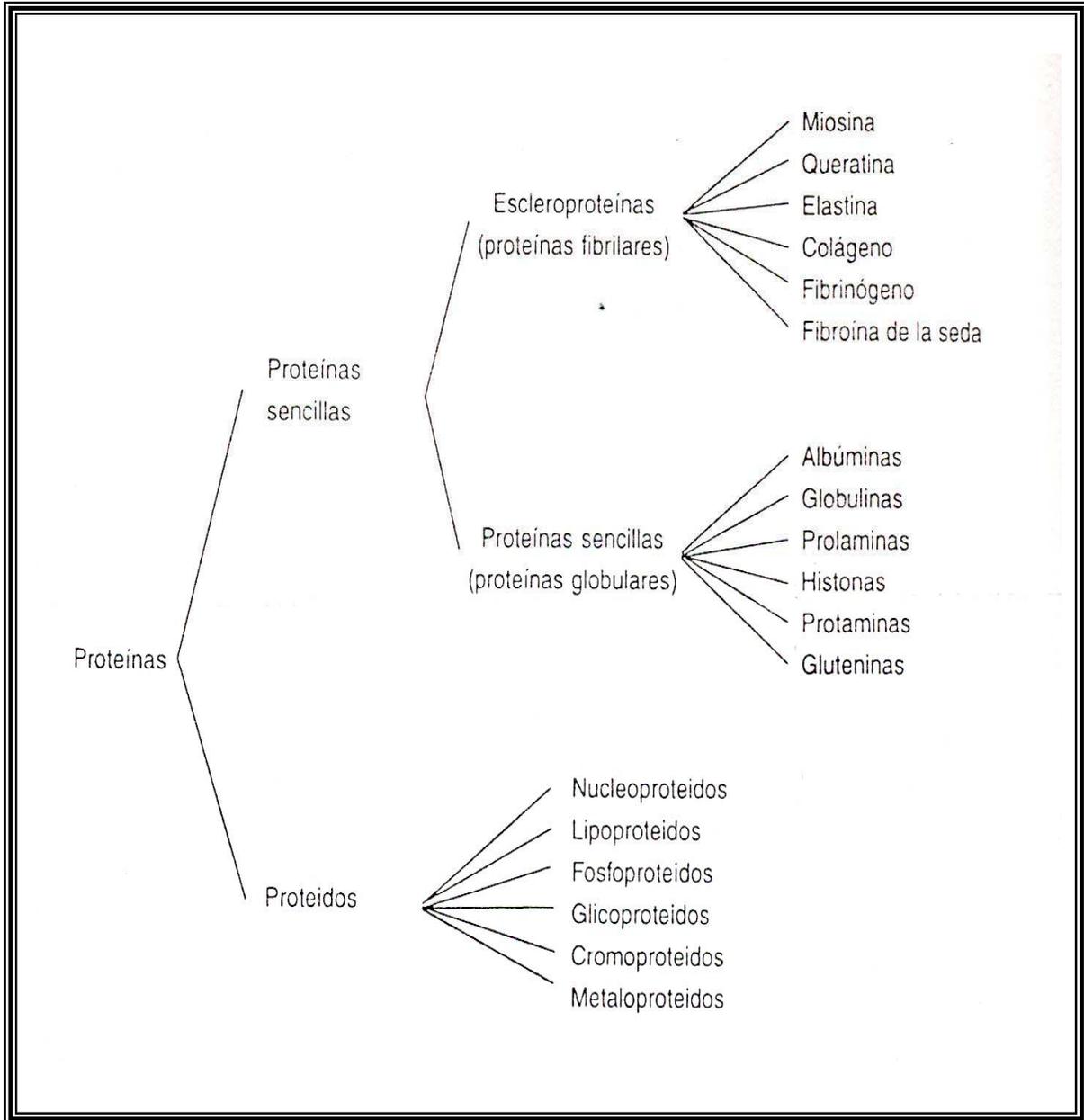
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



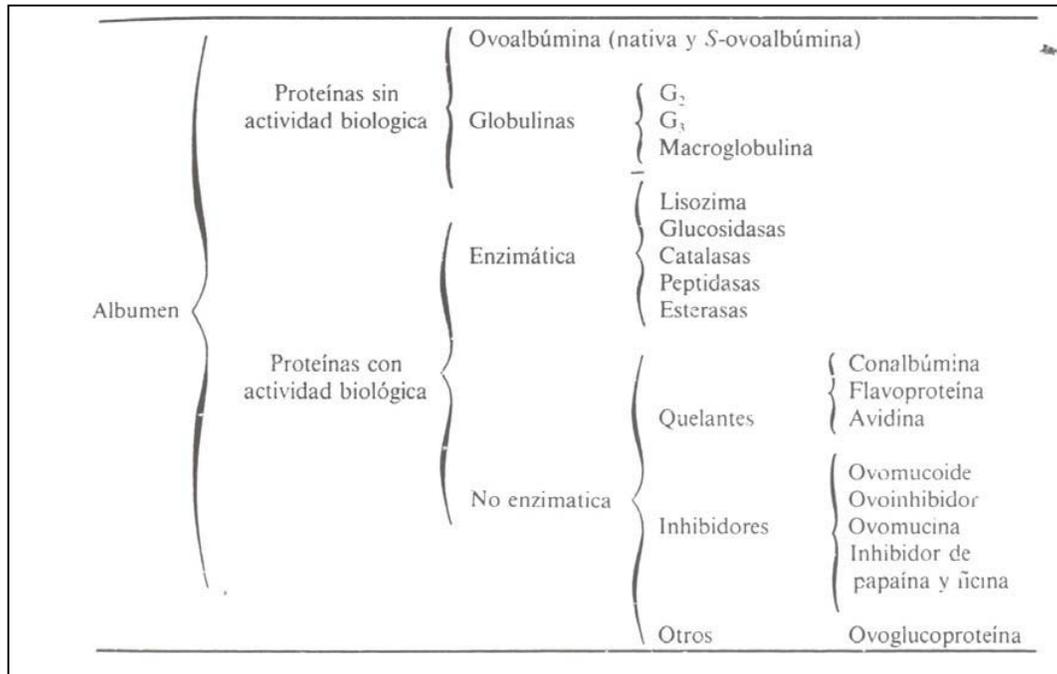
1).-Fuente y autor originales desconocidos, Revista Mensual QUO El saber Actual, N° 76, FEBRERO 2004.

ESQUEMA 5 B



REINHARD. Esquema que nos muestra una clasificación de las proteínas

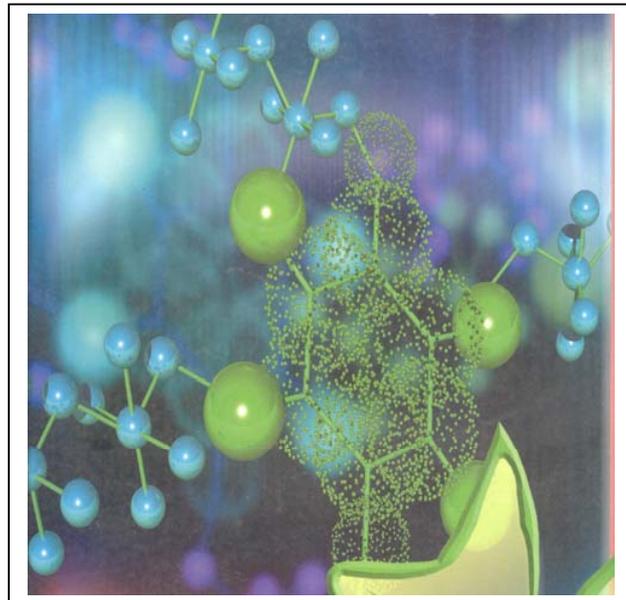
ESQUEMA 5 C



REINHARD. Esquema que nos muestra una clasificación de las proteínas del albumen

CAPITULO 6

ENZIMAS



Zimé θιμέ

INTRODUCCIÓN



El nombre Enzima proviene del Griego **Θυμέ, zimé** y que significa “**levadura**”, ya que antiguamente se pensaba que estos compuestos sólo actuaban en las células, principalmente en los hongos. Hoy se sabe que estos compuestos también se encuentran y actúan en todos los vegetales, animales y hongos. De hecho, en todos los procesos biológicos y bioquímicos de los seres vivos se manifiestan como parte de la germinación, el desarrollo, crecimiento, reproducción, senectud y **apoptosis**.

La **enzimología** que hoy se conoce pertenece a la era moderna del siglo XX, sin embargo su uso se remonta a muchos siglos atrás ya que los Árabes conocían el proceso para elaborar pan, mientras que el vino ya lo conocían los Egipcios y los Asirios desde hace 3000 años antes de cristo. Se sabe también que muchos pueblos utilizaban las hojas de ciertas plantas para envolver algunos cárnicos; esto les facilitaba la acción de las **proteasas** vegetales sobre las proteínas animales, las reblandecía al igual que los vinos en la actualidad y las cervezas.

Actualmente se conocen ya más de 2000 enzimas las cuales ya han sido aisladas, purificadas y cristalizadas en su totalidad. Regularmente, su estructura es de carácter proteínico globular con una secuencia integrada por polímeros de la serie L - aminoácidos, su especificidad catalítica es única, mientras que su velocidad de reacción tiene la capacidad de transformar más de un 1000,000 de moléculas reconociendo su estereoquímica

Por otro lado el efecto de pH (**iones hidronio**) y el grado de salinidad influyen directamente sobre el grado de ionización del sitio activo, afectando en la afinidad. En el caso de la temperatura, esta favorece la capacidad catalítica, pero solo en cierto rango en el que la enzima es estable, ya que en casos extremos se desnaturaliza y consecuentemente pierde su capacidad catalítica; algo semejante sucede con la agitación excesiva.

6.-ENZIMAS

CITA TEXTUAL



Un trabajo coordinado por Xavier Soberón y Agustín López Murguía se enfoca al estudio de las α -amilasas y su capacidad de producir eficientemente glucosa a partir de almidón. Se le compara con otras enzimas que también actúan sobre azúcares. De esta manera se han implementado cambios en su estructura, inspirados por estas comparaciones, que le permiten generar cadenas mucho más pequeñas de glucosa que las producidas usualmente. También, con la α -amilasa, el laboratorio del doctor López Murguía y de la maestra Francisca Iturbe desarrollan un proceso que mejora la vida de anaquel de las tortillas retrasando varios días el endurecimiento y preservando la textura de las tortillas, al evitar que el almidón se aglutine. El uso de la α -amilasa como aditivo es totalmente inocuo para la salud (La α -amilasa, para ser exactos, es un alimento, por tratarse de una proteína) (2).

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



El presente cuadro hace alusión a las frutas y verduras en las cuales se encuentran ciertas enzimas, cuya función es la de actuar como oxidoreductasas (fenolasa, catecolasa, tirosinasa, etc) esto es, que permiten el **pardeamiento** de las mismas cuando se exponen al aire libre. Ejemplos la pera, la manzana, el aguacate y la papa, entre otras (1).

COMENTARIOS



Existen varias enzimas cuyo nombre no nos ofrece información sobre su actividad, tal es el caso de la **papaína** (proveniente de la papaya) y la lactasa (en base al sustrato que utiliza, la lactosa).

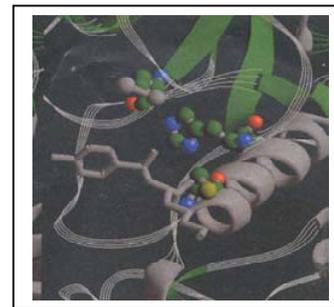
Dada la falta de homogeneidad en la nomenclatura, la comisión de enzimas de la unión internacional de bioquímica integró un método que las clasificara en 4 clases:

El 1er dígito de la nomenclatura indica a que grupo pertenecen oxidoreductasas, hidrolasas, transferasas, ligasas, isomerasas y liasas.

El 2º dígito corresponde a la subclase de enzima y se refiere al tipo de enlace que hidroliza, 3.1 éster, 3.2 glucosídico, 3.4 peptídico, etc.

El 3er dígito nos indica sobre que sustrato actúa la enzima y el tipo de unión, por ejemplo unión éster carboxílico, unión monofosfato o unión tioéster, etc.

El 4º dígito nos indica la acción de la enzima catalasas, fenolasas, lipasas, carbohidrasas, proteasas etc.



FUENTES.



1).-Foto PEÑA José A, El poder de la fruta, Muy Interesante, Año XVII, N° 14 de Abril del 2000.

2).-SOBERON Xavier, Imitar a la naturaleza, ¿Cómo Ves?, Año 2, N° 18, Mayo 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar el efecto de la velocidad de reacción de una enzima ureasa en 4 tiempos determinados.

IMPORTANCIA.



Las enzimas son consideradas catalizadores biológicos naturales y varias de éstas se encuentran en los alimentos y en los órganos y sistemas biológicos, por ende su estudio se torna de gran relevancia. Sin la existencia de dichas enzimas, las reacciones se llevarían a cabo más lentamente. Se recomienda consultar la bibliografía citada en la referencia de la técnica ya que existen otras prácticas complementarias a la misma.

¡NOTA IMPORTANTE!



Pipetear correctamente con una pipeta terminal para evitar errores de medición en el volumen. Mantenga los medios a 50°C constantes. Para tomar los tiempos, el cronometro se activa una vez que cae la primera gota de ureasa.

6. A.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA UREASA – EFECTO DEL TIEMPO EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

MÉTODO- TÉCNICA



I.- En un mortero preparado, triture 0.3g de frijol de soya o 3 frijoles y 10 ml de etanol al 30% (v/v), hasta obtener un homogenado. Centrifugar 10' min a 2500 r.p.m. y obtener el producto (ureasa). Si el líquido queda turbio volver a centrifugar 5' min más a 3500r.p.m. Hasta obtener un líquido claro que contiene a la ureasa.

Seguir la metodología de manera puntual y agregar los reactivos en el orden que se indica

II.- Prepare los 2 Matrces Erlen Meyer simultáneamente Blanco (Bco) y Problema (Pb)

Matrces Erlen Meyer de 50 ml	Bco.	Pb.
Urea 0.25M (Enzima = E)	5ml	5ml
Buffer a pH = 7.2	15 ml	15ml
Agua Destilada	5ml	5ml
HgCl ₂ (Inhibidor = I)	4 gotas	-----
Incubar a 50° C durante 5' min ambos tubos		
Ureasa (Sustrato = S)	0.5 ml	0.5ml

III.- A los 5' min tomar una muestra de 5ml de cada matraz Bco y Pb; pasarlos a otros matraces rotulados de 50ml, agrega 4 gotas de bicloruro de mercurio solo al problema y 2 gotas de rojo de metilo a ambos.

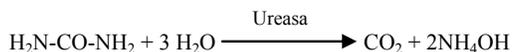
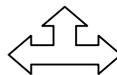
IV.- Repetir la lectura de ambos tubos a los 10', 15', 20' y 25' min, sin sacar de la incubación.

V.- Titule con HCl 0.01 N y espere el vire de color en cada caso,

VI.- Con los tiempos obtenidos y su actividad construya una gráfica de de µMoles de sustrato hidrolizados por minuto contra tiempo. Calcule los los µMoles con la siguiente fórmula para cada intervalo de tiempo VTP – VTP = 5 VTC Calcule la constante de Michaelis Menten (Km) y los mmol's de urea inicial. Si se desea se puede leer cada intervalo de tiempo en un espectrofotómetro a 540 nm para obtener los µMoles y comparar resultados.

R (+) = Vire a coloración canela.

FUNDAMENTO



La actividad de algunas enzimas depende en gran medida de sus grupos sulfidrilos que se encuentran intactos en las cisteínas que forman parte del polipéptido de la enzima.

La ureasa posee 3 ó 4 grupos sulfidrilos activos.

APLICACIÓN.



Es una práctica que bien se puede aplicar en el nivel medio superior y superior, siempre y cuando se cuiden las condiciones de trabajo. En ocasiones se podrá llevar ésta práctica al nivel elemental cuando se realice de manera cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

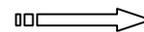
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- CAMPOS. C. G. y DELGADO. B. N. L.; Manual de bioquímica Celular, México, FESC. C1 - UNAM, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Comprobar la acción de la renina como una enzima proteolítica, en la elaboración de un queso



IMPORTANCIA.

Se sabe que 10 litros de leche producen 9 litros de suero y un kilogramo de queso.

Se ha calculado que la acción de la renina puede variar entre 150 – 200 ml por cada litro de leche y los microorganismos más comunes suelen ser:
Streptococcus lactis,
Streptococcus cremoris,
Lactobacillus lactis y
Lactobacillus bulgaricus

OBSERVACIÓN

(¡Nota Importante!)



Se recomienda que la leche tenga aproximadamente 3.2 % de grasa y una acidez recomendable.

6. B.- REACCIÓN DE LA CASEÍNA CON CUAJO – OBTENCIÓN DE QUESO

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Desde una noche previa conserve la leche pasteurizada a una temperatura comprendida entre 10° y 15°C para mantener las condiciones óptimas de las proteínas lácteas.

II.- Calentar la leche durante 10' min a 30°C, luego coloque la leche en un lugar templado y al abrigo de corrientes de aire, por otro lado, en otro recipiente, disolver ½ pastilla de cuajo y agregar ½ cucharada de sal casera fina por cada 2 litros de leche.

III.- Agregar sal al gusto y la solución a la leche, agitando uniformemente para lograr una incorporación homogénea.

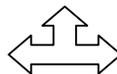
IV.- Calentar durante 20' min a 45°C de manera progresiva y lenta, agitar para que no se formen grumos, retirar del fuego, y agitar en ocasiones (los grumos deben adquirir consistencia y firmeza lo cual se verifica comprimiéndolos contra las paredes) los deben separarse con facilidad, sin unirse ni pegarse.

V.- Dejar reposando ≈ 4' min, hasta obtener un cuajo, para reconocer si la cuajada ya está firme; introducir un cuchillo y si se produce una “cortada” entonces la cuajada está lista.

VI.- Proceder a cortar la cuajada con suavidad con un cuchillo largo, los grumos grandes no deben desbaratarse, forme cubos de ≈ 1 cm. Con suavidad, agitar la cuajada circular y lentamente durante ≈ 15' min.

VII.- Con sumo cuidado pasar la cuajada a una manta de cielo y dar un movimiento de vaivén durante 10' min, agregue sal al gusto, pasar a un molde y por último pesar para obtener su rendimiento.

FUNDAMENTO



(Explicación o Reacción)

Dado que las diversas proteínas de la leche están estabilizadas por diferentes mecanismos, es fácil separarlas, y la caseína no es la excepción. La técnica clásica consiste en precipitar térmicamente a la caseína a un pH = 6.4 (su punto isoeléctrico), dado que se rompen los puentes de hidrógeno, obteniéndose varias fracciones.

Propiamente dicho, la renina actúa como una enzima proteolítica en los enlaces peptídicos permitiéndole que se convierta en paracaseína. El macro péptido se “desbarata”, se reorganiza y se precipita como un coágulo, que favorece la presencia de los iones calcio propios de los lácteos.

APLICACIÓN.



Se utiliza en la industria quesera y además es una práctica que se lleva a cabo en los niveles superiores, aunque bien se puede implementar en los niveles básico y medio superior.

Esta práctica es muy versátil, ya que aparte de ser divertida puede ayudar a las familias en su economía personal.

CLASIFICACIÓN.

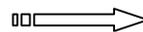
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



(Para conocer más...)

1.-BADUI Salvador. Química de los alimentos, 3ª/e^d, Pearson Educación, México, UNAM, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar la acción de la enzima bromelina proveniente de 3 muestras de piña de distinto origen en 3 preparados de grenetina.

IMPORTANCIA.



En la industria cárnica, la colágena juega un papel muy importante, ya que es un factor definitivo en la dureza de la carne. Cuando ésta se logra hidrolizar gracias a la acción de las enzimas, se produce el ablandamiento del producto, muy deseable para su consumo. Para éste efecto se usan diversas enzimas como la misma bromelina, la papaína y la ficcina, entre otras.

6. C.- EFECTO DE LA ENZIMA (BROMELINA) DE LA PIÑA EN GELATINA

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Pelar y descorazone una piña. Cortar el resto en pequeños trozos.

II.- Macerar en un mortero limpio unos 5 trozos de piña natural, en otro mortero repetir el procedimiento para la piña en almíbar y en otro más, agregar piña hervida. Filtrar en una gasa y trabajar con los 3 filtrados.

III.- Simultáneamente, agregar a un vaso de precipitados de 250ml, más 7.5 g de grenetina y 100ml de agua fría corriente, rotular la gelatina preparada.

IV.- Añadir enseguida una “pizca” de sal y otra de azúcar, más 200ml de agua caliente corriente; agitar hasta que todos los ingredientes se disuelvan.

V.- Tomar 3 tubos de ensaye y colocar lo siguiente:

Tubo 1.- 9 ml de gelatina preparada + 1 ml de extracto de piña hervida.

Tubo 2.- 9 ml de gelatina preparada + 1 ml de extracto de piña fresca.

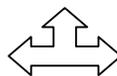
Tubo 3.- 9 ml de gelatina preparada + 1 ml de extracto de piña en almíbar.

VI.- Rotule los tubos y guárdelos en refrigeración por 24° hrs. Y espere los resultados

R (+) = Aparece una solución ligeramente acuosa 24° hrs.

R (-) = Aparece un cuajo después de 24° hrs.

FUNDAMENTO



La bromelina está clasificada como una enzima proteolítica, rompe los enlaces proteicos, por ende, su acción con respecto a la grenetina es la de romper enlaces peptídicos, dando una forma licuada.

APLICACIÓN.



Dada la elaboración de ésta práctica se puede adecuar no solo al nivel medio superior o superior, sino que también, al tornarse cualitativa bien se puede adaptar al nivel básico.

¡NOTA IMPORTANTE!



El filtrado que se obtiene trabájelo rápidamente para evitar la inactivación de la enzima.

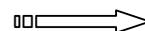
CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦
Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- ESCALANTE R. G. Q.F.B., MONDRAGÓN E. Ma. Elena Q.B.P., et.al, MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS Q.F.B. México, UNAM, 20002.

INTRODUCCIÓN



En todo tipo de células procariotas y eucariotas existen más de 1000 moléculas diferentes que permiten los diversos cambios bioquímicos indispensables para que la célula se mantenga viva, a estas moléculas se les denomina catalizadores biológicos. Un evento que resalta a la vista son las múltiples formas que adquiere la enzima para catalizar una misma reacción, por esta razón se le denomina **isoenzima**.

A primera vista, el citoplasma de la célula **procarionta** presenta una estructura simple, pero existen cada vez más pruebas de que en esta región, las enzimas pueden ser una estructura de organización frágil y libre (**isoenzima**).

Son muy conocidos ya los mecanismos de los que se vale una proteína para llevar a cabo uno su propio control en las reacciones, 2 son las formas de regulación enzimática más conocidas.

Como enzima **alostérica**, cuya actividad catalítica puede estar modulada por la unión no covalente de un metabolito dado, en un sitio específico de la propia enzima, distinto al sitio catalítico. Y como enzimas moduladoras en forma covalente, dadas por la acción de otras enzimas, convirtiéndose reversiblemente en formas activas e inactivas.

PIE DE FOTO.



Escultura que hace alusión a una de las múltiples formas, que puede adquirir una proteína de esta naturaleza, una isoenzima o macromolécula compleja. “Torus Isotópico” (1)

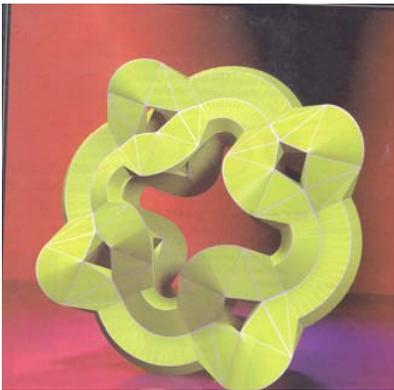
6.1.- ISOENZIMA

CITA TEXTUAL



En la búsqueda de posibles aplicaciones de este fascinante material, destaca lo realizado en el campo de la medicina. Se ha probado que un derivado soluble en agua del C60 (molécula con 60 átomos de carbono - Fullerenos irradiado con láser) inhibe a los virus de inmunodeficiencia humana VIH - 1 y VIH - 2, causantes del sida. Mediante estudios de simulación por computadora se ha visto que una molécula de C60 puede acomodarse perfectamente en el sitio activo de ciertas enzimas vitales para el virus (el sitio activo es la parte de la molécula de la enzima donde se lleva a cabo la reacción para la cual la enzima es un catalizador), lo que podría explicar el mecanismo de inhibición del virus. Desafortunadamente, la potencia de estos fullerenos es muy baja comparada con la de los fármacos empleados hoy en día contra el VIH. (2)

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuáles son los frutos que contiene a la polifeniloxidas?
- 2).- ¿Qué es una isoenzima?
- 3).- ¿Qué significa la palabra enzima?
- 4).- ¿Qué usos le daban los Egipcios a las enzimas hace 3000 años?
- 5).- ¿Qué significado tiene la palabra alostérico?

COMENTARIOS



En diversos tejidos existen múltiples formas moleculares inimaginables, que se diferencian por la secuencia de sus aminoácidos, por su arreglo espacial y hasta por los enlaces que forma. Sus diferentes conformaciones están determinadas genéticamente. Todas estas diferencias se logran detectar en un laboratorio por la respuesta que muestran a los inhibidores, a los activadores, a los moduladores, a su velocidad de **migración electroforética** y a la misma velocidad de reacción.

Es importante resaltar que el término “**alostérico**”, tiene como significado “otro espacio” u otra “estructura”, por ende, las enzimas alostéricas poseen además del sitio catalítico, otro sitio en el cual actúa un modulador específico que puede unirse a dicha enzima de manera irreversible, es decir en una unión no covalente, esto es, sin establecer un enlace químico firme. En general, el sitio alostérico es tan selectivo en su capacidad para unirse con el modulador, como lo es el sitio catalítico para unirse al sustrato. Otras enzimas alostéricas pueden tener moduladores positivos o negativos. Las enzimas alostéricas tienen un peso molecular elevado, son más difíciles de purificar y además son moléculas más complejas.

FUENTES.



- 1).- Calendario Matemático, Sebastián Escultor, Render Matías Carvajal, <http://www.ommm.uaem.mx>. 18 - III - 01
- 2).- GASQUE. S. Laura, El elemento con múltiples personalidades, ¿Cómo Ves?, Año 3, N° 28. Marzo 2001.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Extraer polifeniloxidasas de aguacate y conservarla para su posterior identificación con su sustrato respectivo (catecol)

IMPORTANCIA.



Una característica muy especial que tiene las enzimas es que su grado de selección es muy específico con respecto a su sustrato. Por ésta razón las enzimas debe de ser tratadas con mucho cuidado ya que cualquier variación puede alterarlas y hasta destruirlas. Esto es bien conocido en la industria alimenticia en y en la industria farmacéutica.

APLICACIÓN.



Dada la elaboración de ésta práctica se puede adecuar no solo al nivel medio superior o superior, sino que también, al tornarse cualitativa bien se puede adaptar al nivel básico.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure trabajar rápidamente desde el momento que pela el fruto para no dar tiempo a que actúe la enzima, pipetee correctamente, cuide los tiempos y temperaturas de refrigeración. Guarde la muestra en un frasco ámbar.

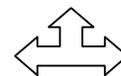
6.1. A.- EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENILOXIDASA DE UN ALIMENTO NATURAL

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Prepare el material a usar. Un mortero limpio y seco, 30ml acetona fría a 0°C, una navaja y 20g de papa blanca.
- II.- Agregar 10ml de acetona fría al mortero, pelar rápidamente la papa y ponerla en el mortero antes de que comience a oscurecerse, formar una pasta homogénea de consistencia aguada durante 5' min, mientras que se agregan los 20ml restantes poco a poco.
- III.- Filtrar al vacío el homogenizado sobre papel whatman y recuperar el líquido filtrado del embudo en una garrafa para su destilación posterior. El precipitado que queda en el papel filtro, homogenizarlo nuevamente en un mortero con 25 ml de acetona fría durante 5' min.
- IV.- 24 hrs después volver a filtrar al vacío y sobre papel whatman y recuperar nuevamente en una agarrafa. Recuperar nuevamente el precipitado de la garrafa en papel filtro y en un cristizador. Dejar secar el precipitado o polvo cetónico en una estufa por 1 hora a 40°C y pulverizar el polvo cetónico en un mortero.
- IV.- Prepare 250ml de buffer de fosfatos 0.05 M a pH = 7.0, y resuspenda su polvo obtenido hasta obtener una concentración de 2g / ml del buffer.
- V.- Prepare una suspensión con 0.8g de polvo cetónico en 40ml de buffer suspensión en un frasco ámbar y deje en agitación constante y en refrigeración durante 72 hrs.
- VI.- Preparar 4 tubos (problemas) como se indica a continuación:
Tubo 1.- 2ml de Buffer a pH = 4 + 0.5 ml del extracto enzimático + 0.5 ml de catecol al 5%
Tubo 2.- 2ml de Buffer a pH = 7 + 0.5 ml del extracto enzimático + 0.5 ml de catecol al 5%
Tubo 3.- 2ml de Buffer a pH = 8.5 + 0.5 ml del extracto enzimático + 0.5 ml de catecol al 5%
Tubo 4.- 2ml de Buffer a pH = 10 + 0.5 ml del extracto enzimático + 0.5 ml de catecol al 5%
Tome los tiempos desde un inicio hasta la concentración máxima del color café claro
- VII.- Prepare otra serie de 4 tubos (blancos) iguales que los anteriores, solo que ésta vez agregue después del Buffer 1ml de sulfito de sodio al 1% y tome los tiempos desde un inicio hasta la desaparición del color. Esta práctica se puede hacer cuantitativa si se preparan los blancos adecuados y leen contra los tubos problema en un espectrofotómetro a un rango de 392 - 430 nm, después de 15' min de reposo. Realice una curva patrón y calcule su actividad enzimática (μ Moles contra pH)

FUNDAMENTO



Se denomina pardeamiento enzimático a la transformación de enzimas en sus primeras etapas, de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, que frecuentemente se torna café pardo o negro. La 3-4 -dihidroxifenilalanina, se forma a partir de la tirosina, dopamina sustrato principal. Las enzimas requieren de iones cobre como cofactor, ya sea en estado monovalente, o divalente, como en el de las papas, su pH óptimo es de 5 a 7 y cuentan con estructuras oligoméricas en las que cada monómero contiene su cofactor correspondiente. **Catecol + Polifeniloxidasas \longrightarrow Quinonas**

CLASIFICACIÓN.

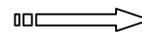
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-CRUZ. Domínguez Dinora, 1998, "Metodología de Investigación Documental y de las prácticas demostrativas de apoyo en la Asignatura del Paquete Terminal de Enzimas De Uso Alimentario", Tesis I.Q., FESC - UNAM, México.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Evidenciar la presencia de peroxidasa en distintas frutas mediante el pardeamiento de las mismas.



IMPORTANCIA.

Dada su resistencia térmica, la peroxidasa, se ha usado como un indicador de la eficiencia del escaldado de algunos productos vegetales; pero en otros casos se recomienda usar en su lugar la lipooxigenasa, ya que es más eficiente.

6.1. B.- EVIDENCIAR LA PRESENCIA DE PEROXIDASA EN DISTINTOS ALIMENTOS NATURALES

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación de la solución.

Preparar una solución acuosa de guayacol al 1% (3ml) y una solución de peróxido de hidrógeno al 5% (3ml), y se mezcla en volúmenes iguales. Preparar 6ml de la mezcla.

I.- Preparar el material a usar. Un mortero limpio y seco, la mezcla, una navaja y la fruta de elección (aguacate, plátano, manzana roja, pera, durazno, perón).

II.- Pelar rápidamente la fruta a usar, obtener ≈ 0.5 cm de de los fruto sin cáscara y colocarlos en un vidrio reloj.

III.- Añadir enseguida 3 gotas de la mezcla preparada a cada muestra. Tomar el tiempo desde el momento que se agregan las gotas hasta la aparición de un color rojo y registrar sus tiempos.

Si no existe coloración en un de 1' min., quiere decir que no existe actividad enzimática de la peroxidasa.

R (+) = Color rojo.

FUNDAMENTO



Se denomina pardeamiento enzimático a la transformación de enzimas en sus primeras etapas, de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, que frecuentemente se torna café pardo o negro. La peroxidasa se manifiesta cuando se pone en contacto con sus sustratos, peróxido de hidrógeno o guayacol.



APLICACIÓN.



Dada la elaboración de ésta práctica se puede adecuar no solo al nivel medio superior o superior, sino que también, al tornarse cualitativa bien se puede adaptar al nivel básico

¡NOTA IMPORTANTE!



El tratamiento que se debe dar a las frutas deberá ser rápido para que la enzima no actúe

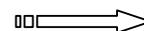
CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦
Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- ESCALANTE R. G. Q.F.B., MONDRAGÓN E. Ma Elena Q.B.P., et.al, MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS Q.F.B. México, UNAM, 20002

INTRODUCCIÓN



Los **cofactores** son agentes químicos necesarios para algunas enzimas sean funcionales, ya que sin estos no tendrían la capacidad de reaccionar, es decir, que al unirse con la enzima, la activan, regularmente no son de naturaleza proteica, sino vitamínica. Cuando el cofactor es una molécula orgánica, recibe el nombre de **coenzima**.

Las vitaminas son compuestos químicos que el cuerpo requiere en muy bajas cantidades. Las vitaminas no proveen de energía al ser humano, pero ayudan a obtenerla.

Hoy se conocen 13 vitaminas de las cuales el cuerpo solo produce 3, el resto las obtiene con la dieta diaria. Cada vitamina tiene un uso específico. La falta de alguna puede afectar la función de otra. Si existe la ausencia de una vitamina durante un largo periodo, se pone en riesgo nuestra salud.

Los bioelementos que conforman a las vitaminas son C, H, O, N, S, P y Co. Las diversas vitaminas se forman por anillos de **imidazol**, **tiofeno** y el de **corrino**, muy parecido al de la **porfirina**.

Estas se dividen en 2 grandes grupos: Las solubles en aceite (liposolubles), conformadas por las vitaminas A, D, E y K.

Las solubles en agua (hidrosolubles), están conformadas por las vitaminas B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, y C.

Otras coenzimas de igual importancia son el pirofosfato de tiamina, el NADH, el FADH, la biotina y el ácido fólico.

En 1912 Casimiro Funk realizó un estudio de este compuesto y describió la función que desempeñó en el tratamiento de la enfermedad llamada *beriberi*, que en nuestros tiempos todavía prevalece en el lejano oriente. Todos estos acontecimientos dieron origen a al nombre de Vitamina que significa "amina vital", recibiendo el nombre de vitamina B. Al descubrirse otras vitaminas con propiedades fisicoquímicas similares, se le modificó el nombre parcialmente, asignándosele el nombre de vitamina B₁ para distinguirlas de las vitaminas B₂, B₃, B₅, B₆, y B₁₂.

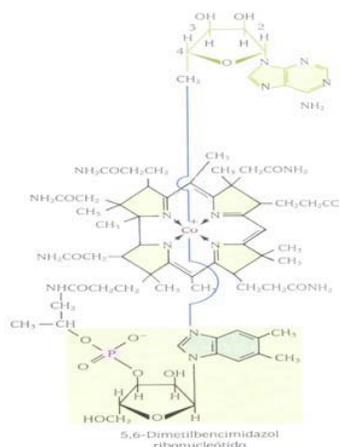
6.2.- COENZIMAS Y VITAMINAS

CITA TEXTUAL



Desde el punto de vista médico solo parece requerirse un aporte extra de vitamina B₉ durante el embarazo para ayudar a la maduración del sistema nervioso fetal. En cambio se sospecha que las vitaminas B₆, B₉, y B₁₂ tomadas en píldoras suplementarias podrían estar implicadas en el surgimiento de problemas cardiovasculares. Otras vitaminas como la A y la C, así como el beta caroteno precursor de la vitamina A, son moléculas antioxidantes capaces de atrapar radicales libres de oxígeno y son tóxicos que circulan por nuestro organismo. La naranja, la zanahoria o el brócoli contienen vitaminas antioxidantes tan buenas o mejores que las de las píldoras (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuáles son los frutos que contiene la peroxidasa?
- 2).- ¿Cuáles son los sustratos de la peroxidasa?

PIE DE FOTO.



Molécula que representa a la vitamina B₁₂, también conocida como cianocobalamina. Cofactor importante en el metabolismo (2).

RESUMEN



Buena parte de las vitaminas provienen de las frutas y verduras que se consumen en el alimento, dichos compuestos reciben el nombre de **carotenos**, **terpenos**, **hemiterpenos**, **sesquiterpenos** y otros **fitoquímicos**. Se hayan distribuidos en las flores, frutos, hojas, raíces y tallos de color rojo, naranja, verdes y amarillos; dichos carotenos se convierten en vitamina A, a través de una enzima que actúa a nivel del intestino y del hígado.

Algunos **fitoquímicos** como los **fitoesteroles**, los **flavonoides** y las **antocianinas**, nos ayudan a evitar los problemas vasculares, ya sea bajando los niveles de colesterol o atenuando el proceso de coagulación en el torrente sanguíneo. Mientras que los taninos actúan como astringentes antidiarreicos, y algunos otros compuestos como las **cumarinas** y los **flavonoides** poseen una acción sorprendente como antioxidantes celulares. Algunos otros frutos como el kiwi, la papaya y la guayaba protegen las membranas celulares y el ADN, gracias a sus enzimas (papaína) y vitaminas (C, E y B₂).

Una buena recomendación, coma frutas, ya que las personas frugívoras son más longevas que el resto de la población y además conservan una mejor dentadura, más reluciente y más fuerte.

FUENTES.



- 1).- ONDARZA Raúl, Biología Moderna, 10^a/e^d, México, TRILLAS, 1996.
- 2).- SANCHEZ. M. Carmen, Ideas heredadas y dietas disparatadas, ¿Cómo Ves?, Año 6, N° 65, Abril 2004.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Realizar una extracción de betacarotenos con los solventes orgánicos ideales.



IMPORTANCIA.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que se encuentran con gran facilidad en el reino animal y sobre todo en el reino vegetal. Se consideran pigmentos lipocrómicos, en la actualidad se conocen más de 300 carotenoides.

Se les puede encontrar en cítricos, cáscara de plátano, duraznos, pimentón, calabazas, etc.

Queda establecida la vinculación de la vitamina A con los carotenoides a partir de los trabajos realizados por Karrer. Dicha determinación dio como resultado que el betacaroteno consistiría en la unión de 2 moléculas de vitamina A, unidas cola a cola y que finalmente serían transformadas en monómeros de retinol (vitamina A) gracias a la intervención de las enzimas presentes en la mucosa intestinal.

¡NOTA IMPORTANTE!



Si se requiere almacenar el extracto, debe hacerse en la oscuridad y bajo vacío, en condiciones frías.

6.2. A.- EXTRACCIÓN DE BETACAROTENOS DE LA ZANAHORIA

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Colocar un matraz Erlen Meyer de 500ml y agregar 10g de zanahoria finamente picada con 100ml de alcohol al 95%, calentar por 30' min.

II.- Obtener una solución amarilla por decantación la cual se diluye hasta el 85% con alcohol y se deja enfriar.

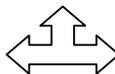
III.- Colocar la mezcla en un embudo de separación lo suficientemente grande, agitar la mezcla y agregar poco a poco 50ml de éter de petróleo que oscile entre 20° - 40°C. Esperar a que las capas se separen; la capa superior (de éter de petróleo), contiene los carotenos, y la inferior las xantofilas.

IV.- Después de quitar la capa superior, lavar la capa inferior (la de alcohol), con volúmenes sucesivos de 2ml de éter de petróleo, hasta que el líquido que forma una nueva capa superior sea completamente incolora (esto indica que la extracción de carotenos ha sido total)

V.- Se combinan los extractos de éter de petróleo, y se lavan con etanol al 85% para eliminar las xantofilas. Se concentra la capa de éter de petróleo bajo vacío, sin rebasar los 40°C, empleando un evaporador rotatorio.

VI.- Tomar el residuo y disolver el residuo graso en 2ml de solvente B. de Skelly, como último paso antes de mandarlo a una cromatografía.

FUNDAMENTO



Los carotenoides poseen colores que van desde el amarillo, naranja hasta el púrpura. Mientras que, las xantofilas son derivados oxigenados de los mismos carotenos; dichos compuestos son alcoholes, aldehídos, y ácidos que son solubles en etanol, metanol, y éter de petróleo. Dicha solubilidad va de acuerdo a la polaridad de solventes con respecto a los carotenos y las xantofilas.

APLICACIÓN.



Es una técnica muy ilustrativa que bien se puede aplicar en los tres niveles, desde secundaria hasta nivel superior.

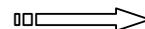
CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦
Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Correr 2 cromatografías con 2 diferentes solventes para diferenciar beta carotenos de clorofila.



IMPORTANCIA.

Los flavonoides son pigmentos vegetales que se compone de un esqueleto carbonado $C_6 - C_3 - C_6$, característico en la flacona; ejemplos de éste grupo tenemos: Flavonol, flacona, charcona, aurona, catequina, isoflavona, etc. Se conocen aproximadamente 200 flavonoides naturales libres y como glicósidos. Son los responsables de darle color a las flores frutos y hojas, pero son aún más frecuentes en los tejidos leñosos. Su solubilidad varía ya que, mientras algunos son solubles en agua otros no lo son; pero sin en cambio si lo son en éter de petróleo.

Los compuestos coloridos más comunes se obtienen de jitomate, zanahoria (β carotenos), flor de jamaica y por supuesto, de hojas de espinaca del cual se llegan a obtener 2 ó 3 pigmentos; el verde, el amarillo y en ocasiones el naranja; dependiendo de la proporción en la que se mezclen dichos solventes orgánicos.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procurar que la azúcar blanca tenga un diámetro menor al del azúcar morena, sin llegar a ser tan fina como el azúcar glas o la sacarosa. Nunca se debe usar bicarbonato o sacarosa ya que se comprime. El algodón debe permitir el paso del solvente.

6.2. B.— SEPARACIÓN DE PIGMENTOS POR CROMATOGRFÍA EN ESPINACAS (ENZIMAS VEGETALES)

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación Previa

En 2 morteros limpios agregar media hoja de espinaca cortada con tijeras en trozos pequeños, en cada una, más 10 ml de etanol al 96% y macerar hasta obtener una pasta ligeramente aguada (un licuado).

I.-En el primer mortero colocar un gis completo en el centro sin que toque ningún borde del mortero, procurando que la base más grande esté de soporte.

Dejar pasar unos minutos y observar que pasa

II.- La mezcla obtenida en el segundo mortero se filtra en un vaso de precipitados con papel filtro para café y se deja preparada la mezcla para posterior uso.

III.- Montar un soporte universal con una pinza de nuez y un pinza de goma en la cual se va a colocar una jeringa de 20 ml invertida (cerciorarse que esté recta y no tenga movimiento).

III.- Colocar una “nubecilla” de algodón no muy compacta en el fondo, enseguida probar que el algodón si permite el paso de los solventes agregando un poco de éter de petróleo y recolectarlo en un matraz de 50 ml.

IV.- Enseguida agregar azúcar blanca hasta la última marca de la numeración (la línea). Posteriormente agregar 2 ml de éter de petróleo hasta que el azúcar quede bañada completamente, si es necesario agregar un poco más (2 -4 ml) y recolectar con el matraz.

V.- Por último se agrega la mezcla en el vaso de precipitados y dejar correr. Observar que pasa. Investigar previamente la polaridad de los pigmentos a obtener, con que solventes corre y en que proporciones si es que son más de 2 solventes mezclados.

Los vasos de precipitados, los matraces y los morteros se pueden sustituir por frascos de gerber.

FUNDAMENTO



Es importante tomar en cuenta que los flavonoides tienen un grupo extenso por lo cual su solubilidad varía, pero es común separar a las flaconas con éter de petróleo o con etanol al 96% y al 70%, acetona cloroformo etc; dada su polaridad ya que si recordamos “lo igual disuelve a lo igual”. Hay que tomar en cuenta que una cromatografía consta de de 2 fases, la fase móvil (eluyente) y la fase estacionaria (columna, placa, de gases, etc.) en donde correrá la muestra de análisis, separándose los componentes de acuerdo a su polaridad.

APLICACIÓN.



Ésta técnica es muy ilustrativa para los 3 niveles (secundaria, preparatoria y universidad), ya que la explicación puede variar en complejidad según sea el nivel que se maneje.

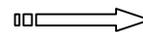
CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦
Semicuantitativo.

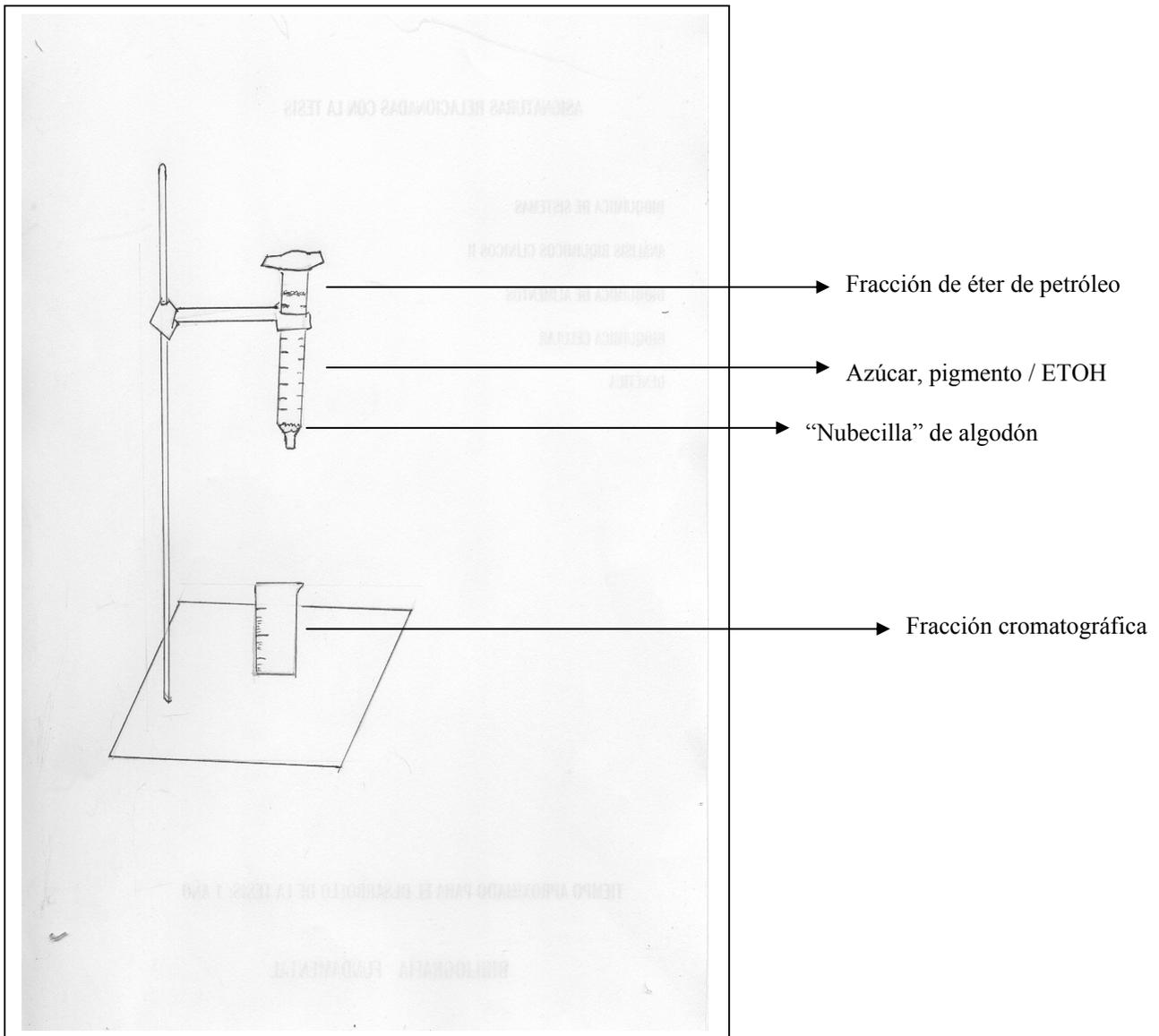
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- LEE Mendoza Azucena Q. F. B., Técnica propuesta por la profesora de asignatura “A” del Área de Bioquímica, FESC – C1, UNAM, 2006

ESQUEMA 6 A



Montaje de una cromatografía en jeringa

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar al ácido ascórbico mediante una técnica de valoración, valiéndose de un colorante que haga presente a la vitamina.

IMPORTANCIA.



Las acciones bioquímicas del ácido ascórbico se basan en su participación en el transporte de electrones en el microsoma y en sus numerosas reacciones de hidroxilación. La ausencia de ésta vitamina produce escorbuto y se logran observar sus estragos. En el tejido mesenquimatoso, como hemorragias en la musculatura y dolores en las extremidades.

¡NOTA IMPORTANTE!



Para la mezcla de ácidos, guárdela en una botella topacio a 5°C. Prepare la solución fresca cada semana.

Procure estandarizar el colorante antes de usarlo con una solución de ácido ascórbico.

La disolución del patrón en ácidos, evitará que la enzima actúe sobre la vitamina "C" y no lleve acabo la oxidación.

6.2. C.- DETERMINACIÓN DE VITAMINA - C

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación de reactivos

Mezcla de acético – Ácido fosfórico. Disolver 30g de ácido metafosfórico triturado en 40 ml de ácido acético glaciado + 300ml de agua + 1.9 g de EDTA. Sacudir ésta mezcla a temperatura ambiente hasta disolver y diluir un litro con agua.

Solución de indofenol (DCIP). Disolver 50 mg de la sal sódica en 150 ml de agua caliente conteniendo 42 mg de bicarbonato de sodio. Diluir ésta solución en 200ml de agua y guardar en una botella topacio a 5°C.

Solución patrón de ácido ascórbico. Preparar 100ml del patrón de ascórbico 1mg / ml de solución de acético – metafosfórico.

Titulación

I.- En 3 matraces Erlen Meyer. Obtener una muestra de jugo natural de una fruta cítrica, filtrar el jugo a través de una gasa o papel filtro hasta completar 10ml (medidos con probeta), proceder de la misma manera con un jugo de marca y agregar directamente en el último matraz 10 ml del patrón.

II.- Rotular los matraces y colocar en cada uno de ellos 5ml de la mezcla de ácidos.

III.- Titular rápidamente con la solución de indofenol hasta el vire y persistencia del color (rosa pálido). Realizar los cálculos de dilución para cada caso a partir de los datos de referencia del patrón.

FUNDAMENTO



El ácido ascórbico reduce rápidamente al colorante 2- 6 – diclorofenol- indofenol de forma cuantitativa en solución ácida. La interferencia de los tioles, sulfitos y sulfuros se eliminan condensando éstas sustancias con formaldehído a pH = 0.6 antes de la titulación de la vitamina "C". Las reductonas no se condensan con el formaldehído bajo éstas condiciones y se determinan separadamente tras condensar el ácido ascórbico y otras sustancias interferentes con formaldehído a pH = 3.5.

APLICACIÓN.



Dada la elaboración de ésta práctica se puede adecuar no solo al nivel medio superior o superior, sino que también, al tornarse cualitativa bien se puede adaptar al nivel básico, siempre y cuando se tenga sumo cuidado al elaborar los reactivos y al manejarlos.

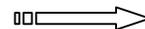
CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦
Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- MATISSEK. Reinhard, Análisis de los alimentos fundamentos- métodos – aplicaciones, 2ª/e^d, Acribia, España, 1998.

INTRODUCCIÓN



Todas las enzimas son proteínas con capacidad catalítica, o sea, que aceleran las reacciones bioquímicas que se realizan en los seres vivos bajo el siguiente esquema: $E + S = ES = E + P$. Con esto se quiere decir, que la enzima al llevar a cabo la reacción, y dar paso al complejo forma un producto nuevo sin que esta se altere en su composición química. Pero los eventos bioquímicos no siempre son así, en algunos casos las enzimas necesitan sufrir algunos cambios para activarse, esto da origen a que algunas enzimas hayan sido sintetizada como un precursor no funcional, llamado pro enzima o **zimógeno**. Estos compuestos suelen activarse a través de la pérdida de uno de sus fragmentos (el pepsinógeno gástrico, por ejemplo, que se transforma en la pepsina al eliminar un fragmento de 44 aminoácidos).

El estudio de los inhibidores enzimáticos ha servido para obtener información valiosa acerca del mecanismo de catálisis enzimática o aceleración de la reacción, por ende se han establecido 3 tipos de inhibición enzimática y que pueden ser evidenciados experimentalmente por sus efectos sobre la cinética de reacción, analizada en términos de la ecuación de Lineweaver – Burk.

Inhibición No Competitiva. - Es aquel fenómeno en donde el inhibidor y el sustrato puede combinarse con la enzima libre de manera simultánea, o también el inhibidor se une con el complejo enzima sustrato. La característica que tiene este fenómeno, es que los inhibidores no competitivos se adhieren a un sitio diferente del sitio activo de la enzima, cambiando la conformación de la enzima. Otra característica común es que no se forma el complejo ES a la velocidad normal, ni se descompone para dar los productos esperados, se puede evidenciar este fenómeno usando diferentes concentraciones del inhibidor, en donde la enzima no inhibida esta disminuida por el inhibidor y no podrá ser restaurada.

PIE DE FOTO.



Modelo molecular de I_{C60} dentro del sitio activo de una enzima del VIH (1).

6.3.- ZIMÓGENO-PROENZIMA

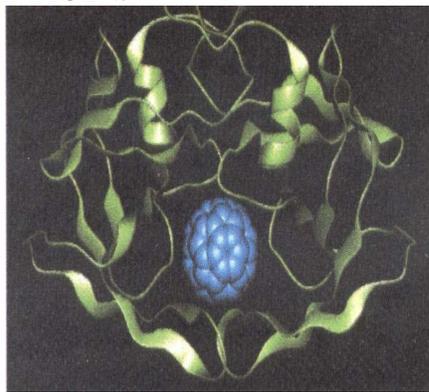
CITA TEXTUAL



Los productos que contienen ácido retinoico (por ejemplo retin - A y arretin), solo deben usarse bajo prescripción médica, ya que mal empleados pueden ocasionar una irritación severa en la piel, que incluye comezón, enrojecimiento, descamación y sequedad. Por este motivo los cosméticos no contienen ácido retinoico sino precursores inactivos, como el retinol mismo, o derivados más estables, los cuales deben ser convertidos en ácido retinoico por las células vivas de la piel.

El problema es que el retinol, cuando es adicionado directamente a los cosméticos, se degrada rápidamente por el contacto con el oxígeno del aire o la exposición a la luz; y si lo que se añade son sus derivados más estables, la absorción es mínima, Ya que las células vivas se localizan en las capas más profundas de la piel. Así, éstas células no asimilan la mayor parte de la vitamina A que contienen los cosméticos (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuál es la reacción clásica entre enzima y sustrato?
- 2).- Mencione los tipos de inhibición que existen?
- 3).- ¿Qué vire de color da la práctica de la actividad enzimática de la ureasa?

COMENTARIOS



Inhibición Competitiva. - En esta modalidad, el inhibidor puede combinarse con la enzima libre, de tal manera que compite con el sustrato normal por unirse al sitio activo de la enzima. En dicha reacción, la molécula del inhibidor no es modificada químicamente por la enzima. Este tipo de inhibición se reconoce fácilmente debido a que el porcentaje de inhibición dada a una concentración fija del inhibidor, disminuye cuando se aumenta la concentración del sustrato, solo uno se une a la enzima.

Es importante puntualizar que a partir de la relación que se establece entre la estructura molecular de un inhibidor competitivo y su afinidad por la enzima, puede obtenerse información valiosa acerca de la estructura y la geometría del sitio activo.

Inhibición Incompetitiva. - En éste caso el inhibidor no se combina con la enzima libre, ni afecta su reacción con el sustrato normal solo se une cuando ya se formó el complejo E-S y se logra una gran afinidad para formar un nuevo complejo E-S-I (enzima – sustrato – inhibidor), el cual no puede suministrar los productos normales. Los parámetros nos muestran entonces, que el grado de inhibición puede acentuarse cuando la concentración del sustrato se incrementa. Se reconoce fácilmente cuando la concentración del sustrato se incrementa, es muy común en reacciones de dos sustratos.

FUENTES.



- 1).-GASQUE S Laura, El elemento con múltiples personalidades, ¿Cómo Ves?, Año 3, N° 28. Marzo 2001.
- 2).-RIVERO. R. Héctor y SANCHEZ. J. Adriana, Vitaminas en los cosméticos, ¿Cómo Ves?, Año 4, N° 40, Marzo 2002

INTRODUCCIÓN



Es de suma importancia resaltar la existencia de las enzimas que requieren iones metálicos como cofactores y que éste, a su vez, les sirva como parte de su propio sitio activo como agente estabilizador y como puente de unión entre la enzima y el sustrato. Solo por citar algunas enzimas que contiene hierro, como la catalasa, que se encarga de descomponer al peróxido de hidrógeno (agua oxigenada).

Otro ejemplo, es que el mismo hierro que forma parte de los mamíferos, incluyendo al ser humano, ya que la porfirina contiene una partícula de hierro (molécula que forma parte de una molécula proteica aún mayor llamada hemoglobina) y que le da su color característico rojo a la sangre; en el caso de la sangre de algunos peces, es el cobre quien les proporciona el color azul en su sangre.

Otra enzima que es importante mencionar y que contiene hierro y azufre es la nitrogenasa, con la capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, regularmente se presenta en las bacterias fijadoras del nitrógeno como en la bacteria anaeróbica *Clostridium pasteurianum*. Esta enzima contiene 2 átomos de molibdeno, 32 de hierro y 25 – 30 de azufre.

Todas estas enzimas, conocidas en la actualidad como metaloproteínas, han sido aisladas de bacterias y de otras fuentes como cloroplastos de plantas superiores y asociadas con los citocromos en los organelos conocidos como mitocondrias de tejidos animales.

PIE DE FOTO.



Modelo por computadora que representa una "Metalobeta-lactamasa" que contiene iones metálicos insertados en color rojo, dentro de la misma enzima (1).

6.4.- IONES METÁLICOS

CITA TEXTUAL

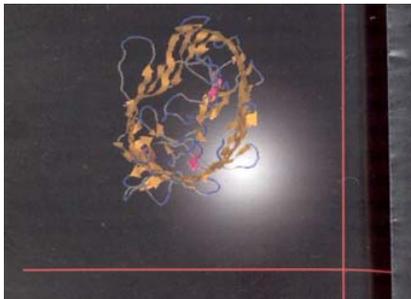


El molibdeno es el único elemento de la segunda serie de los metales de transición que forma parte de alguna molécula necesaria para la vida. Es sumamente escaso en la corteza terrestre, en la que hay sólo 1.2 ppm, comparadas con las 62000 ppm de hierro. Sin embargo, podemos atrevernos a decir que nuestra existencia depende de él.

Esta asombrosa enzima ha inspirado a un número de químicos inorgánicos alrededor del mundo, que buscan obtener moléculas a base de hierro, molibdeno y azufre que se asemejen en algo al sitio activo de la nitrogenasa (que es la parte de la enzima donde se lleva a cabo la reacción para la cual la enzima es un catalizador). Se pretende encontrar alguna que actúe como un buen catalizador para la reacción de síntesis del aminoácido y permita realizar la reacción en condiciones más económicas.

Se podría lograr que estos vitales cultivos fueran capaces de prescindir de los fertilizantes sintéticos, lo que contribuiría significativamente al combate contra el hambre en el mundo (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuál es la función que tiene la catalasa?
- 2).- ¿Qué función tienen los iones metálicos en los procesos enzimáticos?
- 3).- ¿Cuál es el porcentaje de minerales que tiene el cuerpo humano en su totalidad?

COMENTARIOS



Si se tomara a un cadáver de aproximadamente 70kg de peso y por un proceso de cremación se le llevara hasta la incineración, obtendríamos un montón de cenizas blanquecinas de las cuales el 4% del peso total estaría compuesto por 18 minerales muy comúnmente conocidos como oligoelementos (hierro, cinc, magnesio, selenio, cobre, manganeso, selenio, sodio, potasio, yodo, calcio, fósforo, flúor, cromo, molibdeno, mercurio, plomo y aluminio). Dichos elementos cumplen una gran variedad de funciones y algunos de estos son captados por el cuerpo en cantidades trazas (pico gramos) así el calcio, el flúor, el fósforo y el manganeso que se encargan de darle una estructura sana a los huesos dándole elasticidad. Mientras que otros de la misma importancia intervienen en la conducción nerviosa, la contracción muscular, la coagulación de la sangre, la secreción y regulación de hormonas, para regular el equilibrio de las membranas celulares y activan a las mitocondrias. Otros oligoelementos son aún más importantes ya que llegan a formar más 80 enzimas que son imprescindibles para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos; la degradación de lípidos y carbohidratos.

FUENTES.



- 1).-PORTA Elena, Proteínas, Las Ciencias Genómicas especial, ¿Cómo Ves?, Año 4, N° 37, Diciembre 2001.
- 2).-DRA GASQUE Silvia, Proteínas, El nitrógeno uno de los secretos de la vida, ¿Cómo Ves?, Año 6, N° 64, Marzo 2004.

INTRODUCCIÓN



Es sabido que existen 2 tipos de enzimas, las que están formadas por proteínas y las que además de tener una fracción proteica (**enzima** o **apoenzima**), contienen una fracción no proteica llamada **cofactor** o **coenzima** y que es indispensable para que la enzima actúe. A este tipo de complejos enzimáticos se les denomina **holoenzimas**.

El papel que desempeña toda enzima consiste en disminuir la energía de activación de los reactivos, para lograr una óptima velocidad de reacción sin necesidad de elevar la temperatura. En base a lo anterior cabe puntualizar que existen factores determinantes que afectan la actividad enzimática como:

La temperatura.- Cuando se tiene un sistema en donde coexiste la enzima y su sustrato, y se incrementa la temperatura del mismo entonces, aumenta la actividad, (a temperaturas mayores de los 40°C, se ha comprobado que se desnaturalizan las proteínas) y por consiguiente se inactivan las enzimas presentes.

El pH.- Los medios a los que se les puede exponer a una enzima tienen una diversidad de pH's, que varían desde lo más ácido (pH = 1 - 6.9) hasta lo más alcalino (7.1 - 14), de tal manera que un exceso de alguno de estos puede desnaturalizar a la enzima. La mayoría de las reacciones más óptimas se centran en pH's muy cercanos al pH= 7, es decir, en medios neutros como el del agua en los organismos.

Concentraciones de enzima y sustrato.- Cuando se tiene un sistema bien controlado en los 2 aspectos antes mencionados, entonces se dice que la velocidad de reacción será proporcional a la concentración de la enzima y su sustrato.

La parte no proteica puede ser un metal como Fe, Cu, K (con cargas variables) Etc. Aunque también puede ser una molécula orgánica más compleja como la s vitaminas B2, A, C, B6, B12 ó el NAD y el NADP que interactúan bajo las condiciones anteriores en cualquier organismo viviente.

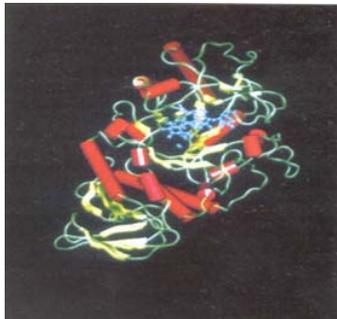
6.5.- HOLOENZIMA

CITA TEXTUAL



Se han identificado compuestos que forman parte de la saliva de los herbívoros que al aplicarse sobre las hojas sanas aumentan la producción y liberación de compuestos volátiles.. A estos compuestos se les llama "elicitor". Uno es la enzima beta - glucosidasa, que se encuentra en la saliva de la oruga Pieris brassicae a la que le gustan las coles. Al masticar las hojas de col, se produce una mezcla de volátiles que atrae a un tipo de avispa llamada Cotesia glomerata, que parasita a la oruga. De esta forma, la planta no ataca directamente a la oruga., sino que atrae a una avispa para que sea la que destruya a la oruga. La beta - glucosidasa es un componente que existe en la saliva de la oruga, ya que no se encuentra en las hojas de col sanas ni tampoco en aquellas dañadas por las orugas (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿En qué producto alimenticio se encuentra la renina?
- 2).- ¿Qué es una holoenzima?
- 3).- ¿Qué función tienen las vitaminas?

PIE DE FOTO.



Imagen virtual que nos muestra un complejo de una holoenzima, formada por la enzima y su cofactor (1).

COMENTARIOS



Como se ha mencionado anteriormente, la velocidad de una reacción enzimática dependen de 3 factores principales y la manera de cuantificar una reacción, es a través de la cinética enzimática.

La forma más fiable es usando un modelo matemático conocido como la curva de Michaelis - Mentel en donde se puede describir una reacción enzimática no alostérica, aunque el inconveniente es que se obtiene una hipérbola, en donde resulta difícil estimar la velocidad máxima de reacción, porque se obtiene una asíntota, de modo que el valor de concentración es infinito para el sustrato. Por ésta razón, el modelo propuesto por Lineweaver - Burk, resulta más manejable, ya que una recta que pasa por un conjunto de puntos, puede ajustarse de manera más ideal a una estimada y a una ecuación de la recta para la obtención de alguna concentración óptimas. La manera más adecuada para expresar dicha ecuación es la siguiente:

$$1/V = (K_m/V_{max}) (1/S) + 1/V_{max}$$

Equivalente a:

$$y = m \cdot x + b$$

Donde:

V = La velocidad de reacción.

V_{max} = La velocidad máxima de reacción.

K_m = La constante de Michaelis.

S = La concentración del sustrato

El eje de las x = la concentración del sustrato(S), (mM) y su inverso 1/(S) (mM⁻¹)

Y el eje de las y = velocidad V, (mMs⁻¹) y su inverso 1/V, (mMs⁻¹)⁻¹ es muy importante conocer la (S) debido a los límites de solubilidad o a los mismos costos del sustrato

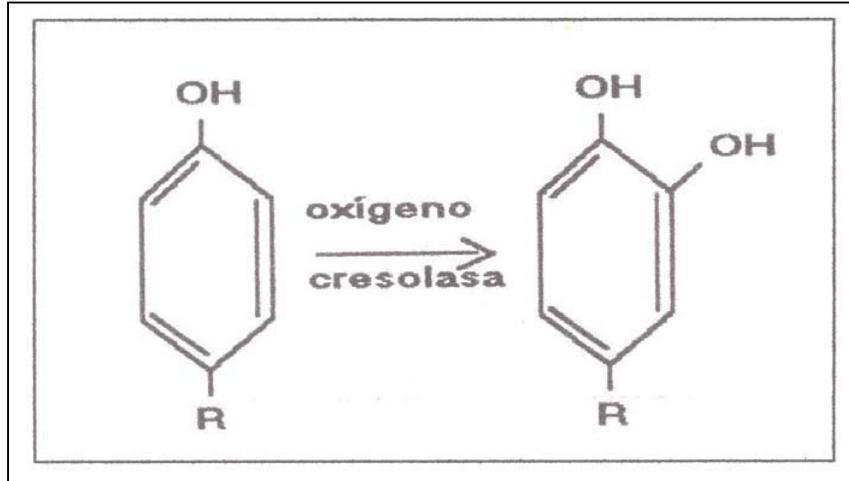
FUENTES.



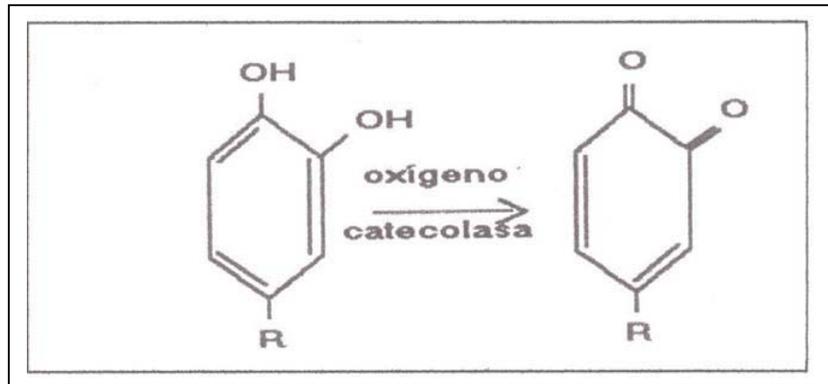
1).-SOBERON Xavier, Imitar ala naturaleza, ¿Cómo Ves?, Año 2, N° 18, Mayo 2000.

2).-PORTA. D. Helena, Los perfumes de la vida, ¿Cómo Ves?, Año 5, N° 58, Septiembre 2003.

ESQUEMA 6 B



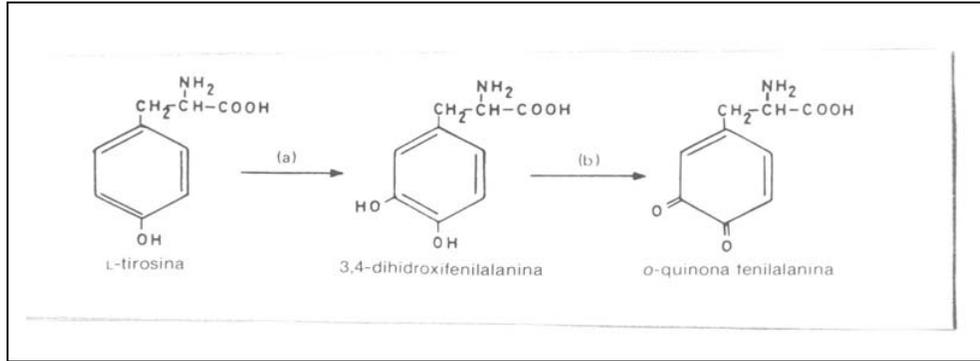
1ª Reacción. Hidroxilación del monofenol para darle actividad a la cresolasa



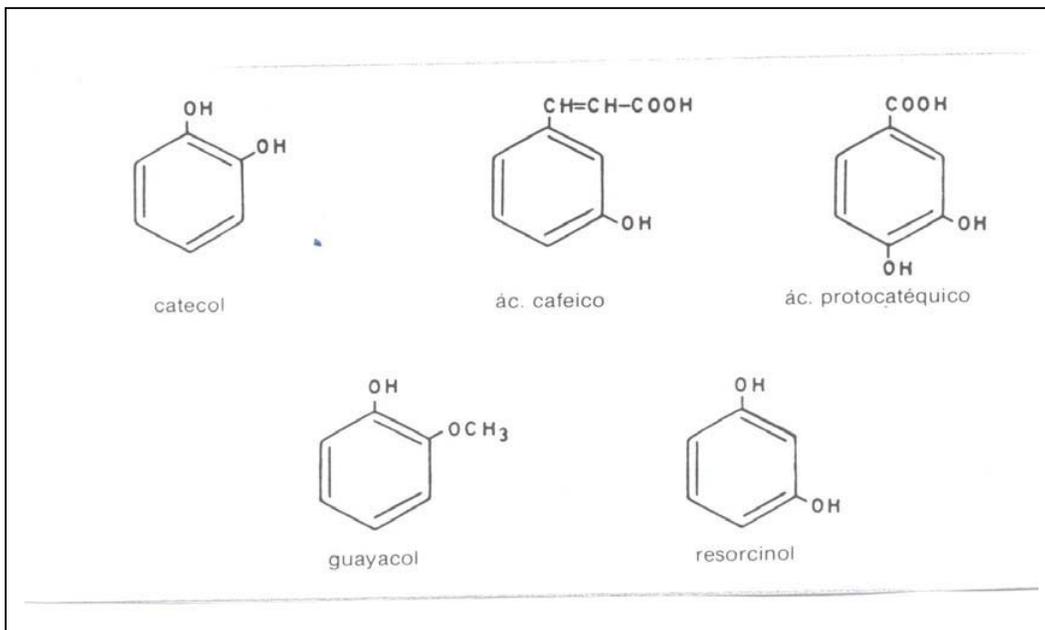
TESIS DINORA. 2ª Reacción. Oxidación de la cresolasa para dar catecolasa a partir de una remoción de hidrógenos.

Reacciones de oxidación para la cresolasa y la catecolasa

ESQUEMA 6 C

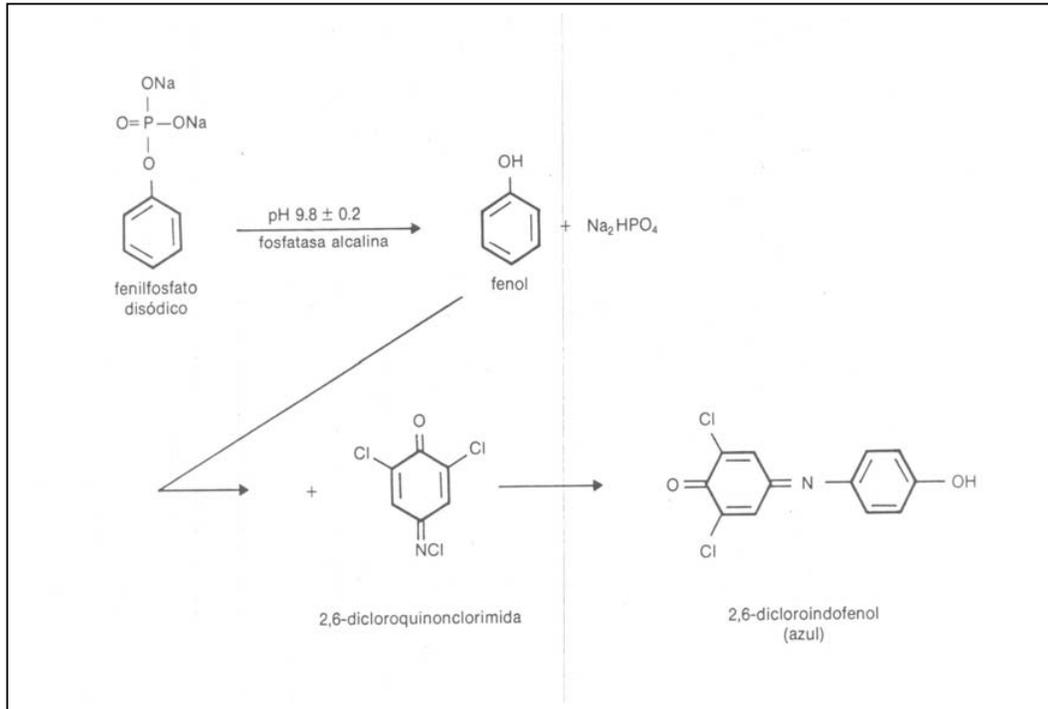


BADUI. Acción de las fenolasas en el pardeamiento de la papa. En la 1ª reacción se efectúa por la acción de la Cresolasa, mientras que la segunda reacción se efectúa por la actividad de la catecolasa

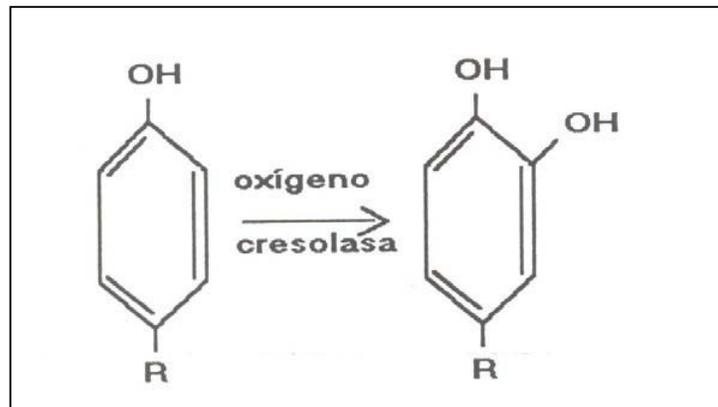


BADUI. Ejemplo de compuestos que reaccionan con la enzima fenolasa

ESQUEMA 6 D

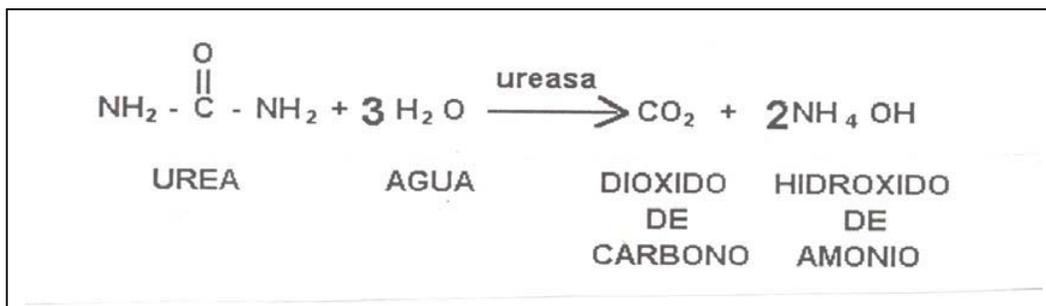


Mecanismo de reacción para la formación de 2,6 – dicloroindofenol a partir de la enzima fosfatasa alcalina

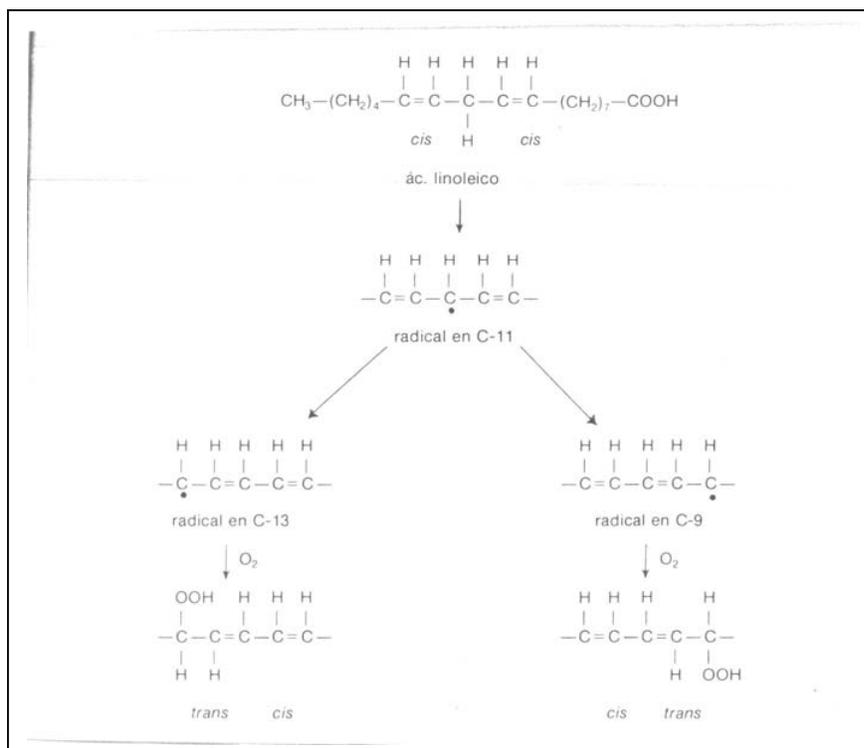


TESIS DINORA. Conversión del fenol por acción de la cresolasa

ESQUEMA 6 E

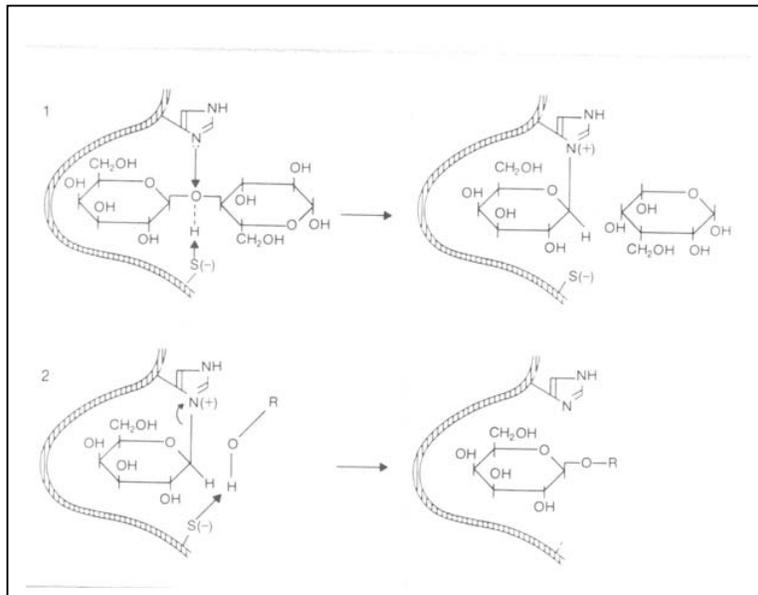


TESIS DINORA. Esquema que muestra la reacción que se da entre urea y ureasa en medio acuoso.

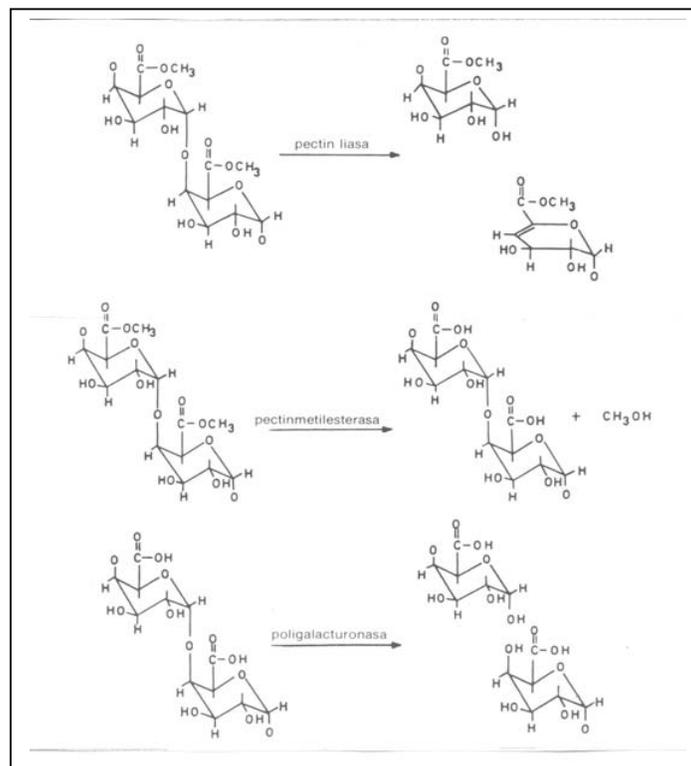


BADUI. Acción de la enzima lipoxigenasa sobre el ácido linoléico

ESQUEMA 6 F



BADUI. Mecanismo de reacción la enzima lactasa (β -galactosidasa) marcando al centro activo formado por el nitrógeno

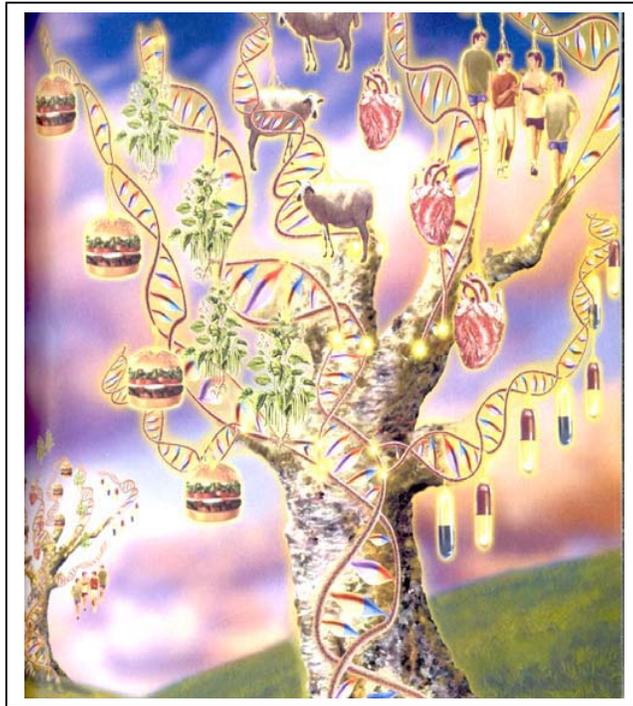


BADUI. Mecanismo de reacción de las enzimas pépticas.

CAPÍTULO 7

LAS MOLECULAS MAESTRAS

LOS ÁCIDOS NUCLEICOS



Oxigene óξύς - Karion Καριώυ

INTRODUCCIÓN



Las moléculas maestras que programan nuestro potencial biológico, empiezan a revelar sus grandes misterios.

Al trazar los científicos un esquema general del código genético con el proyecto HUGO, luego con el Proyecto Proteoma y finalmente con la terapia de ARN con retrovirus, vemos la promesa de curas para grandes enfermedades, la solución de misterios forenses, evolutivos y geriátricos no imaginados hace algunas décadas. Más, dichos avances presentan **paradigmas** éticos, morales y hasta religiosos; la pregunta de este nuevo milenio es ¿estamos listos para la era del gen?.

El ADN como molécula maestra tiene la capacidad retransmitir la información, adaptación y hasta mutación selectiva en cada una de sus células.

El cuerpo humano con sus más de 100 billones de células nucleadas que lo constituyen y sus 200 variedades múltiples, nos proporcionan una gama universal de células para el cultivo, aunque cabe aclarar que solo algunas se dejan cultivar satisfactoriamente **in vitro**, exceptuando al **eritrocito** y a la **plaqueta**, que carecen de núcleo.

Hoy en día se ha descubierto que las **células troncales** surgen en los 1^{os} estados de **desarrollo embrionario**, cuando las células tienen la posibilidad de convertirse en cualquier tipo de tejido u órgano humano gracias a que son **totipotenciales** e indiferenciadas.

Sin embargo, el uso de células de éste tipo pasa por la clonación de las células obtenidas después de la fecundación, lo que lo postra en un paradigma entre lo aceptable y lo condenable. Pero aún, el concepto más increíble, es el que nos plantea la **biotecnología** para este nuevo milenio, ya que, supone una nueva manera de introducir drogas y fármacos con un concepto novedoso; los **genofármacos**.

De éste modo, se pretende introducir enzimas, proteínas o **viriones**, virus, ARN, y por supuesto ADN que actuaran de manera selectiva y exacta; sin ocasionar ningún efecto adverso o secundario. La **bionanotecnología** esta en puerta en muchos países, solo falta la aceptación por parte de los presidentes, los legisladores y de las grandes corporaciones internacionales.

7.- ADN Y ARN - LAS MOLÉCULAS MAESTRAS

CITA TEXTUAL



¿Por qué existe la muerte programada? Existen varias razones, entre las que destacan el deshacerse de las células que ya no son necesarias, que estorban o son potencialmente peligrosas para el resto del organismo. Como parte de su desarrollo, en una etapa de su ciclo, las células pueden recibir señales que les activan genes letales y suicidarse: sintetizan las proteínas que encienden los mecanismos de entrada de calcio al interior de la célula, desarmando la arquitectura intracelular y acaban por incitar a cierto tipo de células (los macrófagos) a venir y devorarlas. A este proceso se le llama muerte celular programada, o apoptosis. Así mismo se ha encontrado que si se toman células de un mismo tipo, por ejemplo, fibroblastos, las de ratón se producen menos que las de caballo, y estas que las de tortugas de las islas Galápagos, especies que viven alrededor de 2, 30 y 150 años, respectivamente. El hecho de que las células tengan un calendario interno sugiere que su muerte esta genéticamente programada.

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Pintura que representa la gestación del hombre como un ser divino y que curiosamente proviene de una espiral en estado creciente, muy semejante a la biomolécula del ADN.

COMENTARIOS



En la década de los 50's se descubre la piedra esmeralda, el secreto de la vida, "el lenguaje perdido de los dioses" que desde hace muchos miles de años se encontraba perdido. Hoy se redescubre como el código genético.

El objeto principal, develar los secretos del gen humano tratando de encontrar la ubicación de los 30mil genes que poseemos en nuestros 46 cromosomas (92 cm de longitud que lo conforman) y su forma de operar. El trazado del mapa "estelar" consiste en averiguar la secuencia de cada uno de los nucleótidos que tiene el genoma y que suman 3000 millones, aunque paradójicamente, del total, solo el 5% es funcional y el resto es considerado de protección.

¡Mas sorprendente aún!, la diferencia entre un humano y otro solo son 100 genes y la similitud que existe entre el ser humano y el chimpancé es del 98.4%, en cuanto a genes.

En el campo de la **criminalística** moderna las impresiones genéticas (Huella Génica), permite identificar diferencias, a través de un esquema de bandas específicos y particulares. En donde éstas pueden ser identificadas por medio de sondas de ADN y que finalmente se esquematizan por un "sistema de código de barras" que le dan una identidad única a cada individuo, dejando al descubierto la identidad de cada ser humano.

Hoy por hoy la ética se está rindiendo ante los intereses económicos de unos cuantos.

FUENTES.



- 1).- BORZATTI Eduardo (foto), El monoteísmo es anterior a Sumer, Egipto e Israel, AÑO CERO, AñoXIV N° 160.
- 2).-DUHNE. M. Martha, ¿Por qué existe la muerte?, ¿Cómo Ves?, Año 1, N° 9, Agosto 1999.
- 3).-La era del gen, Nacional Geographic, Vol. 5, N° 4, Octubre 1999.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Preparar las muestras de ADN adecuadamente para su recolección, embalaje, transporte y conservación de las mismas.



IMPORTANCIA.

Contrariamente a otros tirajes biológicos, las muestras destinadas a un análisis de identificación genética deberán precisarse en:

- La rapidez del transporte.
- Evitar la contaminación por contacto directo.
- Evitar las fuentes de calor.
- Evitar el contacto directo.
- Evitar la contaminación por microorganismos.
- Evitar las radiaciones UV.
- Evitar la cercanía con enzimas de restricción genética.

Use tubos estériles preparados con EDTA (fabricado para el L.I.P.S. Paris), no agitar fuertemente, ni usar tubos con heparina.

¡NOTA IMPORTANTE!



Para las muestras no se deberá utilizar líquidos de conservación habituales en anatomía o en patología.

Conservación.

Los ácidos nucleicos se pueden conservar en cloruro de sodio en concentraciones que van desde 0.1M – 2.0 M

Acetato de amonio 2.0 M para la co-precipitación de oligonucleótidos o dNTP's.

El cloruro de litio 0.8 M, útil para precipitar el ARN (requiere mayor cantidad de etanol para el precipitado).

El acetato de sodio 0.25M se utiliza para las precipitaciones de rutina.

7.A.- OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE ADN HUMANO

MÉTODO- TÉCNICA



I.- La obtención de ADN humano se basa en la toma de las siguientes muestras:

MUESTRA	Post – Mortem.			
	48 HRS	1 SEMANA	1 MES	
GANGLIOS. L.	+++	+++	+++	EXCELENTE = +++
BAZO	+++	+++	+	BUENO = ++
CEREBRO	+++	+++	+++	FIABLE = +
RIÑÓN	+++	+++	++	NULO = -
CORAZÓN	+	-	-	
MÚSCULO	+	-	-	

Inmediatos.

UÑAS. Si están enteras, se pueden obtener de sangre o piel de su base

CABELLO. Tomarlos con una pinza o con cinta adhesiva, sin tocar el bulbo de la raíz (mínimo 10 cabellos con bulbo)

EPITELIALES. Se obtiene del interior de la mejilla o piezas dentarias sueltas, cuando el cadáver quedo irreconocible o bien del interior de las fosas nasales, o de pañuelos desechables.

SANGRE Y SEMEN. Son muestras ideales para una resuspensión, absorba la mancha con una gasa estéril y hágala secar con calor.

ORINA. Muestras de 100ml, solo en casos patológicos.

Para conservar las muestras, delimitar la mancha con un lápiz y guardar en sobre Kraft, gasa estéril, tubo de ensayo o caja de zapatos, etc.

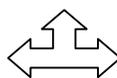
Cuando es posible, las muestras se toman en un tubo estéril y protegido. Solo se utiliza la congelación sin aditivos. En las muestras de sangre, utilizar tubos preparados con EDTA.

Si el análisis de su muestra requiere 1-3 días, conservar a -4 °C, y si su análisis requiere de 4 - 8 días, conservar a -20 °C. En ambos casos el embalaje debe ser permeable al aire, sin embargo una descongelación – recongelación abrupta es inhibitoria para el análisis.

Tomar en cuenta que el ADN es soluble en Etanol al 96% e insoluble en NaCl 2M.

*La preparación de la muestra se lleva a cabo siguiendo los pasos del II al VII de la práctica "Extracción de ADN animal I, II" o "Extracción de ADN vegetal".

FUNDAMENTO



La recolección, transporte y preparación de las muestras es, muy delicada por lo que se recomienda un exagerado cuidado para que no haya contaminación, alteración o destrucción de las mismas.

De hecho la muestra de ADN puede cuantificarse muy bien por el método de gravimetría, esto es, por secado y pesado directo.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

APLICACIÓN.



Su aplicación está en boga en el área de la criminalística, propiamente dicho en la química legal, ya que este tipo de información determinará el veredicto final en un juicio, conjuntamente con la PCR la electroforesis, el southern blotting y por último, el reconocimiento de la huella génica.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- Las Impresiones Genéticas de ADN, Aplicaciones Médico Legales, Fotocopias

INTRODUCCIÓN



La palabra ácido nucleico deriva del Griego ácido por **oxigene, ὀξύς** y nucleico de **nuclius, Karion, Καρίον** o centro, oxígeno central o ácido central.

El ADN consta de 2 hebras de polinucleotidos que se encuentran en el núcleo celular y se entrelazan entre sí en el espacio, para formar una estructura de "doble hélice".

Las 2 hebras tienen direcciones antiparalelas; esto es, sus direcciones 5' 3', son opuestas en ambas cadenas. Dada la relación geométrica que existe entre azúcar y fosfato, la hélice gira hacia la derecha.

Los patrones de difracción de rayos X indican que las bases están separadas por un espacio regular de 0.34 nm, a lo largo del eje de la hélice. La hélice completa un giro cada 34 nm, en donde existen 10 pares de bases por cada giro.

Las bases que componen a los ácidos nucleicos se dividen en 2 grupos, las **bases púricas** compuestas por Adenina =A (6 - amino purina) y la Guanina =G (2 - amino, 6 -oxipurina); mientras que las **bases pirimídicas** se integran por Citosina = C (2 oxi - 4 - amino pirimidina), Timina = T (2,4 - dioxi - 5 - metil - pirimidina) y en el caso del ARN, la T cambia por Uracilo =U (2,4 - dioxi pirimidina).

Dadas las características de la doble hélice, las hebras mantienen un registro exacto debido al apareamiento que existe entre las bases: A se aparea con T a través de 2 enlaces de hidrógeno; G se aparea con C mediante 3 enlaces de hidrógeno.

A la unión que se hace entre una base nitrogenada y el azúcar (desoxirribosa) se le denomina **nucleósido**; cuando se le añade un grupo fosfato, el grupo base - azúcar - fosfato se denomina **nucleótido** ** (consultar la nomenclatura anexa). El contenido de bases del ADN expresado por el cociente entre bases (G+C) / (A+T), difiere en los diversos organismos (animales, plantas y microorganismos) que se han originado en un momento de la evolución. Dadas las investigaciones, los organismos inferiores dan prueba de que la relación de cocientes de bases se encuentra en cifras relativamente amplias, mientras que en las especies superiores (ADN obtenido de cromosomas diferentes de distintos mamíferos) dan prueba de que esta relación es inversamente proporcional.

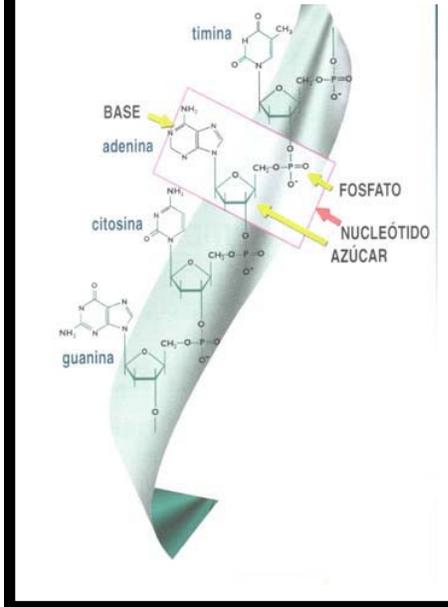
7.1.- ÁCIDOS NUCLEICOS

CITA TEXTUAL



"El ADN mitocondrial es más abundante en el material óseo y es más fácil de extraer que el nuclear; permite, además estudiar las migraciones y relaciones entre poblaciones en términos muy amplios. El ADN permite identificar relaciones familiares", comenta la doctora Tiesler. Sin embargo, hasta ahora, debido al deterioro de los restos óseos, el porcentaje de extracción exitoso es reducido. (1)

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Ilustración que nos muestra a las moléculas que conforman a la doble hélice del ADN con todas sus partes. (1)

GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuáles son las 4 bases que conforman el ADN?
- 2).- ¿Qué función tiene el detergente en la extracción del ADN?

COMENTARIOS



El ADN Mitocondrial: Las huellas de la madre.

“Todos los organismos con excepción de virus y bacterias están formados por células eucariontes, es decir cuya material genético se encuentra dentro de un núcleo definido. Este tipo de células también se caracterizan por tener mitocondrias, **organelos** que desempeñan la función de degradar moléculas de azúcar para producir la energía que la célula requiere para sus procesos metabólicos. Si bien la mayoría de los genes se encuentran en el núcleo celular, unos cuantos están en las mitocondrias, y, en el caso de las plantas, también se le haya en los cloroplastos. El ADN **mitocondrial** humano, cuya secuencia completa ya ha sido descifrada, es uno de los más pequeños que se conocen; contiene solamente 16, 569 pares de bases, que forman 13 genes reconocibles. A diferencia del ADN nuclear, el mitocondrial solo se hereda a través de la línea materna, esto es, los descendientes únicamente heredan ese ADN de la madre.

El estudio del ADN mitocondrial ha repercutido en diversas áreas del conocimiento y es particularmente útil para el análisis de fósiles que realiza la **bioarqueología**, ya que los cambios muchos son más lentos que en el ADN nuclear.

Las Todas las investigaciones actuales acerca de la tasa de cambios y mutaciones de éste material genético en restos de individuos de diferentes regiones geográficas, es una pieza clave para determinar si los seres humanos surgen en África o bien, su origen es **multirregional**.

FUENTES.



- 1).- BONFIL Olivera Martin, 50 Años de la doble hélice, ¿Cómo ves?, Año 5, N° 53, Noviembre 2003.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Extraer a partir de una muestra frutal ADN, utilizando solo reactivos y utensilios caseros.



IMPORTANCIA.

La importancia de ésta práctica radica en que se puede realizar dentro de su propio hogar y con utensilios caseros a excepción del alcohol.

El producto que se obtiene es ADN con impurezas, ya que se encuentra mezclado con fragmentos de ARN y algunas proteínas. Una extracción profesional se realiza teniendo en cuenta un número preciso de centrifugaciones, tiempos adecuados, con reactivos específicos y añadiendo enzimas de restricción que fragmenten las moléculas de ARN impidiendo que éstas se unan al ADN.

¡NOTA IMPORTANTE!



El alcohol isoamílico se debe conseguir previamente en una farmacia especializada, en preparado de reactivos o en una droguería especial. Para la solución tampón no utilizar agua corriente.

7.1.A.- EXTRACCIÓN CASERA DE ADN

MÉTODO- TÉCNICA

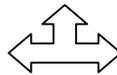


- I.- Tomar un trozo mediano de una cebolla, ajo, tomate o jitomate y cortar en cuadritos pequeños.
- II.- Triturar la muestra con una picadora automática, o una licuadora, o con una picadora manual (agregar un poco de agua) a impulsos de 10' seg hasta que quedar bien picado.
- III.- Tomar en un baso de precipitados 5ml del triturado celular, agregar 10 ml de solución tampón en frío y agitar vigorosamente durante 2' min.
- IV.- Separar cuidadosamente los restos vegetales más grandes del caldo molecular, usar una coladera fina, una manta de cielo o ambas. También lo pude hacer por centrifugado a 1300 – 1500rpm durante 5' min. Después, tomar el sobrenadante con una jeringa sin aguja, o con una pipeta y su propipeta respectiva.
- V.- Tomar 5ml del caldo molecular y pasar a un recipiente, o a un tubo de ensayo; añadir 10ml de alcohol isoamílico (enfriado previamente a 0° C); verter por las paredes, inclinar ligeramente el tubo (el alcohol queda flotando sobre el tapón).
- VI.- Finalmente introducir la punta de una varilla de vidrio justo entre la unión del tapón y el alcohol isoamílico, remover la varilla hacia atrás y hacia delante ligeramente y esperar a que se enrollen los fragmentos de mayor tamaño de ADN. Al pasar un minuto notará un filamento fino adherido a la varilla con aspecto de “algodón mojado” o de “clara de huevo”.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN.

- I.- Tomar 120ml de agua destilada o mineral en su defecto
- II.- Agregar 1.5g de cloruro de sodio o sal casera fina
- III.- Agregar 5g de bicarbonato de sodio o bicarbonato casero
- IV.- Por último agregar 5g de detergente o shampoo, homogenizarlo ligeramente y poner a reposar en un baño de hielo triturado o en una nevera.
- V.- El alcohol isoamílico bien se puede sustituir por etanol al 96%.

FUNDAMENTO



La extracción de ADN se basa primordialmente en la lisis de (rompimiento celular) mediante la acción de las cuchillas que facilitan el rompimiento de muchas células y en tanto que a las membranas de los organelos, quedarán expuestas a la acción del detergente; vaciando así su contenido en una disolución tampón en la que se disuelve el ADN, ARN, CHOS, PROTEINAS y otras sustancias. Con éste proceso las cadenas de ADN asociadas a proteínas se habrán fraccionando y por lo tanto solo queda extraerlo con la mezcla tampón y alcohol isoamílico.

La extracción de ésta biomolécula se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN permitiendo su disolución y finalmente su extracción.

APLICACIÓN.



La ventaja es que se puede realizar en laboratorio de nivel básico elemental, en el nivel medio o inclusive en casa, donde no se cuenta con equipos o reactivos específicos y que siempre podrá encontrar en una cocina.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



www...Joseacortes.com/practicas/extraccionADN.htm

¿PARA QUÉ SIRVE?



Extraer ADN de una muestra de tejido animal a partir de una técnica sencilla y después conservarlo.

IMPORTANCIA.



Es importante reconocer que ésta es una de las técnicas más sencillas para obtener ADN y bien puede adaptarse al nivel básico o inclusive a nivel casero. Dado que los recursos que se utilizan son muy elementales.

¡NOTA IMPORTANTE!



El alcohol etílico se debe mantener lo suficiente mente frío antes de agregarse a la mezcla. No se debe utilizar agua corriente, sino agua destilada o bidestilada.

Conservación.

Si el análisis de su muestra requiere 1-3 días, conserve a -4°C , y si su análisis requiere de 4 -8, conserve a -20°C . En ambos casos el embalaje debe ser permeable al aire, sin embargo una descongelación – recongelación abrupta es inhibitoria para el análisis.

7.1.B.- EXTRACCIÓN DE ADN ANIMAL I

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Preparar previamente las siguientes soluciones:

Solución de cloruro de sodio 30g en 250ml de agua.

Solución de detergente lo que tome la punta de su espátula en 100ml.

Alcohol etílico al 96% (comprar en farmacias y cerciorarse de su pureza)

II.- Obtener un hígado de pollo o de rata frescos y colocarlo en un recipiente, plato, mortero y picar con una picador manual. Se puede moler en una licuadora.

III.- Acomodar un trozo de tela de “manta de cielo” doble en la boca de un vaso de precipitados de 250ml, sujetar con una liga. Verter el hígado licuado sobre la tela, para separar los restos celulares con una varilla de vidrio.

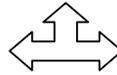
IV.- Enjuagar la tela bien y tomar un 2° vaso de precipitados, colocar la tela nuevamente con la liga y volver a filtrar el contenido del primer vaso, añadir 50ml de solución de cloruro de sodio.

V.- Quitar el trozo de manta de cielo y verter 1ml de detergente líquido con una pipeta, agitar suavemente la solución con una varilla de vidrio, en seguida verter 10ml de alcohol etílico con cuidado y por las paredes. Observar que en la solución aparecen 2 fases, y además comienzan a aparecer unos filamentos blanquecinos.

VI.- Introducir en la solución una varilla de vidrio y esperar a que las fibras se adhieran a ésta.

VII.- Lavar el ADN con etanol al 75%, disolver en 50ml de cloruro de sodio 2M y consérvelo.

FUNDAMENTO



La extracción de ADN se basa primordialmente en la lisis de (rompimiento) celular mediante un detergente, vaciando así su contenido en una disolución tampón en la que se disuelve el ADN, ARN, CHOS, PROTEÍNAS y otras sustancias. Con éste proceso las cadenas de ADN asociadas a proteínas se habrán fraccionando y por lo tanto solo queda extraerlo de la mezcla tampón con alcohol etílico. La extracción de ésta biomolécula se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN permitiendo su disolución, finalmente su extracción, purificación y conservación.

APLICACIÓN.



Es importante resaltar que éstas prácticas son de gran relevancia para la identificación de animales desconocidos por ende, se utilizan muy bien en investigación, en los niveles medio superior y superior, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico dada su sencillez.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- PONCE. Salazar. R. Margarita, Biología I, Libro de recursos para el profesor, México, Santillana, 1998.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener ADN de una muestra de tejido animal partiendo de una técnica sencilla y después conservarlo.

IMPORTANCIA.



Es importante reconocer que ésta es una de las técnicas más elementales para obtener ADN y bien puede adaptarse al nivel básico dados los recursos que se utilizan.

Se debe aprovechar la particularidad e que el ADN es insoluble en agua y en alcohol etílico al 96%; mientras que es soluble en una disolución de NaCl en agua al 2 M

7.1.C.- EXTRACCIÓN DE ADN ANIMAL II

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación previa

Solución amortiguadora a pH = 7.4.

Solución de cloruro de sodio al 0.14 M + Solución de citratos al =0.02M, juntarlas.

I.- Seguir los pasos II y III de la obtención de ADN animal I, luego, proceda a homogenizar el “bazo” del animal en 100ml de solución amortiguadora a pH = 7.4

II.- Centrifugar la mezcla a 5000 g / durante 15' min. Desechar el sobrenadante, lavar el precipitado y volver a centrifugar a las mismas condiciones, con otros 100ml de la solución amortiguadora.

III.- Resuspender el nuevo precipitado en NaCl 2 M, hasta obtener un volumen de 500ml y guardar en un frigorífico toda la noche a -4°C.

IV.- Al siguiente día se centrifugar a 20,000 g durante 15' min.

Al sobrenadante obtenido se le va a agregar lentamente, y por las paredes del recipiente, 1 litro de etanol, colocar una varilla de vidrio. Observar que comienzan a aparecer una fibrillas blanquecinas alrededor de la varilla de vidrio. Separar las 2 muestras.

V.- Sacar con cuidado una parte de la muestra de ADN, secar, colocar en un sobre estéril Kraft y mantener en refrigeración de -4°C, - 20°C según el tiempo de conservación.

VI.- Lavar la otra parte de la muestra del ADN con etanol al 75%, disolver en 50ml de cloruro de sodio 2M y conservar.

¡NOTA IMPORTANTE!



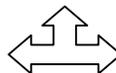
El tiempo de refrigeración dependerá de tiempo que se conservará antes de utilizarla.

El alcohol etílico se debe mantener lo suficiente mente frío antes de agregarse a la mezcla. No se debe utilizar agua corriente, sino agua destilada o bidestilada.

Conservación.

Si el análisis de su muestra requiere 1-3 días, conserve a -4 °C, y si su análisis requiere de 4 -8, conserve a -20 °C. En ambos casos el embalaje debe ser permeable al aire, sin embargo una descongelación – recongelación abrupta es inhibitoria para el análisis.

FUNDAMENTO



La extracción de ADN se basa primordialmente en la lisis de (rompimiento) celular mediante un detergente, vaciando así su contenido en una disolución tampón en la que se disuelve el ADN, ARN, CHOS, PROTEÍNAS y otras sustancias. Con éste proceso las cadenas de ADN asociadas a proteínas se habrán fraccionando y por lo tanto solo queda extraerlo de la mezcla tampón con alcohol etílico. La extracción de ésta biomolécula se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN permitiendo su disolución, finalmente su extracción, purificación y conservación.

APLICACIÓN.



Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de animales desconocidos, por ende se utilizan muy bien en los niveles medio superior y superior., aunque bien puede adaptarse al nivel básico

CLASIFICACIÓN.

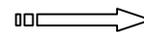
Básico Medio♦ Superior♦

Cualitativo.

Semicuantitativo♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Extraer a partir de una fruta ADN, utilizando solo reactivos y materiales de laboratorio muy elementales.

IMPORTANCIA.



Es importante reconocer que ésta es una de las técnicas más sencillas para obtener ADN y bien puede adaptarse al nivel casero, dados que los recursos que se utilizan son demasiado elementales, pero sin dejar de lado su preescisión.

¡NOTA IMPORTANTE!



El alcohol etílico se debe mantener lo suficiente mente frío antes de agregarse a la mezcla. No se debe utilizar agua corriente, sino agua destilada o bidestilada.

7.1.-D.- EXTRACCIÓN DE ADN DE FRUTA

MÉTODO- TÉCNICA



Preparaciones previas:

Baño de agua y hielo, y un vaso de precipitados de 100ml con 50ml de etanol.

Colocar en un vaso de 200ml, 90ml de agua destilada, 2g de sal casera y 10ml de detergente líquido y agitar suavemente con un agitador.

Pelar unos kiwis, obtener la pulpa y pesar 30g en puré fino

Preparar un baño maría.

I.- Colocar la solución de sal y de detergente en los 30g de kiwi (procurar que el volumen del líquido sea aproximadamente el doble del puré).

II.- Preparar un baño maría y mantener a 60°C, checar con un termómetro y ajustar con agua fría de ser necesario. Colocar el vaso con la solución y la fruta, e incubar de 10' - 15' min, agitar esporádicamente (cuide que la temperatura no baje de los 50°C)

III.- Una vez cubierto el tiempo, pasar el vaso con el contenido al baño de hielo y dejar reposar por 5' min,; agitar ocasionalmente.

IV.- Colocar un dispositivo de filtración compuesto por un soporte universal y un anillo metálico, un vaso de precipitados de 500ml, un embudo, un trozo de papel filtro doblado y remojado, y verter la mezcla a través del filtrado durante unos 5' min.

V.- Tomar 5 ml de l filtrado anterior, colocar en un tubo de ensayo y agregar un poco de etanol frío, escurrirlo por las paredes lentamente con un gotero y con el tubo ligeramente inclinado.

Tomar 10 ml de etanol frío con una pipeta y agregar sobre el dispositivo de filtración.

VI.- En ambos casos espera 2' min, colocar una varilla de vidrio y observar lo que pasa.

VII.- Lavar el ADN con etanol al 75%, disolver en 50ml de cloruro de sodio 2M y conservar

FUNDAMENTO



La extracción de ADN se basa primordialmente en la lisis de (rompimiento) celular mediante un detergente, vaciando así su contenido en una disolución de cloruro de sodio en la que se disuelve el ADN, ARN, CHOS, PROTEÍNAS y otras sustancias. Con éste proceso las cadenas de ADN asociadas a proteínas se habrán fraccionando y por lo tanto solo queda extraerlo (de la mezcla de sal y detergente) con alcohol etílico. La extracción de ésta biomolécula se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN permitiendo su disolución y finalmente su extracción.

APLICACIÓN.



La ventaja es que se puede realizar en laboratorio de nivel básico elemental, en el nivel medio o inclusive en casa; donde no se cuenta con equipos o reactivos específicos y que siempre podrá encontrar en una cocina.

CLASIFICACIÓN.

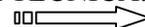
Básico ♦ Medio ♦ Superior

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1).-CATALÁ Rosa María, Extracción del ADN de Kiwi, Edición especial sobre las ciencias del genoma ¿Cómo ves?, Guía del maestro, Año 4, N° 37, Diciembre, 2001.

2).- <http://www.exploratorium.edu/ti/humanbody/dna.html>

¿PARA QUÉ SIRVE?



Extraer ADN y ARN por medio de la técnica de centrifugación e identificarlos con difenil amina y orcinol.

IMPORTANCIA.



En la fracción tisular, los núcleos y el homogenizado representan 1g de del tejido inicial por cada 5ml de solución. Para las mitocondrias, la fracción soluble y microsomas, su valor es de 1g / 10ml.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure ir anotando los volúmenes de sobrenadante y no confunda lo que se va a desechar con lo que es volumen de trabajo. Sea muy preciso en la preparación de sus reactivos y en el manejo de las condiciones físicas.

7.1.E.- AISLAMIENTO DE ADN Y ARN DE MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Tomar un trozo de hígado fresco y homogenizar al 10% (p/v) en una mezcla de sacaros al 0.25 M, KCl 0.01 M y $MgCl_2$ 0.003 M, al 90%; centrifugar a 8200G / 1' min.
 - II.- Obtener el sobrenadante y centrifugar a 40 000 G / 5' min. Desechar los núcleos y restos celulares.
 - III.- Volver a suspender las mitocondrias en 5ml de sacarosa – $MgCl_2$ / 1g de muestra.
Centrifugar el sobrenadante (los microsomas) a 254 000 G, incluyendo su tiempo de aceleración y anotar el volumen del sobrenadante.
 - IV.- Suspender los microsomas en 2ml de $MgCl_2$ – amortiguador TRIS (desoxicolato de sodio al 0.3 %), centrifugar a 100 000 G / 1° hr. Para separar los ribosomas de los microsomas que comprenden también las membranas de los retículos endoplásmicos con polisomas (Ribosomas con ARNm).
 - V.- En tubos de centrifuga cónicos de vidrio y de pared gruesa, agregar 1ml del homogenizado inicial (mezcla de sacaros al 0.25 M, KCl 0.01 M y $MgCl_2$ 0.003 M), solo que al 20% ésta vez + 1ml de cada fracción tisular + 2.5 ml de TCA (ácido tricloroacético al 10%, frío), colocar en un baño de hielo, agitar y centrifugar a 2 000 G / 5' min. Y desechar el sobrenadante. La operación se realiza en una centrifuga clínica de mesa.
 - VI.- Repetir el lavado con 2.5ml de TCA al 10% helado; desechar el sobrenadante (iones y metabolitos).
 - VII.- Ahora, añadir 5ml de alcohol etílico caliente (de 60° - 70° C), dejar actuar durante 5' min. y centrifugar a 2 000 G / 3' – 5' min.
 - VIII.- Extraer los lípidos, repetir el paso anterior y desechar el extracto de lípidos.
 - IX.- La solución restante se extrae con 2.5 ml de TCA al 5% a 90° C, que se deja actuar durante 15' min. Agitándolo, luego centrifugar a 2000 G / 3' – 5' min. Extraer los ácidos nucleicos y conservarlos.
 - X.- El restante se extrae con 2.5ml de PCA (ácido perclórico) a 70°C, dejarlo actuar por 15' min; al 2%. Desechar el residuo de proteínas.
 - XI.- Los extractos obtenidos de ADN y ARNm (5ml), se analizan con difenilamina y orcinol
- *Checar tabla de fraccionamiento subcelular

FUNDAMENTO



Tanto el $MgCl_2$ como el y el TCA en frío nos permiten extraer los ácidos nucleicos con gran facilidad; mientras que el PCA nos permite quitar el exceso de proteínas adheridas a ADN. Por otro lado, el tiempo de centrifugación y la velocidad nos permiten una selectividad en la obtención de la biomolécula deseada.

APLICACIÓN.



Dada la preescisión con que trabaja en ésta práctica, solo se recomendable para los niveles superior y en otros casos en investigación, en los niveles de postgrado.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

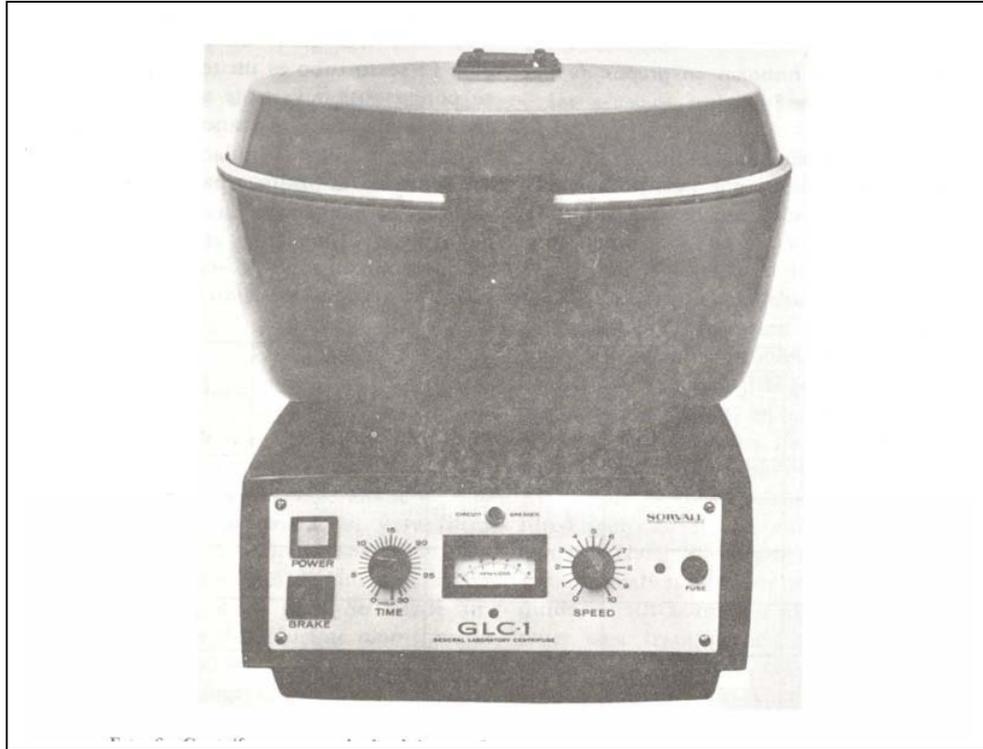
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



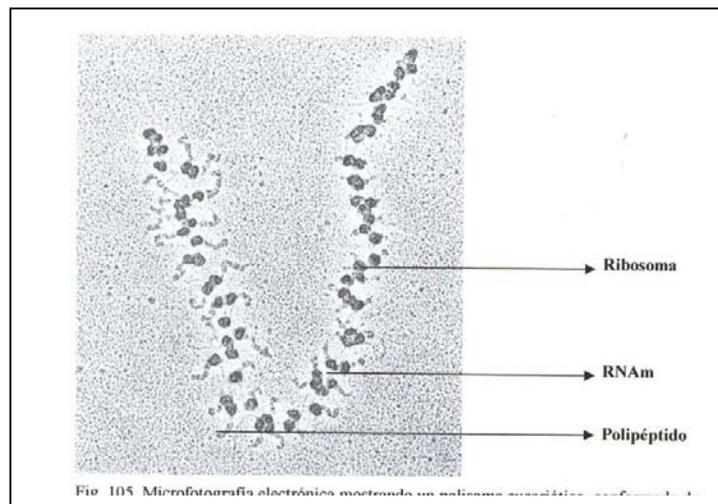
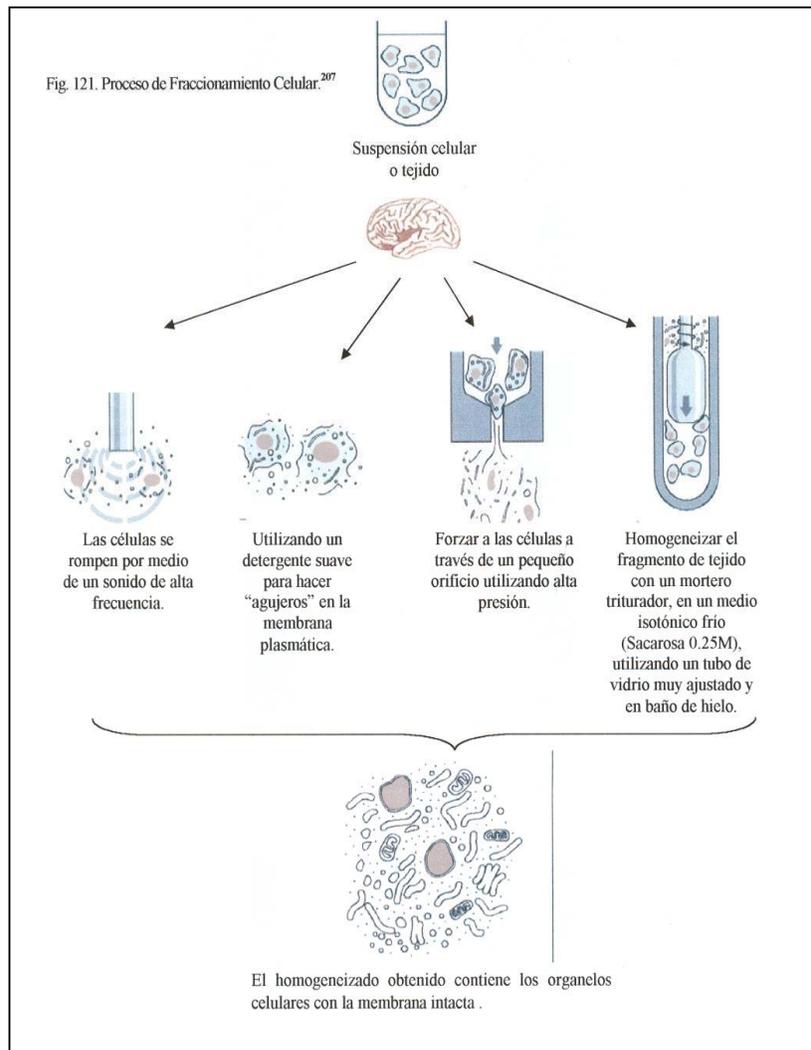
1.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

ESQUEMA 7 A *FRACCIONES SUBCELULARES*



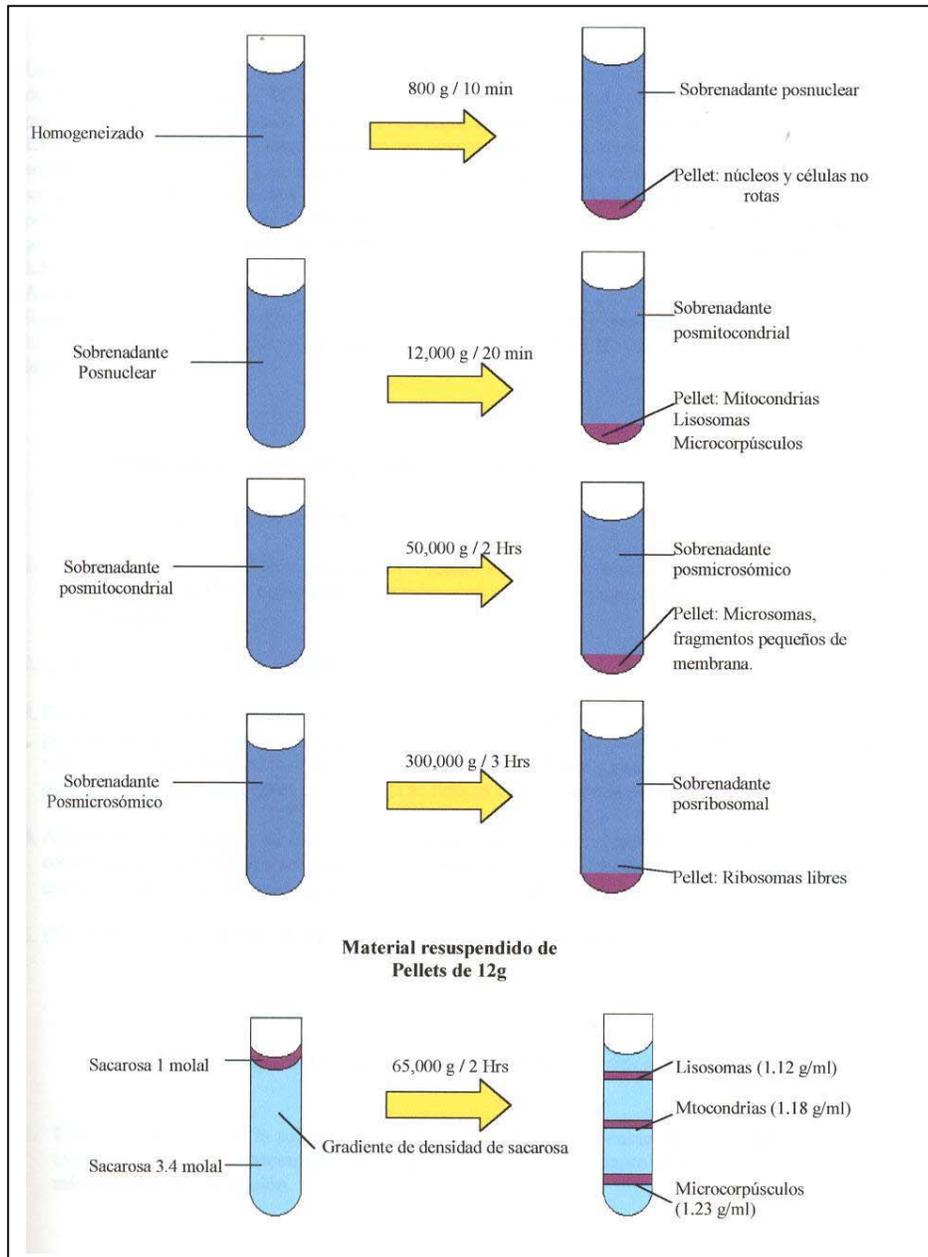
RENDINA. Esquema que nos muestra una centrifuga general de laboratorio

ESQUEMA 7 B FRACCIONES SUBCELULARES



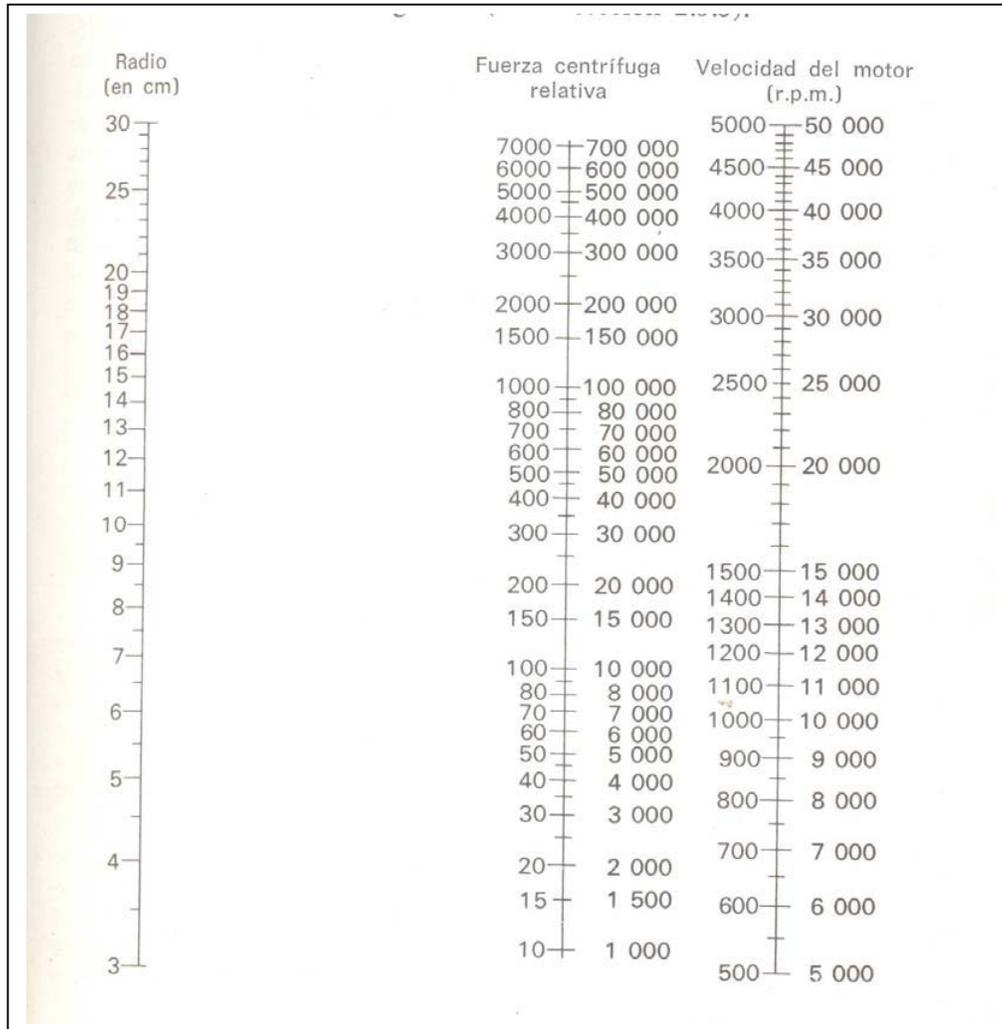
TESIS VERÓNICA. Obtención de organelos y biomoléculas

ESQUEMA 7 C *FRACCIONES SUBCELULARES*



TESIS VERÓNICA. Obtención de lisosomas y mitocondrias por centrifugado

TABLA 7 A FRACCIONES SUBCELULARES



WILLIAMS. Tabla de conversiones de r.p.m. a C.C.R. (valor de campo centrífugo relativo)

TABLA 7 B FRACCIONES SUBCELULARES

PARTÍCULA	OBTENCIÓN POR CENTRIFUGACIÓN	CONSTITUYENTES CARACTERÍSTICOS	FUNCIÓN BIOLÓGICA
Núcleo	10 min 700 g	DNA, proteínas básicas RNA (nucléolo) Enzimas de síntesis del DNA y del RNA	Conservación y transferencia de la información genética
Mitocondrios . . .	10 min 10 000 g	Lípidos, proteínas, metales e iones Enzimas de oxidación DNA, RNA	Oxidaciones celulares Transmisión de energía Conservación y transferencia de la información genética
Lisosomas	10 min 10 000 g	Enzimas hidrolíticos y proteolíticos	Digestión intracelular, hidrólisis de las proteínas
Retículo endoplasmático	60 min 100 000 g	Lipoproteínas	Transporte de las proteínas Síntesis de glicoproteínas
Aparato de Golgi			Exportación de proteínas
Ribosomas	60 min 100 000 g	Ribonucleoproteínas	Biosíntesis de proteínas
Fracción soluble .	Sobrenadante después de 60 min 100 000 g		Numerosos enzimas: glucólisis
Membrana		Lípidos, fosfolípidos, proteínas, glúcidos	Penetración específica

WILLIAMS. Tabla de fraccionamiento subcelular por técnica de centrifugación

TABLA 7 C

	Volumen del extracto 1	Absorbancia para medición del RNA 2	RNA en 0.5 ml, mg 3	RNA en cada fracción, mg 4	RNA total en el hígado 5	Rendimiento por 100 6	Absorbancia para medición del DNA 7	DNA en 1 ml 8	DNA en cada fracción 9	DNA total en el hígado 10	Rendimiento por 100 11
Homogeneizado	1.0					100					100
Núcleos	5.0										
Mitocondrias	5.0										
Microsomas	2.0										
Sobrenadante soluble											

RENDINA. Tabla de rendimiento de fracciones subcelulares por centrifugado. Práctica 7.1.E

TABLA 7 D FRACCIONES SUBCELULARES

$$\text{RNA total (mitocondrias)} = \frac{\text{mg de RNA}}{0.5 \text{ ml de TCA}} \times \frac{50 \times 4.8}{2.6} \quad (\text{o } \times 92.3)$$

$$\text{RNA total (microsomias)} = \frac{\text{mg de RNA}}{0.5 \text{ ml de TCA}} \times \frac{20 \times 4.8}{2.6} \quad (\text{o } \times 36.9)$$

$$\text{RNA total (F. soluble)} = \frac{\text{mg de RNA}}{0.5 \text{ ml de TCA}} \times \frac{200 \times 4.8}{2.6} \quad (\text{o } \times 369)$$

RENDINA. Tabla A que nos muestra la cuantificación adecuada de ARN. Práctica 7.1.E

TABLA 7 E FRACCIONES SUBCELULARES

Pueden obtenerse de la misma forma, los valores de DNA en estas tres fracciones, pero introduciendo otra consideración: en lugar de 0.5 ml, la mezcla de ácidos trichloroacético y perclórico utilizada para el análisis químico fue de 1.0 ml.

$$\text{DNA total (mitocondrias)} = \frac{\text{mg de DNA}}{1.0 \text{ ml de PCA}} \times \frac{25 \times 4.8}{2.6} \quad (\text{o } \times 46.1)$$

$$\text{DNA total (microsomias)} = \frac{\text{mg de DNA}}{1.0 \text{ ml de PCA}} \times \frac{10 \times 4.8}{2.6} \quad (\text{o } \times 18.46)$$

$$\text{DNA total (F. soluble)} = \frac{\text{mg de DNA}}{1.0 \text{ ml de PCA}} \times \frac{100 \times 4.8}{2.6} \quad (\text{o } \times 184.6)$$

En el caso de los núcleos, la corrección por la introducción de un nuevo factor; se emplea debido al haber apartado 1 ml antes de continuar con el aislamiento, exige la introducción de un nuevo factor; se emplea 2.2 en lugar de 2.6 como peso de hígado utilizado.

$$\text{RNA total (núcleos)} = \frac{\text{mg de RNA}}{0.5 \text{ ml de PCA}} \times \frac{50 \times 4.8}{2.2} \times \frac{11}{10} \quad (\text{o } \times 120)$$

$$\text{DNA total (núcleos)} = \frac{\text{mg de DNA}}{1.0 \text{ ml de PCA}} \times \frac{25 \times 4.8}{2.2} \times \frac{11}{10} \quad (\text{o } \times 60)$$

Finalmente, para los cálculos referidos se conservó para la medición de RNA y a la fracción del homogeneizado inicial que DNA totales en hígado,

$$\text{RNA total (homogeneizado)} = \frac{\text{mg de RNA}}{0.5 \text{ ml de PCA}} \times 10 \times \frac{11}{1} \times \frac{4.8}{2.2} \quad (\text{o } \times 240)$$

$$\text{DNA total (homogeneizado)} = \frac{\text{mg de DNA}}{0.5 \text{ ml de PCA}} \times 5 \times \frac{11}{1} \times \frac{4.8}{2.2} \quad (\text{o } \times 120)$$

RENDINA. Tabla B que nos muestra la cuantificación adecuada de ADN y ARN. Práctica 7.1.E

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de ADN mediante sus cambios fisicoquímicos, que permiten a la biomolécula ser detectada por su desnaturalización.

IMPORTANCIA.



Una vez obtenido el ADN de las prácticas anteriores, ésta práctica constituye un método rápido, eficaz y cómodo en el laboratorio escolar.

¡NOTA IMPORTANTE!



Calibre adecuadamente el espectrofotómetro y prepare muy bien los tubos a leer problema, patrón y blanco.

7.1.F.- CAMBIOS HIPERCROMÁTICOS Y DE VISCOSIDAD EN ADN PURO CON EFECTO DE pH.

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Tomar 15ml de ADN en una solución de NaCl 0.15 M o comprar un preparado comercial de una industria farmacéutica.

II.- Añadir 2ml de ADN a cada tubo espectrofotométrico (6 tubos de lectura) más:

- 1° añada 2ml de borato 0.05 M a pH = 8.5.
- 2° añada 2ml de borato 0.05 M a pH = 9.5.
- 3° añada 2ml de borato 0.05 M a pH = 10.5.
- 4° añada 2ml de borato 0.05 M a pH = 11.5.
- 5° añada 2ml de borato 0.05 M a pH = 12.5.
- 6° Preparar un blanco

III.- Leer los tubos en un espectro de UV a 260nm y construir una curva de absorbancia contra pH.

*El parámetro variable de la serie experimental se selecciona previamente (Efecto de pH, calor y formol, calor y enfriamiento rápido y DMF – Dimetil formamida) en la bibliografía citada en la referencia, mientras que el cambio de absorbancia se mide en función de los blancos amortiguadores apropiados.

Otro parámetro que se sugiere variar para otra práctica es la temperatura de ebullición del agua.

*Checar tabla de condición de reactivos para hiperchromaticidad.

FUNDAMENTO



Los cambios hiperchromáticos de absorbancia de ADN o ARN constituyen un método fácil para establecer el contenido total de espirales desnaturalizadas. A éste fenómeno se le conoce como hipocromia a la disminución de la absorbancia de luz UV por un ácido nucleico, está basada en la suma de absorción luminosa que nos da a conocer la composición de nucleótidos. Al quedar expuestas las dobles ligaduras de las bases nitrogenadas producen un efecto de resonancia.

Cuanto mayor sea el ordenamiento en una molécula nucleica, mayor será el efecto hipocromico. El efecto contrario sería la hiperchromia, o sea, un aumento de absorbancia en la región de luz UV por ruptura o desnaturalización de la biomolécula.

APLICACIÓN.



Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ADN, por ende se utilizan muy bien en todos los niveles e investigación, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se haga cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

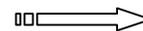
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

TABLA 7 F

Conjunto I Efecto del pH	Conjunto II Calor y formol*	Conjunto III Calor y enfriamiento rápido**	Conjunto IV Dimetilformamida (DMF)***
Borato 0.05 M, pH 8.5	borato 0.05 M, pH 8.5	borato 0.05 M, pH 8.5; calentar a 50°C; en- friar de inmediato	borato 0.02 M, pH 8.5
Borato 0.05 M, pH 9.5	borato 0.05 M + 2 por 100 de CH ₂ O	calentar a 60°C; enfriar de inmediato	borato 0.02 M en DMF al 20 por 100
Borato 0.05 M, pH 10.5	borato 0.05 M + CH ₂ O al 2 por 100 (calentar a 60°C durante 5, 15 y 30 min)	calentar a 70°C; enfriar de inmediato	borato 0.02 M en DMF al 40 por 100
Borato 0.05 M, pH 11.5			
Borato 0.05 M, pH 12.5	borato 0.05 + CH ₂ O al 2 por 100 + NaCl 1 M (calentar a 60°C durante 5, 15 y 30 min)	calentar a 80°C; enfriar de inmediato calentar a 90°C; enfriar de inmediato calentar a 95°C; enfriar de inmediato	borato 0.02 M en DMF al 80 por 100

RENDINA. Tabla que nos muestra las condiciones adecuadas de reactivos para hipercromaticidad para ADN. Práctica 7.2.E

INTRODUCCIÓN



Ya en 1886, se hablaba de genes por el monje austriaco Gregorio Mendel quien publicó sus investigaciones realizadas con chícharos. Anteriormente en 1869 El bioquímico Alemán Friedrich Miescher.

Ya había descubierto esta sustancia en el núcleo celular, la cual tenía propiedades ácidas y entre sus componentes estaba un azúcar llamado “desoxirribosa” y por ésta razón se le da el nombre de Ácido Desoxirribonucleico.

La palabra proviene de Ácido Desoxi Ribonucleico (ADN).

El termino fue acuñado cuando James Watson y Francis Crick en 1953 miran una escalera de caracol con la ayuda del mejor químico de ese entonces, Linus Pauling., tras mirar un proyecto semejante en proteínas, Watson y Crick concluyen la “estructura B” (la estructura clásica del ADN). 9 años más tarde les valdría el premio Nobel de **fisiología** y medicina.

En la actualidad se conocen 3 tipos de *ADN lineal* con las siguientes características: 2 hebras de **polinucleótidos** pueden formar una hélice que gira hacia la derecha o hacia la izquierda. Dada la geometría de la columna del azúcar –fosfato con 10 pares de bases por cada giro, el ADN más común es una hélice que gira hacia la derecha y se le denomina **forma B**, presente en la mayoría de las formas celulares. También presenta un par de hendiduras llamadas mayor y menor las cuales son útiles para las diferentes proteínas fijadoras de ADN.

A diferencia de la forma B; la **forma A**, es más compacta, tiene 11 pares de bases por cada giro, también muestra una gran inclinación de las pares de bases con respecto al eje de la hélice, además tiene un orificio central en la parte inferior.

PIE DE FOTO.



Imagen que nos ilustra el ADN- B clásico en toda su magnitud (1).

7.2.- ADN - LINEAL

CITA TEXTUAL



La mayoría de la gente acepta que los genes controlan como va a ser un organismo: el color de la piel o de los ojos. Sin embargo, cuesta trabajo aceptar que los genes determinen el comportamiento de un animal, sobre todo si se plantea que los genes determinan la conducta de nosotros, los humanos.

Solo para recordar, los experimentos de genética se hacen así: se toma un bicho, se le expone a algo (productos químicos, rayos X, etcétera.) que dañe al ADN de sus espermatozoides y, por lo tanto, produzca una mutación (cambio al azar de sus genes) (2).

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuáles son las moléculas que conforman a un ácido nucleico?
- 2).- ¿Qué tipos de forma tiene el ADN?
- 3).- Mencione que agentes provocan mutaciones en el ADN
- 4).- ¿En qué año se descubre el ADN?
- 5).- ¿A qué temperatura se debe conservar una muestra de ADN que se usará al siguiente día?

COMENTARIOS



El **DNA Z** se caracteriza por girar hacia la izquierda, presenta un aspecto “zigzagueante” (de ahí Z) cuando se observan desde la cara lateral. En ocasiones puede aparecer una estructura triple helicoidal en alguna porción de ADN donde todas las bases púricas (A-G) de una hebra se aparean con las bases pirimidicas (T-C), estas porciones pueden acomodar una tercera hebra de polipirimidinas.

Es muy probable que en las células existan porciones de ADN con forma A y Z coexistiendo simultáneamente.

El ADN generalmente es una molécula muy estable con la suficiente capacidad para mantener la información genética estable. No obstante, las alteraciones que se llegan a producir pueden ser corregidas a través de diversos mecanismos de reparación.

Las **mutaciones** generalmente se producen por 2 mecanismos principales: Alteraciones químicas de las bases, la incorporación o ausencia de bases, o el mismo cambio de lugar de las bases, que se traducen en una replicación o una traducción incorrecta.

Los agentes físicos suelen ser: los rayos γ , χ , $\lambda\nu$; mientras que los químicos suelen ser los agentes alquilantes, los oxidantes, los análogos de bases y los radicales libres y los biológicos suelen ser los virus de diferentes especies (ADN y ARN), los **transposones** y los priones?

Las alteraciones leves del ADN que no son reparadas y tampoco producen la muerte de una célula originan una mutación directa en el material genético.

FUENTES.



- 1).- CEBALLOS Miguel Ángel, El proyecto de 1 genoma humano en la balanza, ¿Cómo ves?, Año 2, N° 21, Noviembre 2000.
- 2).- REYNAUD Enrique, Los genes y la conducta sexual, ¿Cómo ves?, Año 2, N° 14, Enero 2000.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar las purinas presentes en el ADN mediante una reacción conocida como "Ensayo de la Murexida", la cual hace evidentes a los productos de la purina por un vire de color.



IMPORTANCIA.

Es conocido que las purinas comprenden a un grupo numeroso de compuestos entre los cuales figuran el ácido úrico, la cafeína y las bases púricas provenientes de unja hidrólisis de los ácidos nucleicos. Por ésta última razón, la práctica se centra en trabajar con ADN's diferentes en donde se expone a las bases (A y G) en sus diferentes interacciones físico químicas; comprobando así la eficacia de la reacción cuando éstas se encuentran interaccionando con otros grupos funcionales, o bien, con otros enlaces, o también, cuando se encuentran enmascaradas con otras biomoléculas.

Por lo demás es una práctica muy sencilla y rápida, que bien puede llevarse del nivel cualitativo hasta el nivel cuantitativo.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tenga cuidado de manejar muy bien las muestras de ADN para no contaminarlas, trabaje con guantes de látex, no tenga contacto directo con el amoníaco, trabájelo en una campana extractora; además procure no tener contacto directo ni con el ácido nítrico ni con la murexida.

7.2.A.- IDENTIFICACIÓN DE PURINAS POR ENSAYO DE LA MUREXIDA

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Colocar una placa de porcelana con 10 pozos y agregar 200 mg de lo siguiente en cada pozo:

- 1)* Adenina y /o Guanina - comercial
- 2) *ADN - Z Comercial
- 3) *ADN - B Comercial
- 4) *ADN - A Comercial
- 5)** ADN de la práctica. "Aislamiento de ADN y ARN de Mitocondrias y Microsomias" (ADN puro)
- 6) ***ADN Bacteriano. De la práctica "Aislamiento de ADN de Levaduras y Bacterias" (ADN puro)
- 7)** ADN De levaduras. De la práctica "Aislamiento de ADN de Levaduras y Bacterias" (ADN puro)
- 8) ADN De kiwi. De la práctica "Extracción de ADN de Fruta" (ADN puro)
- 9) ADN Animal. De la práctica "Extracción de ADN Animal I" (con proteínas.)
- 10) ▲ ADN Humano desnaturalizado. De la práctica "Cambios Hiper Cromáticos y de Viscosidad en ADN Puro con Efecto de pH" (ADN puro)

II.- Agitar con una varilla de vidrio y agregar 1ml de ácido nítrico concentrado.

III.- Calentar muy suavemente las pozas o las cápsulas de porcelana con un mechero (en caso de que lo haya hecho por separado), hasta que el contenido se evapore casi hasta la sequedad.

IV.- Sacar un frasco de amoníaco concentrado en el interior de una campana y exponer las muestras a los vapores, esperar los resultados. Identificar la presencia de color o su ausencia y la intensidad del mismo.

R (+) = Aparición de un color rojo púrpura característico de la reacción de las murexidas.

FUNDAMENTO



Muchas de las purinas dan una reacción coloreada que se le conoce con el nombre de "Ensayo de la Murexida". Bien se sabe que las purinas, al ser estructuras aminadas y con dobles enlaces, se vuelven resonantes en un medio ácido, promoviendo el movimiento electrónico. De esto, se deduce que "a mayor número de estructuras resonantes, mayor será el color y mayor será la estabilidad de la molécula".

Aunque es muy poca la información que se conoce de sus productos, es cierto que identifica muy bien a los derivados de purinas como la cafeína y el ácido úrico.

APLICACIÓN.



Ésta práctica bien puede aplicarse a los niveles básico y medio superior ya que no es necesario contar con todas las muestras de ADN ni con su pureza; bien se puede adaptar a las necesidades del laboratorio escolar con el número y selección de muestras deseadas.

CLASIFICACIÓN.

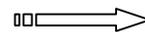
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- BREWSTER Q. Ray, Curso de Química Orgánica experimental, España, Alhambra, 1978.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Verificar que la biomolécula obtenida es efectivamente ADN, valiéndose de una técnica de sustitución de bases con 2 reactivos diferentes.

IMPORTANCIA.



Una vez que se ha obtenido y purificado una muestra de ADN, es importante resaltar su presencia de manera sencilla, concreta y eficaz.

¡NOTA IMPORTANTE!



Procure que la muestra a trabajar no exceda el tiempo y las condiciones de conservación. Además hay que cuidar que el manejo de la muestra para que ésta no se contamine, trabaje con guantes de látex. Procure no tener contacto directo con los colorantes ya que suelen ser cancerígenos.

7.2.B.- DETERMINACIÓN DE ADN POR SUS BASES

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación previa:

Solución de naranja de acridina 1g en 99ml de alcohol etílico.

I.- Una vez que ha extraído el ADN y lo ha purificado por cualquiera de las 5 técnicas Anteriores (7.1.A, 7.1.B, 7.1.C, 7.1.D y 7.1.E) debe conservarlo adecuadamente y, solo entonces, se procede a tomar 2 muestras de ADN y 2 de ARN (si es fresca mejor) y tratarlas como sigue.

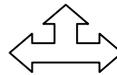
II.- Depositar una parte de las fibras en un porta objetos cada uno y agregar 2 gotas de naranja de acridina, esperar 5' min; quitar el excedente con una servilleta de papel.

III.- Colocar un cubre objetos y observar al microscopio los cambios que se dan en ADN y en ARN.

IV.- Colocar una muestra de ADN y otra de ARN en 2 vidrios reloj, colocar unas gotas de bromuro de etidio y exponerlas a luz UV.

*Al teñir el ADN y el ARN con bromuro de etidio. Sus complejos ADN – BrEt y ARN – BrEt, fluorescen bajo la luz UV

FUNDAMENTO



El ADN, al tener una estructura helicoidal tridimensional permite, que otras estructuras moleculares con hibridación sp^2 planas como el bromuro de etidio se inserten adecuadamente entre los puentes de hidrógeno y las base para realizar una resonancia electrónica y de ésta manera se de un "halo de fluorescencia" en toda la molécula al ser estimulada con luz UV.

APLICACIÓN.



Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ADN desconocidos, por ende se utilizan muy bien en los niveles medio superior y superior, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se tenga el cuidado adecuado.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦

Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- Las Impresiones Genéticas de ADN, Aplicaciones Médico Legales, Fotocopias.

2.- PONCE. Salazar. R. Margarita, Biología I, Libro de recursos para el profesor, México, Santillana, 1998.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la presencia de 2 carbohidratos del orden de los monosacáridos presentes en el ADN y el ARN

Determinar de manera cualitativa la presencia de azúcares en muestras biológicas.

IMPORTANCIA.



Su importancia radica en que diferencia entre pentosas, hexosas y heptosas

Además es una prueba determinante y específica para ADN y ARN

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida, recomendable para el nivel superior y medio superior.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cerciorarse previamente de que tanto reactivos como materiales estén bien limpios y secos. Cuidar de que las muestras de ADN y ARN no se contaminen, trabajar con guantes de látex. Tener cuidado al trabajar con el ácido concentrado.

7.2.C.- IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Colocar 6 tubos de ensayo y añadir 1ml de los siguientes reactivos:

Ribosa y Desoxirribosa, una muestra de ADN y otra de ARN desnaturalizado y otras 2 muestras sin desnaturalizar, para probar las diferencias.

II.- Enseguida añadir 8 gotas del reactivo de Bial + 1.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.

III.- Calentar los tubos a baño María durante 10' min y esperar resultados.

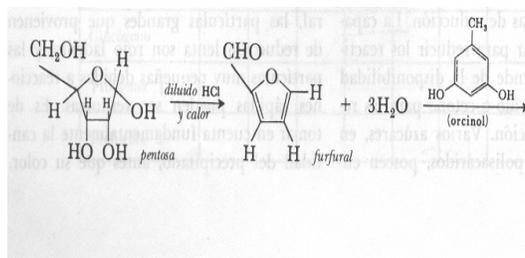
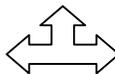
Resultados:

Pentosas (+) = Verdoso o Azul Violáceo

Hexosas (+) = Naranja- Amarillo – Café

Heptosas (+) = Púrpura

FUNDAMENTO



Orcinol + Fe Cl₃ en medio ácido. El producto de esta reacción es una superposición de las nubes electrónicas entre el furfural y el difenol, esto es, una reacción de condensación de nubes electrónicas entre grupos cíclicos.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas, aunque no es muy usual para la identificación de ADN o ARN.

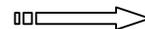
CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo ♦
Semicuantitativo.

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-DOMINGUEZ. Xorge. A. Experimentos de Química Orgánica, 5^a/e^d, México, limusa, 1984.
- 2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM México,1993.
- 3.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cuantitativa la presencia de un azúcar en muestras biológicas.

Determinar la presencia de desoxirribosa, carbohidrato del orden de los monosacáridos presentes en el ADN, valiéndose de un método llamado curva patrón y una técnica colorimétrica.

IMPORTANCIA.



Su importancia radica en que diferencia entre desoxirribosa y ribosa mediante un virre de color característico.

Además es una prueba determinante y específica para ADN y ARN, que suele ser cuantitativa.

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida. Recomendable para el nivel superior e investigación.

¡NOTA IMPORTANTE!



Calibre adecuadamente el espectrofotómetro y prepare muy bien los tubos a leer problema, patrón y blanco.

7.2.D.-CURVA PATRÓN DE LA DESOXIRRIBOSA CON DIFENILAMINA

MÉTODO- TÉCNICA



Preparar las siguientes soluciones:

10ml de ácido tricloroacético al 10%

Reactivo de difenil amina. 1 g de difenil amina en 100ml de ácido acético glacial + 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado.

I.- Siguiendo el paso VII de "Extracción de ADN Animal", tomar 2ml de ésta solución y añadir 1 ml se ácido tricloroacético al 10% + 5ml de reactivo de difenil amina.

II.- Realizar una ligera mezcla y calentar 10'min a baño maría

III.- Preparar una curva patrón con 5 tubos patrones a diferentes concentraciones en solución (como se indica en la tabla posterior) y su respectivo blanco, leer a 595 nm.

R (+) = Color Azul

***Checar tabla de parámetros de medición de ADN con Difenil Amina. Comparar la misma práctica para la Ribosa 7.6.C.**

FUNDAMENTO



El azúcar conocido como desoxirribosa, reacciona fácilmente con la difenil amina en medio ácido, dando una reacción positiva solo en los azúcares unidos a bases púricas, ya que éstas se liberan adoptando una configuración abierta dentro de la cadena de ADN.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas, es muy usual para la identificación de ADN en los procesos y métodos de investigación.

Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ADN, por ende se utilizan muy bien en todos los niveles e investigación, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se haga cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

TABLA 7 G

Reactivos	Tubo número									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A) Patrón de DNA (50 mg/100 ml) en ácido perclórico 1 N, ml		0.1 (0.05 mg)	0.2 (0.1 mg)	0.4 (0.2 mg)	0.8 (0.4 mg)					
B) Extractos, ml						1.0 Homogencizado	1.0 Núcleos	1.0 Mitocondrias	1.0 Microsomas	1.0 Sobrenadante
C) PCA 1 N	1.0	0.9	0.8	0.6	0.2					
D) Reactivo de difenil-amina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

RENDINA. Tabla que nos muestra los parámetros de medición para la curva patrón del ADN.
Desoxirribosa con Difenil Amina. Práctica 7.2.D.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Evidenciar la presencia de ADN de manera indirecta, mediante la identificación de fósforo, valiéndose de un método llamado curva patrón y una técnica colorimétrica.

IMPORTANCIA.



La concentración de ADN puede medirse por gravimetría o liberando su fósforo en forma inorgánica y midiéndolo por espectrofotometría.

Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar fosfatos en diversas muestras de ácidos nucleicos.

¡NOTA IMPORTANTE!



Hay que poner suma atención en la preparación previa de reactivos, de los tubos problema, del patrón y del blanco.

En el caso de la muestra de ADN se debe de tomar en cuenta que para su cuantificación esté libre de impurezas, incluyendo el agua.

7.2.E.- TÉCNICA DE FISKE Y SUBARROW - CURVA PATRÓN DE FÓSFORO EN ADN

MÉTODO- TÉCNICA



Preparar las siguientes soluciones:

Disolución Patrón. Fosfato disódico en agua 100 Mg / ml.

Molibdato de amonio al 5% en H₂ SO₄ 2 M.

Mezcla reductora. 0.1g de 1 - amino - 2 - naftol - sulfónico + 6 g de metabisulfito de sodio + 0.6 g de sulfito de sodio anhidro, todo en 50ml de agua.

I.-Preparación de los tubos:

Nº1, Tubo Blanco

Nº 2, 3,4 Tubos Patrones = 25 µl, 50 µl y 100 µl de disolución de fosfatos

Nº 5, 6 Tubos Problemas = 10µl y 100µl de disolución de ADN

II.- Añadir a cada tubo:

1.2 ml de ácido perclórico al 70% + 2 gotas de disolución de molibdeno y completar con agua hasta 2 ml.

III.- Calentar los tubos tapados (≈ 2 hrs.) con bolas de vidrio, en una estufa a 195°C – 200°C, hasta que los tubos 5 y 6 sean incoloros.

IV.- Enfriar los tubos y agregarles:

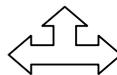
0.4 ml de disolución de molibdato

0.4 ml de la mezcla reductora, agitar y completar con agua hasta 10 ml.

V.- Colocar 10' min en baño María, enfriar y leer en un espectrofotómetro a 830 nm.

VI.- Construir una curva patrón con los tubos 2,3 y 4 e interpretar por interpolación los tubos problema 5 y 6, siguiendo el paso VII de "Extracción de ADN Animal"

FUNDAMENTO



La concentración de ADN puede medirse por un espectro en un rango de luz UV, siguiendo paso a paso la reacción. Tomando en cuenta que ésta molécula posee fosfatos (fósforo), bien se puede medir su reacción y sus productos de reacción que absorben la luz a 830nm. Esto se realiza liberando al mismo fósforo en forma inorgánica y cuantificándolo en base a su concentración.

Por otro lado, la concentración de ADN puede medirse por gravimetría, esto es, secando y pesando la misma muestra.

APLICACIÓN.



Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ADN desconocidos, por ende se utilizan muy bien en todos los niveles e investigación, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se realice como una práctica meramente cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 2004.

INTRODUCCIÓN



Todos los ADN genómicos de procariontes y muchos ADN virales son moléculas circulares. Las moléculas de DNA circulares también se encuentran en las mitocondrias, en los cloroplastos y en algunos eucariontes unicelulares.

En un ADN circular, cada una de las 2 cadenas de la molécula, regularmente forman una estructura cerrada sin extremos libres. Al igual que el ADN lineal, tanto las temperaturas altas y el pH alcalino destruyen los enlaces de hidrogeno y otras interacciones moleculares que estabilizan la molécula. Sin embargo, a diferencia del ADN lineal, las 2 hebras del ADN circular no se pueden desenrollar y separar; los intentos por fundir los 2 ADN producen una masa entrecerrada y un ovillo de ADN monocatenario.

Solo en caso de que el ADN silvestre presenta una de sus hebras cortadas, es entonces cuando las 2 moléculas se desnaturalizan, esto es, se desarrollan y se separan; en este caso uno de las 2 tiras separadas toma la forma circular y la otra una forma lineal. La muesca (abertura) aparece durante la replicación de ADN.

Los genetistas modernos se han valido de mapas genéticos de los plásmidos para identificar la serie de regiones que se establecen en una escala de kilobases, para indicar la distancia a partir de un sitio en el que la enzima rompe la molécula circular. De esta forma se marca un gen específico. Sea en una cepa silvestre o una mutante. Para que se de dicho intercambio de genes, se puede llevar a cabo por la infección directa de bacteria a bacteria a traves de los pillis. Y los sitios donde se insertaran los nuevos genes se les denominarán rI, rII, y rIII. Al nuevo segmento de ADN que codificará para una o varias moléculas de ARN o proteína se le conoce como gene o cistron (compuesto por el intron y el exon), mientras que los genes desconocidos se marcan entre paréntesis.

PIE DE FOTO.



Ilustración que nos muestra como se obtiene un plásmido. (1)

7.3.- ADN - CIRCULAR

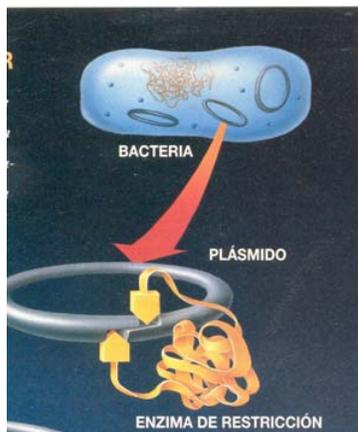
CITA TEXTUAL



Mediante las más revolucionarias técnicas de ADN recombinante, los investigadores son capaces de reprogramar bacterias, levaduras y células de mamíferos, insectos y vegetales para que fabriquen a gran escala proteínas escasas o difíciles de extraer del organismo humano, y además con una pureza prácticamente absoluta.

Otras aplicaciones de la ingeniería genética se pueden encontrar en la depuración de aguas residuales, utilizando bacterias manipuladas que degradan las basuras de forma eficaz; en la limpieza de los mares afectados por la marea negra, con bacterias que comen petróleo; y en el sector agrícola, con la inyección de genes en las plantas para hacerlas más resistentes a las sequías, a las heladas, los insectos y los herbicidas. (2)

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Qué es un plásmido?
- 2).- ¿Qué es un bacteriófago?
- 3).- ¿Cuáles son los reactivos principales para obtener ADN de fruta?
- 4).- ¿Cuál es la importancia del ensayo de la pureza?
- 5).- ¿Qué azúcar se identifica en el ADN?
- 6).- ¿Qué es un cistron?

COMENTARIOS



Para los genetistas modernos, aislar una pieza de ADN y su inserción en otro organismo llámese bacteria o levadura con el propósito de que éste se exprese, ya es realizable en los tiempos modernos. Para este procedimiento, se marca una secuencia de genes deseados, se cortan hasta obtener varios fragmentos con enzimas de restricción y se pegan con las **ligasas** (otras enzimas), en el lugar elegido; ya que cada una de estas "tijeras" moleculares puede identificar una secuencia concreta de genes, entre miles.

Ahora, para introducir esta secuencia en una bacteria o levadura, el genetista necesita un **vector**, o sea una molécula "correo" capaz de atravesar la membrana celular y depositar allí el gen deseado.

Esta operación es llevada por **plásmidos** (moléculas de ADN con forma de anillo), junto a los derivados del **bacteriófago λ** lambda (virus que solo ataca a las bacterias *Escherichia coli*), constituyen los vectores más apropiados para incorporar nuevos órdenes a microorganismos unicelulares.

FUENTES.



- 1).- CHISLEANSCHI Rodolfo, Para qué servirá el mapa del ser humano, Proyecto Genoma, Muy Interesante Biotecnología, Año2, N° 10, 15 de Mayo de 1987.
- 2).- LODISH Harvey, Biología Celular y Molecular, 4ª/e^d, Argentina, Panamericana, 2003.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener ADN de una muestra de levaduras o bacterias a partir de una técnica semicuantitativa para su conservación y uso posterior.



IMPORTANCIA.

La importancia de ésta práctica radica en que se puede realizar dentro de un laboratorio muy elemental.

La acción de las sales facilitará el rompimiento de los tejidos celulares y otro tanto quedarán expuestos a la acción del detergente.

El producto que se obtiene es ADN puro ya que la velocidad de centrifugación es muy específica y se hace varias veces con la finalidad de purificar la muestra.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuando se utilicen levaduras, se deberán someter a molido intenso durante 10' min, empleando un mortero y un pistilo fríos, 2 volúmenes de arena de mar tratados en ácido; añadiendo solución salina con EDTA y agitando en dodecilsulfato de sodio.

Cerciorarse previamente de que tanto reactivos como materiales estén bien limpios y secos.

Cuide de que las muestras de ADN y ARN no se contaminen, trabaje con guantes de Látex.

El alcohol isoamílico se debe conseguir previamente en una farmacia especializada en preparado de reactivos o en una droguería.

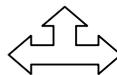
7.3.A.- AISLAMIENTO DE ADN DE LEVADURAS Y DE BACTERIAS

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Tomar de 2-3g de bacterias *Escherichia coli* (centrifugados previamente) ó 0.5 g de *Micobacterium Lysodeikticus* liofilizado, añadir 30ml de NaCl 0.15 M / EDTA 0.1M amortiguado para un pH = 8. Agitar en 2ml de dodecilsulfato de sodio al 25%.
- II.- Pasar la suspensión de células destruidas a un matraz Erlen Meyer de 250ml y calentar a baño María a 60°C / 10' min; y dejar enfriar.
- III.- Añadir 5ml de NaClO₄ 6 M, agitar durante 15' min. En un frasco de vidrio agregar un mismo volumen de una mezcla de cloroformo / alcohol isoamílico 24:1, la emulsión resultante se centrifuga a 5 000 rpm / 3' min.
- IV.- Con cuidado sacar la fase superior (acuosa), sin tocar el precipitado de la interfase, de ser necesario volver a centrifugar en agua hasta obtener una capa clara.
- V.- Tomar un matraz de 125ml y agregar la mezcla con 70 ml de alcohol etílico, cuidadosamente y mezclar suavemente con un agitador, tomar las fibras con un movimiento de rotación.
- VI.- Una vez obtenida la muestra disolver en 0.5ml de dodecilsulfato de sodio al 25% + 2ml de NaClO₄ 6 M + 10 - 15 ml de una mezcla de cloroformo / alcohol isoamílico 24 :1. Repetir varias veces la maniobra centrifugando y recuperando la fase superior. En cada ocasión se enrolla el ADN sobre un agitador de vidrio.
- VII.- Después añadir varios volúmenes de alcohol etílico para eliminar el exceso de solvente y disolver en 2ml de agua que contenga 0.2ml de amortiguador salino con EDTA y mandar a congelación ésta solución para estudios posteriores.

FUNDAMENTO



A parte de los cambios químicos antes mencionados en los aislamientos de ADN animal y vegetal, es importante resaltar que el pH, la velocidad de centrifugación, y el tiempo son determinantes para la obtención de los organelos y biomoléculas que se desean extraer, rompiendo y capturando a través de trampas químicas y físicas.

APLICACIÓN.



Dada la preescisión del trabajo en ésta práctica, solo se recomendable para los niveles superior y en los niveles de postgrado.

CLASIFICACIÓN.

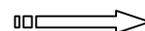
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

INTRODUCCIÓN



La palabra **GEN** deriva del Griego génesis que significa “**Dar nacimiento a**”.

Se conoce que desde hace varios milenios, los factores de la herencia se transmiten de padres a hijos, de semejantes a semejantes, entre las distintas especies vivas que existen sobre la faz de la tierra. Ya nuestros antepasados, de forma empírica, manipulaban los genes mediante injertos entre plantas o cruza entre animales, obviamente con el fin de mejorarlos. Como dice el premio Nobel de medicina Renato Dulbecco, “la genética nació en las eras, en los establos y en las fincas de frutales mucho antes que en los laboratorios de los científicos”.

Cada gen esta constituido regularmente de 1200- 1500 pares de bases, cada ser humano contiene aproximadamente 30 mil genes (aunque algunas fuentes afirman que son 100mil) en 1500 millones de pares de bases, compartiendo con su pariente más cercano, el chimpancé, hasta un 98. 4% de **parentesco genómico**.

Hoy en día se sabe que en la secuencia del genoma humano se han encontrado alrededor de 200 genes provenientes de microorganismos que seguramente fueron adquiridos por transferencia horizontal (de una especie a otra).

Así la transferencia genética puede saltar la barrera intra especie y sexual, de manera que cualquier gen de cualquier origen puede ser introducido en otra especie nueva.

En la actualidad diferentes compañías internacionales y privadas se han dado a la tarea de descifrar el código genético bajo 2 vertientes distintas, la primera como una búsqueda exhaustiva y exclusiva de los llamados **genes mórbidos** (aquellos que causan enfermedades genéticas muy específicas) y la segunda como una búsqueda total de todos y cada uno de los genes que tengan alguna función en el ser humano, con el convenio de intercambiar dicha información vía internet.

PIE DE FOTO.



Imagen Virtual que nos muestra un proceso de clonación ficticio, no muy alejado de la realidad. (1)

7.4.- ADN - LOS GENES

CITA TEXTUAL



Las huellas génicas han supuesto una autentica revolución en lo que los especialistas conocen como criminalística biológica, es decir, el análisis de los vestigios exclusivamente biológicos - manchas de esperma, sangre, pelo, saliva - dejado por el sujeto que ha cometido un delito y que permiten reconocerle.

La fiabilidad de la prueba de Jeffreys se basa en que ningún ser humano es idéntico a otro, ni siquiera 2 hermanos gemelos. Nuestro cuerpo esta formado por 50 billones de células, cada una de las cuales - a excepción de los glóbulos rojos - contienen un juego cromosómico: 23 heredados del padre y 23 heredados de la madre. Aunque la mayor parte del genoma humano presenta mínimas variaciones de una persona a otra, Jeffreys descubrió la existencia de unas regiones extremadamente dispares repartidas a lo largo de los cromosomas. Nos referimos a los llamados minisatélites y microsátélites, cortas secuencias de bases - los famosos peldaños de la escalera en espiral - que se repiten una y otra vez, de manera aleatoria, entre la población, lo que permite diferenciar el material hereditario de diferentes individuos.
(2)

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuántos pares de bases tiene un gen humano?
- 2).- ¿Cuántos genes tiene un ser humano?
- 3).- ¿Cuál es el fundamento de la técnica de Fiske- Subarrow?

COMENTARIOS



Entender la biología humana como una cantidad de datos requiere de un extraño tipo de ciencia nueva y casi **metahumana**. Los genes de organismos superiores son particularmente complejos, pues sus mensajes químicos tienen enigmáticas cadenas de letras sin sentido que deben empalmarse antes de que los genes puedan realizar su trabajo y que aún no han sido entendidas del todo.

Las propiedades más importantes de l material genético son:

La capacidad de almacenar una gran cantidad de información.

La capacidad de transmitir esa información a las células hijas con un mínimo de errores.

Controlar la estructura y sus características **metabólicas** de la célula.

Dar una estabilidad fisicoquímica para que la información no se pierda. La capacidad para los cambios genéticos sin que haya pérdida importante de la información progenitora.

Joyce apoya la siguiente definición. Dice, la vida es un sistema químico capaz de sostenerse a si mismo y que además es susceptible de experimentar la evolución Darwiniana como se menciona.

1º.-Un grupo de individuos debe poder reproducirse haciendo copias de si mismo.

2º.-las copias deben tener imperfecciones o mutaciones heredables que introduzcan variaciones en una población.

3º.-Debe existir un sistema de selección natural que favorezca la supervivencia de algunos individuos sobre otros.

FUENTES.



1).-GUISADO Victor,Es posible la Inmortalidad, El misterio de la Vida, Muy Interesante Biotecnología, Año, N° 27, 15 de Mayo de 1987.

2).- Documento Huella Génica, Llevamos pegado un código de barras en cada célula del cuerpo, Muy Interesante Biotecnología, Año, N° 27, 15 de Mayo de 1987.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Separar fragmentos de genómicos valiéndose de las enzimas de restricción y sus condiciones específicas.

IMPORTANCIA.



Las enzimas se adquieren con los siguientes fabricantes: Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs y United States Biochemicals. El catálogo del fabricante refiere un rango de concentraciones salinas para el buffer adecuado; de concentraciones bajas 10X, medias 10X y altas 10X, y buffers para digestiones pequeñas.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se deberán evitar los siguientes casos:

No use más de 10 unidades / μg de ADN.

La concentración óptima para un plásmido deberá ser $\approx 0.1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$.

Las concentraciones de ADN genómico se deben reducir para obtener una mejor digestión.

La estabilidad para la digestión deberá ser > 1

Se deberá usar una doble digestión cuando el mismo Buffer se recomienda para la misma enzima o en su defecto, cuando una enzima tiene actividad considerable en otro buffer.

7.4.A.- DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

MÉTODO- TÉCNICA



Almacenamiento de las enzimas de restricción.

Concentración de glicerol $\leq 5\%$, la mayoría de las enzimas son almacenadas en glicerol al 50% a 20° C, por ende las enzimas deberán contenerse $\leq 10\%$ del volumen de reacción.

Preparar la siguiente reacción para la digestión enzimática en el orden preciso y en un tubo para microcentrifuga.

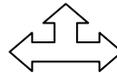
I.- Agua estéril cantidad suficiente + Buffer para el ensayo 10x = 1/ 10 volumen + ADN "X" μl + Enzima de restricción "Y" μl (1 – 10 unidades / μl de ADN). El volumen de reacción dependerá del tamaño y la cantidad de ADN que se va a digerir, os volúmenes grandes oscilan entre 50 – 100 μl .

II.- Mezclar suavemente por pipeteo e incubar su reacción de 1°- 3°hrs a 37°C (consultar el catálogo según sea la enzima comercial).

III.- Inactivar la(s) enzima(s) calentando de 70° - 100° C por 10' o usando fenol (determinar el grado de temperatura según la naturaleza de la enzima y la referencia del catálogo de fabricación de la enzima). Dar el tiempo necesario para que la(s) enzima(s) actúe(n).

IV.- Antes de usar una desfosforilasa o ligasas, debe usar una alícuota de solución de digestión para electroforesis en gel de azarosa contra una muestra de ADN no digerido y un marcador de tamaño, de ser necesario. Si lo desea puede usar más de una enzima siempre y cuando éstas sean activas para el mismo Buffer.

FUNDAMENTO



Existen algunas tablas en donde se clasifican los cortes específicos (sitios de reconocimiento y los extremos generados), en donde actúan las enzimas de restricción, aunque reconocen la misma secuencia de ADN, no necesariamente cortan el ADN en el mismo punto, a éstos puntos de corte específico se les llama isosquisomeros.

La unidad de endonucleasa de restricción es la cantidad de enzima requerida para digerir 1 μg de sustrato lineal de ADN en 60' min. con la temperatura y buffers adecuados.

APLICACIÓN.



Desafortunadamente ésta práctica cuenta con condiciones de equipo y de reactivos muy específicos, por ende solo se recomienda para los procesos de investigación, química legal y nivel superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- GARCIA Fajardo Luz verónica, Tesis DNA Recombinante: Guía didáctica para Q.F.B., FESC – UNAM, 2003.

2.- Training Center Workshop, Recombinant DNA Techniques life Technologies, Producer of GIBCO BR2 Products, Manual proporcionado por el Dr. en Ciencias William Fawcett Timothy.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Separar fragmentos de un gen de ADN valiéndose de la técnica de electroforesis en gel con los reactivos y condiciones específicos.



IMPORTANCIA.

La agarosa deberá ser de grado Tecnológico (N° 800669) ó gel a baja temperatura (N° 800259), marca Schwarz/ Mann Biotech.

La agarosa es un producto y es un polímero lineal de D-galactosa con un puente a 3,6 anhidro L – galactosa y existen algunas variedades útiles como:

Agarosa ultrapura, mayor al 99.5% pura; buena para la mayoría de las aplicaciones.

Agarosa LMP, de bajo punto de fusión, útil para el aislamiento de ADN de geles.

Agarosa Nu Sive (FMC), mucho más soluble que la agarosa convencional.

Agarosa Low EEO para electroendosmosis.

El porcentaje de agarosa en gel puede variar. Por lo general, los geles se preparan al 7%, en casos donde se requiere fraccionar moléculas de ADN menores a 1kb se utilizan geles de agarosa al 1%, 1.5% ó 2%; que en mucho dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN esperados.

¡NOTA IMPORTANTE!



En el paso número V, al efectuarse la electroforesis, enfríe el gel con un ventilador. Sea muy preciso y cuidadoso al trabajar con los reactivos y las condiciones de trabajo.

7.4.B.- SEPARACIÓN DE ADN POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Disolver la agarosa seca en un Buffer apropiado, calentar en un microondas (de 2' – 4' min.), en un matraz Erlen Meyer de 500ml y preparar según la formulación siguiente:

AGAROSA al 0.7%. - Agarosa 1.05g + TAE 20X 7.5ml + Agua 142.5 ml + EtBr (5mg / ml) 25 µl con un volumen total de 150ml.

AGAROSA al 1.0%. - Agarosa 1.5g + TAE 20X 7.5ml + Agua 142.5 ml + EtBr (5mg / ml) 25 µl con un volumen total de 150ml.

AGAROSA al 2.0%. - Agarosa 3.0g + TAE 20X 7.5ml + Agua 142.5 ml + EtBr (5mg / ml) 25 µl con un volumen total de 150ml.

II.- Añadir TAE 20X + Bromuro de Etidio, agite para mezclar y vaciar el gel en un molde. El molde se puede hacer pegando cinta adhesiva transparente en los bordes de una placa de vidrio transparente de 18 x 10cm, la cual tiene una especie de “peines” en ambos lados de la placa como se muestra en la figura*. Dejar solidificar de 20' – 30' min.

III.- Remover cuidadosamente la cinta y los “peines”, colocar el gel en una cámara, en una cama de electroforesis horizontal. Añadir Buffer suficiente para electroforesis TAE 1X al reservorio hasta que se cubra el gel de agarosa.

IV.- A cada muestra de ADN añadir al menos 1/10 de volumen de colorante para gel de agarosa 10X, mezclar y cargar en los pozos.

V.- Iniciar la electroforesis a 150 – 200 mA hasta lograr la separación (entre 30' – 60' min.) para geles de agarosa. (a temperatura baja se utilizan de 100 –200 mA).

VI.- Visualizar los fragmentos de ADN con una lámpara de luz UV de onda larga y fotografiar con una cámara “Polaroid”. *Corrobore el montaje correcto de la cámara de gel de electroforesis en la imagen posterior.

FUNDAMENTO



Los fragmentos de ADN corren con gran facilidad en un gel de electroforesis si se aplica un poco de corriente eléctrica y se hacen evidentes a la luz UV de onda larga, cuando éstos fragmentos se compleja con sustancias como el bromuro de etidio.

APLICACIÓN.



Desafortunadamente ésta práctica cuenta con condiciones de equipo y de reactivos muy específicos, por ende solo se recomienda para los procesos de investigación, química legal y nivel superior.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- GARCIA Fajardo Luz verónica, Tesis DNA Recombinante: Guía didáctica para Q.F.B., FESC – UNAM, 2003.

2.- Training Center Workshop, Recombinant DNA Techniques life Technologies, Producer of GIBCO BR2 Products, Manual proporcionado por el Dr. en Ciencias William Fawcett Timothy.

ESQUEMA 7 D

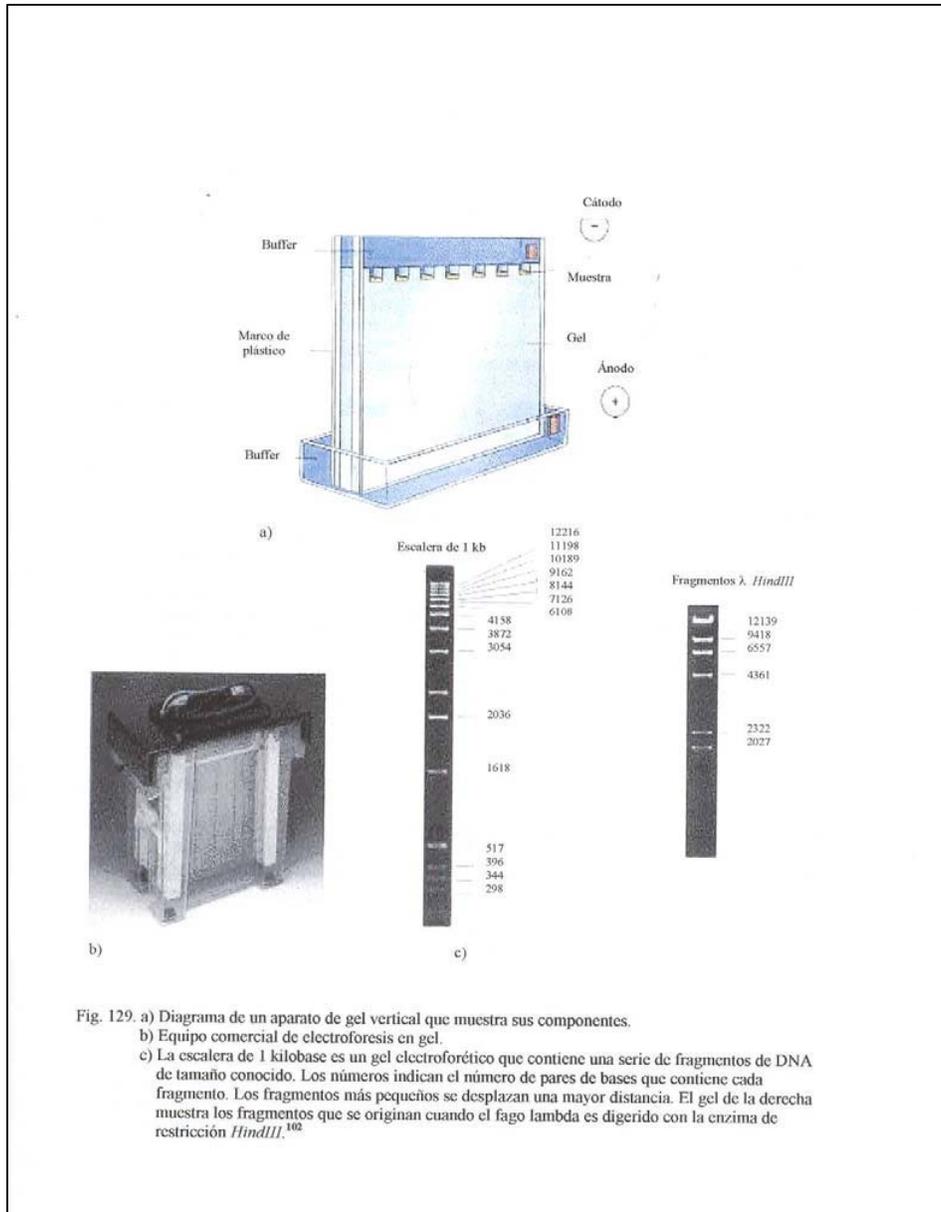
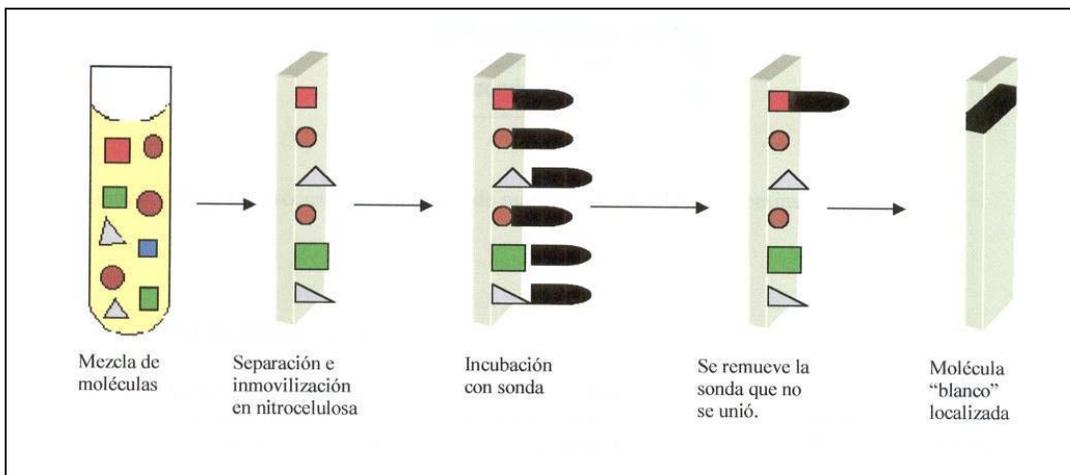
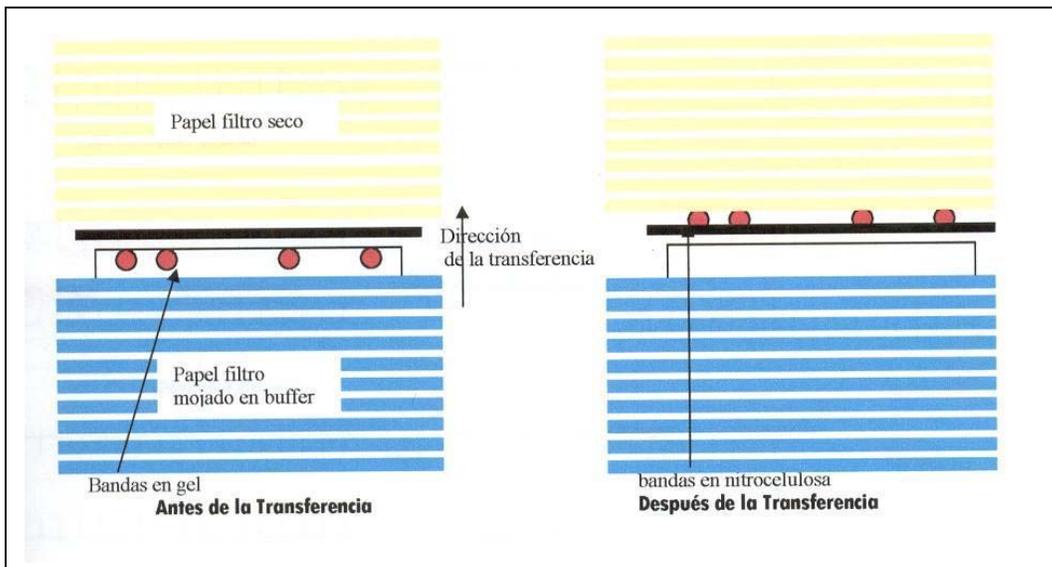
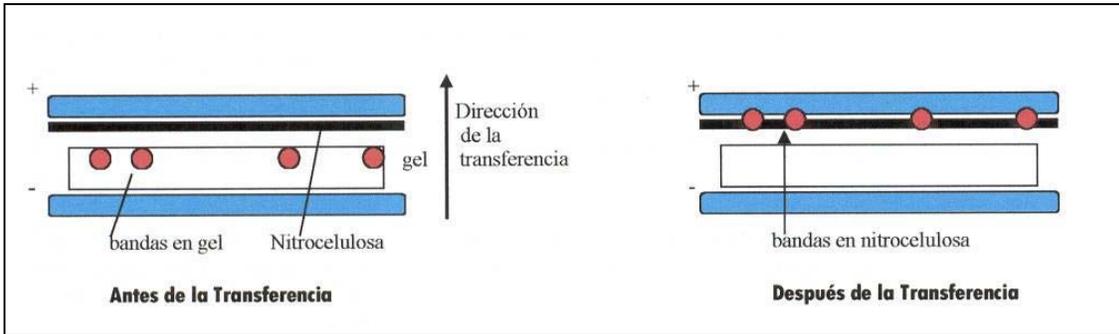


Fig. 129. a) Diagrama de un aparato de gel vertical que muestra sus componentes.
 b) Equipo comercial de electroforesis en gel.
 c) La escalera de 1 kilobase es un gel electroforético que contiene una serie de fragmentos de DNA de tamaño conocido. Los números indican el número de pares de bases que contiene cada fragmento. Los fragmentos más pequeños se desplazan una mayor distancia. El gel de la derecha muestra los fragmentos que se originan cuando el fago lambda es digerido con la enzima de restricción *HindIII*.¹⁰²

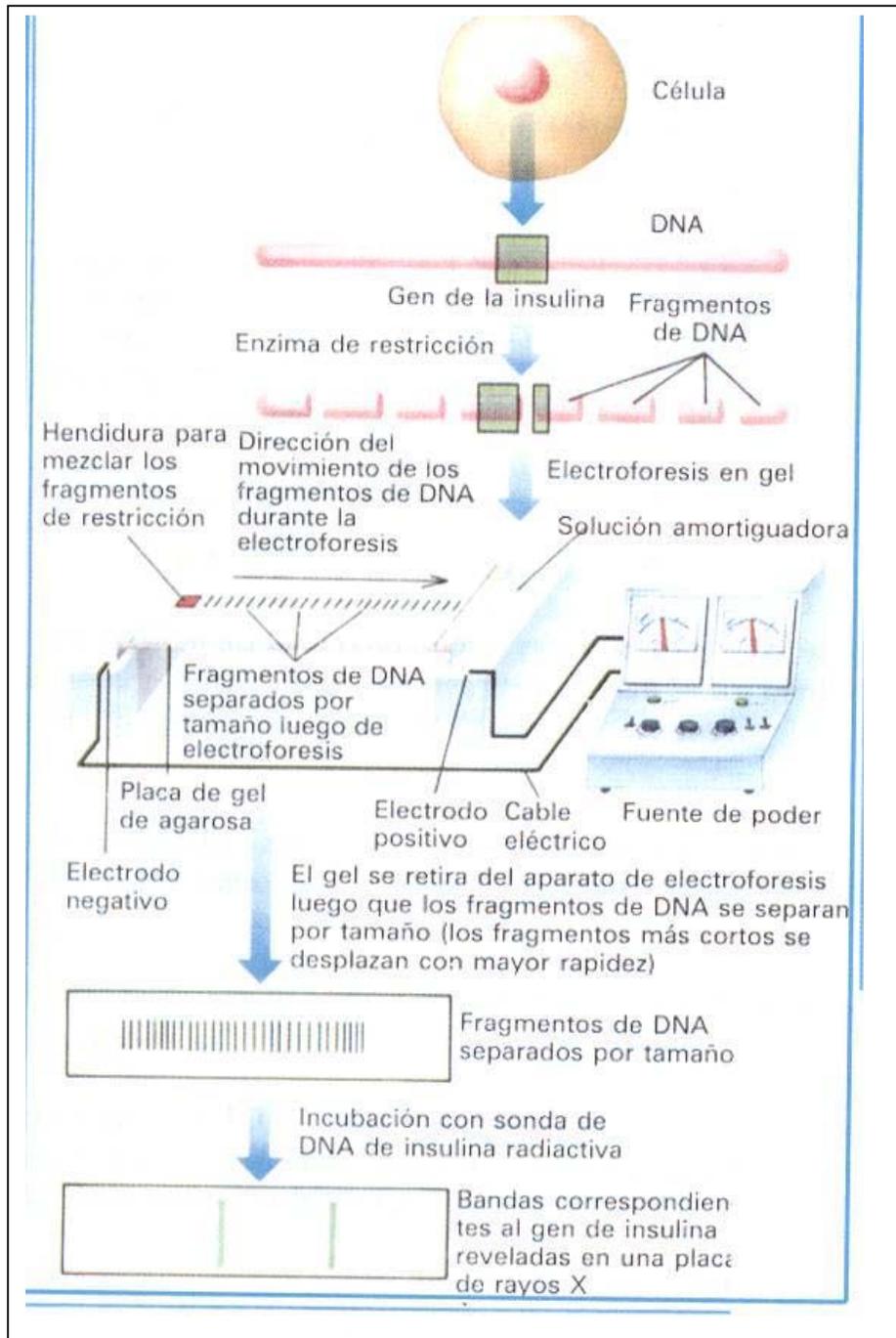
TESIS VERÓNICA. Equipo de electroforesis en gel

ESQUEMA 7 E



TESIS VERÓNICA. Procedimiento de transferencia en gel de agarosa

ESQUEMA 7 F



TESIS VERÓNICA. Obtención de un gen por electroforesis con gel de agarosa

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar la distancia de migración para un fragmento de ADN e interpolar el peso molecular de la gráfica de estándares de ADN.



IMPORTANCIA.

Todas las moléculas de ADN tienen la capacidad de migrar a través de del gel hacia el ánodo durante el proceso de electroforesis, debido a que los fosfatos están cargados negativamente a lo largo del esqueleto de ADN. Durante la electroforesis lineal, el ADN, migra con una orientación extremo a extremo paralela al flujo actual. El índice del flujo actual de migración es afectado por la porosidad como por la resistencia de la misma molécula de ADN al pasar a través del gel.

Todos los productos explotan la adherencia no específica del ADN al vidrio en soluciones, mientras que la agarosa se disuelve fácilmente con el calor y el ADN es recuperado por adherencia en capas de vidrio. El ADN es eluido por en agua o Buffer con bajo contenido de sal.

La carga por el radio de masa es la misma para moléculas de ADN de diferentes longitudes, por ende, el índice de migración estará determinado por el tamaño.

Los índices de migración del ADN lineal dúplex son inversamente proporcionales al logaritmo de sus pesos moleculares, a voltajes bajos. ADN mayores 2kb resuelve óptimamente a menos de V/cm.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante recalcar que las condiciones de pH y elución deberán manejarse adecuadamente para que la práctica salga bien.

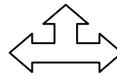
7.4.C.- AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN EN AGAROSA POR ELECTROELUCIÓN

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Retirar la placa de agarosa que contiene la banda de interés, colocarla en un tubo de diálisis, llenarla con Buffer suficiente TAE (pH = 8) : Tris – acetato (40 mM), EDTA 1mM.
- II.- Someter a electroforesis de 2 –3 hrs a V / cm, monitorear con una lámpara de luz UV manual de onda corta.
- III.- Revertir la polaridad de la electroforesis durante 1' min. O agitar la bolsa para disociar el ADN eluido de la pared del tubo.
- IV.- El ADN, posteriormente, se purifica y se concentra por medio de:
Extracción orgánica con etanol
Cromatografía DEAE y precipitación de etanol o de ambas cromatografías y extracción orgánica, y precipitación con etanol.

FUNDAMENTO



Dichas preparaciones de agarosa contienen grupos hidroxietilo que se encuentran en las cadenas de polisacarido y ocasionan que ésta se convierta en gel al os $\approx 30^{\circ} \text{C}$ y funde \approx a los 60°C (que es la temperatura de fusión de la mayoría de los ADNs de doble cadena).

APLICACIÓN.



Estas técnicas, dadas su complejidad son consideradas de grado superior, por ende solo se recomienda que se apliquen en el nivel superior o en investigación.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- GARCIA Fajardo Luz verónica, Tesis DNA Recombinante: Guía didáctica para Q.F.B., FESC – UNAM, 2003.
- 2.- Training Center Workshop, Recombinant DNA Techniques life Technologies, Producer of GIBCO BR2 Products, Manual proporcionado por el Dr. en Ciencias William Fawcett Timothy.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Recuperar el ADN a partir de la técnica de geles de agarosa de bajo punto de fusión



IMPORTANCIA.

Los southern son reacciones de hibridación específicas de los ácidos nucleicos para describir varias técnicas basadas en el principio de complementariedad y permite identificar las macromoléculas de gran interés por ejemplo.

Southern Blot.- El ADN se corta con enzimas de restricción, la sonda utilizada es de ADN radioactivo. El ADN se corta primero con enzimas de restricción y los fragmentos de ADN de doble cadena resultantes tienen una conformación que no necesita pre – tratamiento.

Nothern Blot.- Identifica RNA y utiliza sondas radioactivas de ADN o de ARN, aunque el ARN es de una sola cadena, algunas moléculas tienen pequeñas regiones que pueden formar estructuras 2^{as} basadas en el apareamiento de bases.

Western Blot.- Identifica proteínas. Las sondas radioactivas que se utilizan son enzimas o anticuerpos marcados. Las proteínas se tratan con detergentes Dodesil Sulfato de Sodio (SDS), el cual remueve las estructuras 2^{as} y 3^{as} (ya que no siempre poseen cargas negativas), y además rodea a la proteína de cargas negativas.

¡NOTA IMPORTANTE!



Aunque es posible mejorar el método cuando se trabaja con grandes cantidades de ADN, mayores a 50 µg, o fragmentos largos mayores a 5 kb.

7.4,D.- OBTENCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Verter el gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP), enfríe a 4°C para asegurar su solidificación.

II.- Después de la electroforesis de la muestra, retirar la banda de ADN en agarosa y añadir 5 volúmenes suficientes de tris 20mM + EDTA 1mM (pH = 8. 0) e incubar por 5' min. A 65°C en un tubo cerrado.

III.- Dejar enfriar a temperatura ambiente y extraer con un volumen igual de fenol saturado con Buffer.

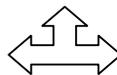
IV.- Remover la fase acuosa, volver a extraer con una mezcla de fenol: cloroformo, después con una de cloroformo y por último precipitar la fase acuosa con etanol.

***Puede que necesite purificar su ADN por cromatografía DEAE para remover las impurezas que bien pueden inhibir a las enzimas.**

La abundancia de ADN afecta el índice de migración, de tal suerte que una concentración de ADN mayor de 500ng por 0.5 cm de lineal, en fragmentos de ADN de una hebra, en un bloque del gel horizontal estándar de 3-5 mm sobrecarga la línea y dará como resultado contaminación y arrastre de ADN de alto pesos molecular; sin embargo la endonucleasa de restricción puede digerir fácilmente de 20 –30 µg de ADN genómico que puede ser cargado fácilmente.

***Checar en las tablas las cantidades de ADN que se pueden recupera.**

FUNDAMENTO



Dichas preparaciones de agarosa contienen grupos hidroxietilo que se encuentran en las cadenas de polisacárido y ocasionan que ésta se convierta en gel al os ≈ 30° C y funde ≈ a los 60° C (que es la temperatura de fusión de la mayoría de los ADNs de doble cadena)

APLICACIÓN.



Aunque ésta técnica es muy utilizada para cualquier tipo de purificación de ADN, son de grado superior dados los fundamentos que se deben manejar, por ende, solo se recomienda que se apliquen en el nivel superior o en investigación.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- GARCIA Fajardo Luz verónica, Tesis DNA Recombinante: Guía didáctica para Q.F.B., FESC – UNAM, 2003.

2.-Traning Center Workshop, Recombinant DNA Techniques life Technologies, Producer of GIBCO BR2 Products, Manual proporcionado por el Dr. en Ciencias William Fawcett Timothy.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Recuperar ADN valiéndose de la técnica de electroforesis Glass Max, BRL y membrana de celulosa DEAE.

IMPORTANCIA.



Esta técnica es muy utilizada actualmente par cualquier tipo de purificación de ADN y además, existe otro dispositivo para ARN. Las cantidades de ADN que pueden recuperarse pueden observarse en la bibliografía citada en la referencia de la técnica.

La segunda técnica es ideal para cantidades pequeñas de doble cadena (ng) de < 15 kb en tamaño.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tenga cuidado de fijarse que el ADN haya migrado antes de remover el papel. Cuide muy bien todas las condiciones de trabajo, recuerde que éste tipo de prácticas son muy selectivas y precisas.

7.4.E.- TÉCNICA Glass Max, BRL y TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN MEMBRANA DE CELULOSA DEAE.

MÉTODO- TÉCNICA



Técnica de adherencia "Glass" (GassMax, BRL)

I.- Disolver la agarosa con calor y recuperar el ADN por adherencia en capas de vidrio o bien, en discos de fibra de vidrio. Eluir el ADN en agua o buffer que contenga bajo contenido de sal

Electroforesis en membrana de celulosa DEAE (Dretzen, et, al., 1981).

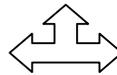
II.- Separar los fragmentos de ADN por electroforesis, teñir con bromuro de etilio, exponer a luz UV. Realizar una capa en la agarosa en frente de la banda de interés.

III.- Cortar un pedazo de papel de celulosa DEAE ligeramente más grande que la apertura e insertar para que la electroforesis siga adelante.

IV.- Remover el papel únicamente cuando el ADN haya migrado sobre el mismo, después lavar con Buffer bajo en sales para remover las impurezas de la agarosa.

IV.- Eluir el ADN con Buffer alto en sales y proceda a purificar por extracción orgánica, y precipite con etanol.

FUNDAMENTO



Estos productos explotan la adherencia no específica del ADN al vidrio en soluciones. En presencia del sodio que actúa como un agente quiotrópico. Durante el proceso de centrifugación de 20''seg., el ADN se enlaza a la membrana con base de sílica en la base del dispositivo. Las impurezas de y el yoduro de sodio residual se remueven por lavado y centrifugado del dispositivo con un buffer de lavado.

APLICACIÓN.



Dados los fundamentos que se necesitan conocer para la realización de ésta práctica, se recomienda que solo se aplique en los niveles de investigación o superiores.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- GARCIA Fajardo Luz verónica, Tesis DNA Recombinante: Guía didáctica para Q.F.B., FESC – UNAM, 2003.

2.-Traning Center Workshop, Recombinant DNA Techniques life Technologies, Producer of GIBCO BR2 Products, Manual proporcionado por el Dr. en Ciencias William Fawcett Timothy.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Llevar a cabo la amplificación de un pequeño segmento de ADN “in vitro” para crear copias de fragmento selecto en grandes cantidades y en un corto tiempo, los cuales servirán para un estudio específico en el área genética o biotecnológica.

IMPORTANCIA.



Esta técnica es una herramienta útil que ha tomado fuerza en las últimas 2 décadas por la gran utilidad que representa para el análisis de las 2 biomoléculas principales ADN y ARN, por ende, su uso en las técnicas de genética molecular; en producción, investigación, mejoramiento y diagnóstico la hacen un ejemplo vital para las nuevas tecnologías de punta.

Esta técnica fue descubierta a partir de una enzima ADN polimerasa Taq, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, ironicamente antes se obtenían copias de ADN a partir de replicación bacteriana en cultivos específicos.

¡NOTA IMPORTANTE!



Se requiere conocimiento del equipo o preparación especial para su manejo y mantenimiento, así como del manejo del las muestras que contengan al ADN.

La acumulación de productos dados por la amplificación repetida con una misma secuencia blanco en PCR sugiere que se deben incluir siempre testigos negativos en cada amplificación, contando también con un área especial y restringida. Previendo algunas contaminaciones también se debe de contar con testigos positivos (dada la presencia de algún contaminante como por ejemplo los aerosoles).

7.4.F.- TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

MÉTODO- TÉCNICA



Equipo y reactivos necesarios para el desarrollo de la técnica.

Generales

- 1 termoreciclador Modelo 24000
- 1 Kit PCR para el desarrollo:
 - Enzima Taq. ADN Polimerasa
 - Buffer DNTPS
 - Mg ++
- 1 Marcador de peso 100HP – Ladder, 250 VG

Reactivos necesarios.

- De 0.05 μ M – 1.0 μ M / 100 μ l de cada oligonucleótido
- De 1 – 2.5 U de la enzima / 100 μ l de la reacción
- De 0.5 – 2.5 mM de MgCl
- dNTP'S de 20 – 200 μ m
- Segmento de ADN muestra de hasta 3000 pb

Temperaturas

- De desnaturalización 92 – 98 °C
- De extensión 70 -74 °C
- De hibridación para la Taq de 55 – 65°C

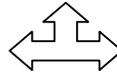
I.- Mezclar una muestra de ADN con los 4 desoxirribonucleótidos y una polimerasa de ADN junto con 2 fragmentos de ADN sintéticos cortos (oligonucleótidos que sirven de amplificadores) complementarios a las secuencias de ADN en sus extremos 3' de la región que se desea amplificar.

II.- La mezcla se calienta de 92 – 98 °C para separar al ADN de las muestras en sus cadenas

III.- Se deja enfriar la muestra para permitir que los iniciadores se enlacen en los extremos 3' de ambas cadenas de ADN específico y a su vez la polimerasa añade nucleótidos a los extremos 3' de los iniciadores. Una vez que la polimerasa alarga los iniciadores, realizando copias selectivas del ADN específico, forma nuevas cadenas complementarias.

IV.- Al elevar nuevamente la temperatura, las cadenas recién formadas se separan. Dejar enfriar nuevamente para permitir que los iniciadores sintéticos se unan a los extremos 3' (ahora el ADN se encuentra en doble proporción a la original). Este ciclo se repite cuantas veces sea necesario, generando miles de millones de copias específicas en unas cuantas horas.

FUNDAMENTO



La Taq ADN - Polimerasa es una enzima que se encarga de efectuar la síntesis de ADN copia partir de una muestra determinada de ADN. El termoreciclador es el lugar donde se lleva a cabo la reacción de complementariedad de bases tomando como patrón un blanco de ADN a condiciones de temperatura, pH, salinidad y reciclaje específicos.

APLICACIÓN.



Es una técnica muy útil en investigación forense, criminalística, genética clínica y biotecnología, ya que se cuenta con los elementos necesarios para la producción de genes y muy bien se puede complementar con otras técnicas más específicas para la identificación de patrones genéticos.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.-CRUZ. Domínguez Dinora, 1998, “Metodología de Investigación Documental y de las prácticas demostrativas de apoyo en la Asignatura del Paquete Terminal de Enzimas De Uso Alimentario”, Tesis I.Q., FESC – UNAM, México.
- 2.- GARCIA Fajardo Luz verónica, Tesis DNA Recombinante: Guía didáctica para Q.F.B., FESC – UNAM, 2003.

CLASIFICACIÓN.

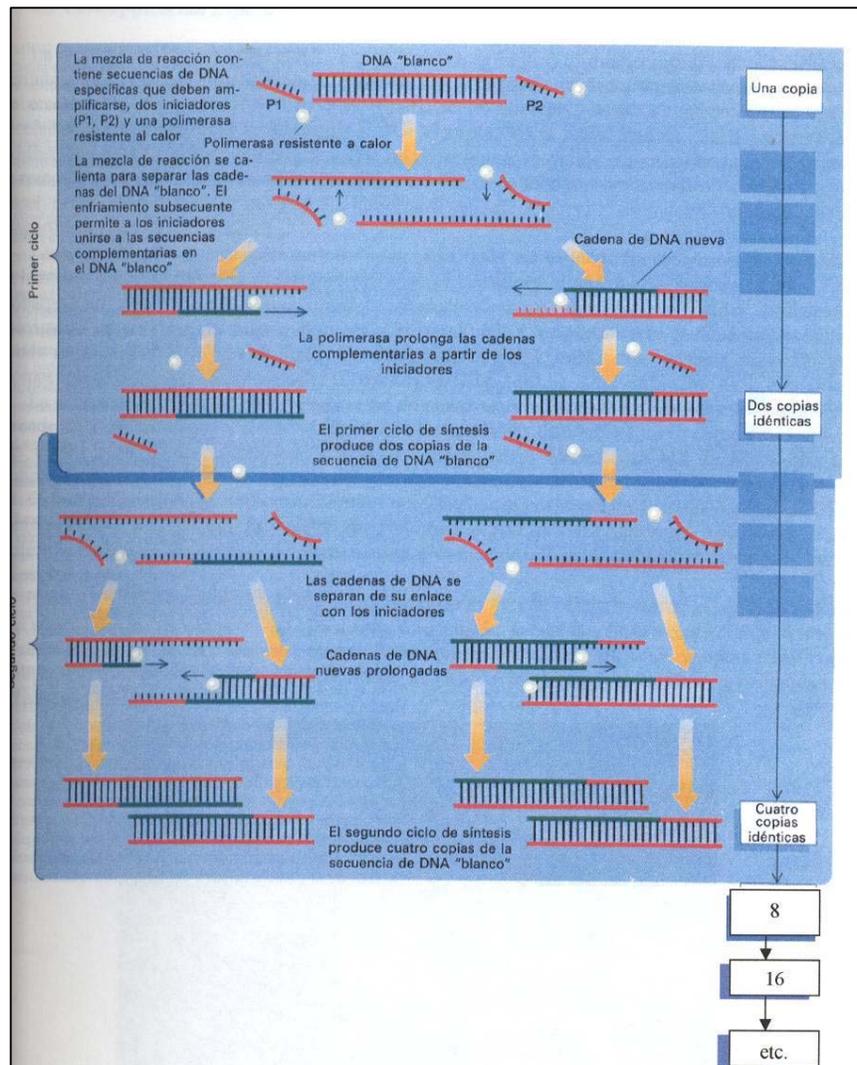
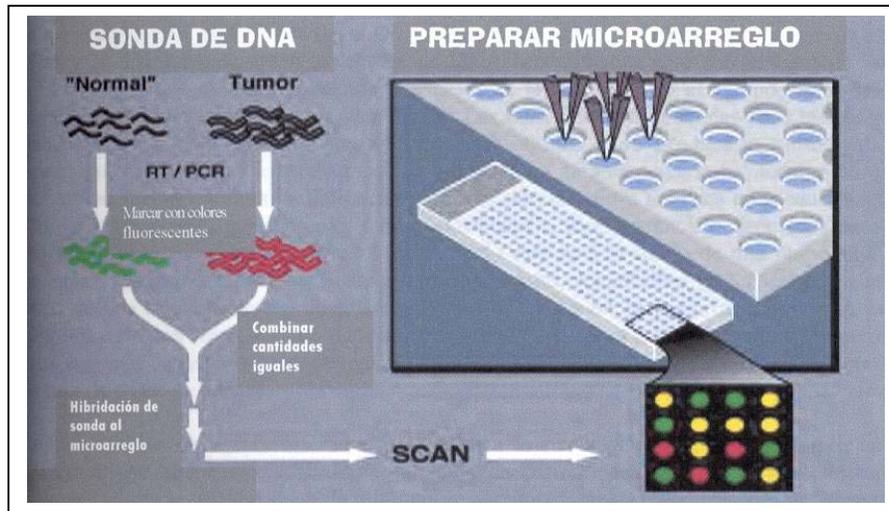
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

ESQUEMA 7 G



TESIS VERONICA. Procedimiento de sondeo y fragmentación en PCR

INTRODUCCIÓN



La palabra cromosoma deriva del Griego **Chroma = Color** y **Soma = Cuerpo**.

La célula como se conoce hoy en día, es la piedra angular de todos los procesos metabólicos que se dan en un organismo superior.

Esencialmente, toda célula tiene 2: periodos en su ciclo, la **interfase** (19 hrs), y la **fase M o mitosis** (50' – 90') en donde la célula crece y no se hay división celular, también se le conoce como fase de reposo. En este periodo la célula se nutre, crece y duplica sus cromosomas.

G1 (5 hrs.), del ingles, gap y se le denomina así por que constituye un intervalo entre una y otra división celular. Es una fase muy activa en donde la célula adquiere sus nutrientes del medio, sintetiza gran cantidad de proteínas y comienza la replicación del ADN en el núcleo celular (el ADN todavía esta como **cromatina**), con el único fin de realizar funciones propias de la célula, además cada cromosoma consta de una sola molécula (cromosomas hijos). **S (8 hrs.)**, en éste proceso se lleva acabo la síntesis y duplicación del ADN, para la misma duplicación celular, a diferencia del G1 que solo se realiza para llevar funciones específicas de la célula, cada cromosoma esta formado por 2 cromátidas (cromosomas duplicados).

G2 (6 hrs.), aquí, en éste proceso es en donde se rectifican los posibles errores que pudiese tener el material genético y se le prepara a la célula para su división celular.

La **división celular** propiamente dicho, consta de 2 casos diferente, **mitosis** para las células somáticas (cualquier célula de un organismo superior) y **meiosis**, para las células germinales (exclusivo para el **ovocito** y **espermatozoide**). El proceso de mitosis se subdivide en las siguientes etapas. *Interfase, Profase, metafase, anafase y telofase*. En la metafase encontramos al ADN como una serie ya organizada de cromosomas que se pueden cuantificar. A diferencia de la **mitosis**, la **meiosis** consta de: Interfase I y II, profase I y II; solo que en al profase I, se aprecian otras sub etapas como: *leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis*; en lo que respecta a las siguientes etapas *metafase I y II, anafase I y II*, y, por último una *telofase I y II*; los procesos se repiten de una manera semejante.

7.5.- ADN – LOS CROMOSOMAS

CITA TEXTUAL



La observación de que las células malignas presentan con frecuencia aneuploidía (alteración en el número de cromosomas) sugirió que estas aberraciones son importantes para el desarrollo de tumores. Además, el hecho de que numerosos carcinógenos (radiaciones, químicos, virus, etc.) causan aberraciones cromosómicas apoya este concepto, pero aún no se ha resuelto si la aneuploidía representa un evento primario o secundario para la transformación maligna. Resulta interesante que individuos con condiciones aneuploides desarrollan neoplasias con mayor frecuencia que la población general como por ejemplo la trisomía 21 (leucemia aguda y tumores sólidos), en el 47, XX^Y (cáncer mamario y leucemia aguda) o en la disgenesia gonadal mixta 45,X / 46,XY (gonadoblastoma). (3)

IMAGEN:



PIE DE FOTO.



Imagen que nos muestra un cariotipo humano con una técnica de tinción fluorescente. (1)

FUENTES.



3).- DRA. KOFMAN. A. Susana, Q.F.B. CERVANTES. P. Alicia, genética y cáncer, Genética / Terapéutica, PAC MG -1, PROGRAMA DE ACTUALIZACIÓN CONTINUA PARA MÉDICOS GENERALES, Parte B, Libro1, 1996.

COMENTARIOS



Los cromosomas son estructuras biológicas bien organizadas que aparecen en las metafases (Mitosis y Meiosis), compuestas por ADN unidas a las proteínas llamadas **histonas** en un complejo aún mayor de empaquetamiento.

La diversidad cromosómica de vegetales animales incluyendo el ser humano se clasifican de acuerdo a la posición del centrómero, la longitud de los brazos superiores p, pequeños y los largos, q; y la longitud total del cromosoma. Para el caso de la clasificación de las células humanas (22 pares y un par sexual), se hace una distribución de los anteriores por grupos, que van de la A – G, muy importante ya que gracias a esta clasificación o Cariotipo se pueden encontrar algunas anomalías genéticas dadas por la ausencia o presencia extra de cromosomas, que van desde uno hasta un juego completo.

Hoy, en día se ha llegado más lejos en el área de la **citogenética**, por ejemplo con las técnicas de hibridación in situ se puede investigar la ubicación de los genes en un cromosoma para detectar mutaciones en las base que nos detecten una sustitución o corrimiento de las mismas. Actualmente, los citogenetistas se valen de los bandeos o tinciones especiales G, R, C y Q que sirven para puntualizar que genes están activos y además resaltan las porciones ricas en las base que se deseen estudiar según sea el tipo de bandedo.

FUENTES.



1).-CHISLEANSCHI Rodolfo, Para qué servirá el mapa del ser humano, Proyecto Genoma, Muy Interesante Biotecnología, Año2, N° 10, 15 de Mayo de 1987.

2).- BARRIGA. A. Sandra y BONILLA. S. Rosalba, TECNICAS BASICAS EN CITOGENETICA (elaboración y análisis de cariotipos), México, UNAM – FESC – C1, 2001.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener sexocromatina a partir de una muestra de cabello (de la pulpa de su raíz), mediante una técnica de coloración para ADN.

IMPORTANCIA.



Es una técnica muy importante que bien se puede aplicar a la química legal, a los estudios citogenéticos y a la misma investigación en biotecnología. Resulta ser una práctica sencilla y rápida, siempre y cuando se cuente con los materiales indispensables.

¡NOTA IMPORTANTE!



Tenga cuidado de no contaminar las muestras con las manos desnudas, use guantes de látex, no ponga las muestras cerca de las enzimas de restricción.

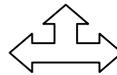
7.5.A.- TÉCNICA PARA OBTENER SEXOCROMATINA DE RAÍZ DE CABELLO

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Cortar el cabello con raíz cubriendo una medida requerida de 2cm de longitud y colocarlo sobre un porta objetos. Cubrirla con una gota de acetocarmin recién filtrada.
- II.- Calentar la laminilla sobre una flama peña a 60°C por 30'' seg.
- III.- Pasar el cabello a otra laminilla y agregar una gota de ácido acético al 50%
- IV.- Observar bajo el microscopio la disección y apreciar los detalles de la raíz, separar la vaina blanda con una aguja de disección. Quitar el resto incluyendo el bulbo que generalmente se rompe y la vaina interna fibrosa que dificulta su observación.
- V.- Secar cuidadosamente el ácido acético con papel higiénico o papel filtro y cubrir cuidadosamente la vaina externa con una gota de acetorceina.
- VI.- Colocar un cubre objetos sin hacer presión y calentar nuevamente a 60°C por 5' min.
- VII.- Quitar el exceso de colorante con el papel filtro, hacer un aplastamiento lavar con ligera presión sobre el cubre objetos y por último sellar la preparación con barniz de uñas transparente o con parafina de Króning, y observar al microscopio óptico compuesto.

FUNDAMENTO



El ADN al tener una estructura helicoidal tridimensional permite que otras estructuras moleculares con hibridación sp^2 planas, se inserten adecuadamente entre los puentes de hidrógeno y las base para realizar una resonancia electrónica, permitiendo de ésta manera que se de un halo de fluorescencia en toda la molécula. Dichos corpúsculo se hace evidente con colorantes nucleares

APLICACIÓN.



Aunque ésta técnica es muy utilizada en investigación citogenética, los fundamentos requeridos son de mediana complejidad, por ende, solo se recomienda que se apliquen en el nivel medio superior, superior o en investigación.

CLASIFICACIÓN.

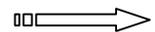
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- SALAMANCA Gómez Fabiol, Citogenética Humana – Fundamentos y aplicaciones clínicas, 2^a/e^d, México, Médico panamericana, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Se detectará la cromatina X, dentro de los núcleos de las células epiteliales mediante una tinción básica.

IMPORTANCIA.



La sexocromatina se encuentra adosada al borde interno de la membrana nuclear y es de gran importancia ya que, se le asocia con el sexo femenino. Corresponde a la condensación de uno de los cromosomas X, en la mujer y se le llegó a conocer como corpúsculo de Barr o sexocromatina; hoy se le conoce como cromatina "X" y es muy importante su determinación ya que en la actualidad, se pueden detectar anomalías genéticas relacionadas con el sexo.

Esta práctica es muy sencilla de realizar, lleva poco tiempo y rara vez falla; además de tener un costo muy bajo.

¡NOTA IMPORTANTE!



Es importante emplear una presión suficientemente firme para obtener células epiteliales profundas, las cuales cuentan con núcleos grandes ya que, las células superficiales tienen núcleos pequeños que no son útiles para esta práctica.

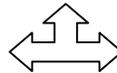
7.5.B.- OBSERVACIÓN DE SEXOCROMATINA EN CÉLULAS EPITELIALES

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Realizar un raspado en la mucosa oral (interior de la mejilla, con ligera fuerza) usando un abatelenguas, estéril.
- II.- Colocar las células barriéndolas en un ángulo de 45°, sobre un portaobjetos limpio.
- III.- Agregar unas gotas de acetorceína y colocar un cubreobjetos encima.
- IV.- Colocar un poco de papel higiénico sobre el portaobjetos y presionar con la goma de un lápiz para quitar el excedente de colorante.
- V.- Observar al microscopio óptico con los objetivos 10x, 40x y luego 100x
- VI.- Detectar 50 células y anotar el número de corpúsculos de Barr identificados.

FUNDAMENTO



La sexocromatina corresponde a un cromosoma X heteropignótico y que replica su ADN más tarde que el resto de los cromosomas. Se define como una partícula heteropignótica planoconvexa de 0.7 – 1.2 micras de diámetro y que se encuentra ubicada en la parte interna de la membrana nuclear. Su frecuencia varía entre el 10 – 98% en mujeres normales y no se encuentra en núcleos de hombres normales. Dicho corpúsculo se hace evidente con colorantes nucleares

APLICACIÓN.



Se adapta bien a los tres niveles, además de que se puede aplicar muy bien en otros campos de la investigación, la criminalística y el área clínica para identificar anomalías cromosómicas.

CLASIFICACIÓN.

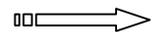
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-Dra. DÍAZ Barriga. A. Sandra y Q.F.B. BONILLA Sánchez Rosalba, Técnicas básicas en citogenética (elaboración y análisis en cariotipos), México, FESC – UNAM, 2001.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Identificar a la cromatina “y” mediante una técnica de fluorescencia con luz UV.

IMPORTANCIA.



Se debe tener cuidado para no confundir al corpúsculo F con algunos polimorfismos cromosómicos, por ejemplo, los de los cromosomas acrocéntricos, los de los centrómeros de algunos cromosomas como el del par 3 que también fluorescen en la interfase.

¡NOTA IMPORTANTE!



¡Importante!, la solución de clormetacrina se debe mantener en refrigeración, en frasco oscuro y cubierto con papel estaño.

7.5. C.- TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE LA CROMATINA “Y”

MÉTODO- TÉCNICA



Preparaciones

Solución amortiguadora de fosfatos – ácido cítrico.-

Sol A. Fosfato disódico 28.4 g + 1 L de agua destilada.

Sol B. Ácido cítrico 21 g + 1 L de agua destilada.

La solución amortiguadora de trabajo se prepara a partir de las anteriores como sigue.

Sol A 110 ml + Sol B 90 ml ; ajustando el pH a 5.3.

Sol de clormetacrina.- Clormetacrina 0.4 g + agua destilada 100ml

I.- Para tomar la muestra de la mucosa oral, se siguen los pasos I y II de la técnica de “observación de sexo cromatina en células epiteliales” 7.5.B.

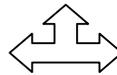
II.- Fijar las preparaciones en metanol - ácido acético 1:1, durante 15’ min. Dejar secar al aire libre.

III.- Pasar las preparaciones suavemente por las solución amortiguadora de trabajo.

IV.- Teñir con la solución de clormetacrina durante 6’ min. Cumplido el tiempo pasar las laminillas por la solución amortiguadora. Montar en la solución amortiguadora, sellar el cubre objetos con barniz transparente para uñas.

V.- Observar las preparaciones con epifluorecencia usando una lámpara de luz UV, utilizar filtros excitadores BG 12 y filtros barrera K 530.

FUNDAMENTO



La cromatina y se aprecia como un corpúsculo intensamente fluorescente, también conocido como corpúsculo F, de aproximadamente 0.25 micras. Su localización se da dentro del núcleo ya sea en la periferia o en el centro. Solo en condiciones normales, del 50 – 60% del total de las células muestran el corpúsculo fluorescente.

APLICACIÓN.



Aunque ésta técnica es muy utilizada en investigación citogenética, los fundamentos requeridos son de mediana complejidad, por ende, solo se recomienda que se apliquen en el nivel medio superior, superior o en investigación.

CLASIFICACIÓN.

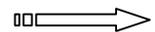
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- SALAMANCA Gómez Fabio, Citogenética Humana – Fundamentos y aplicaciones clínicas, 2ª/e^d, México, Médico panamericana, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener cromosomas humanos a partir de glóbulos blancos (linfocitos TCD4), identificar los cromosomas con un colorante giemsa y armar un cariotipo.



IMPORTANCIA.

Las metafases se definen como el arreglo sistemático de los cromosomas en grupos de pares homólogos de acuerdo a su tamaño y localización del centrómero. Estos arreglos determinan progresivamente el género o el grupo, el orden, la familia, la especie, hasta llegar al individuo. También puede referirse a una célula individual o única.

Es importante recalcar que se pueden contar con otros tejidos para el análisis cromosómico como son: amniocitos, fibroblastos, tejido de médula ósea y por supuesto los procedentes de las vellosidades coriónicas.

¡NOTA IMPORTANTE!



Cuando el material esté muy sucio lave con una mezcla crómica, y hágalo con precaución, ya que ésta produce quemaduras graves. Cuando agregue la mezcla de alcohol / ácido acético, procure que no se formen grumos en la fijación.

7.5.D.- OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS HUMANOS

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Lavar el material, dejándolo remojar de 2°- 12 °hrs, en jabón extrán Merck al 1%; dependiendo de lo sucio que esté.
- II.- Lavar con escobillón, por dentro y por fuera, enjuagar 10 veces al chorro del agua, enjuagar 3 veces en 3 tinas diferentes de agua destilada, dejar escurrir, envolver y esterilizar bien en autoclave o en olla expres. Sacar al siguiente día
- III.-Limpiar la zona de punción venosa con agua, jabón y alcohol; limpiar nuevamente con 3 torundas húmedas. Obtener 3ml de sangre venosa con una jeringa heperinizada 1000 U /ml.
- IV.- Trabajar en una campana de flujo laminar. Tomar 2 frascos para cultivo, estériles y agregar lo siguiente: 8ml de medio de cultivo Ham F- 10 ó McCoy 5 modificado + 0.4ml Fitohepatoglutinina + 10 gotas sangre entera. Mezclar bien e incubar en estufa a 37°C, durante 70 hrs.
- V.- Pasado el tiempo, agregar 1 gotas de colchicina al 0.04 %, mezclar bien y continuar su incubación 2 hrs más.
- VI.- Pasado el tiempo centrifugar las muestras, en el n°3 a 3000 rpm / 10' min; retirar el sobrenadante y agregar 8ml de KCl 0.075 M a 37°C /20' min, e incubar a la misma temperatura.
- VII.- Volver a centrifugar los tubos durante 5' en el número 3 y desechar el sobrenadante. Resuspender el paquete celular con un vórtex; con agitación constante agregar 8ml de solución fijadora metanol o etanol / ácido acético 3:1, recientemente preparado y frío.
- VIII.- Dejar actuar la solución 30' a temperatura ambiente. Repetir el proceso de fijación 3 veces a tiempos de 15' cada uno. Después de la 3ª fijación, centrifugar 5' min. Y dejar un poco de solución fijadora para hacer una suspensión celular adecuada.
- IX.- Resuspender el paquete celular y dejar caer 3 gotas de ésta suspensión con un gotero a una altura ≈ de 2 m (para que los linfocitos se revienten) sobre un portaobjetos limpio y frío, secar al aire libre.
- X.- Sumergir los portaobjetos en un vaso coplin con colorante giemsa en agua destilada 1:10, de 10'- 30' dependiendo de la capacidad de tinción del colorante, enjuagar con agua corriente y dejar secar al aire libre. Observar al microscopio con todos los objetivos, localizar las metafases, anotar sus coordenadas y armar un cariotipo humano a partir de una copia o fotocopia.

FUNDAMENTO



Es importante resaltar que las condiciones de trabajo como son la temperatura, pH y esterilidad en todo momento deben mantenerse. Es indispensable que la fitohepatoglutinina estimule la división mitótica de los linfocitos T CD4, mientras que las soluciones hipotónicas permitan la dispersión de los cromosomas, mientras que el alcohol y el ácido, se encargan de fijar y conservan a los cromosomas lo mejor posible. Por último, el colorante giemsa es el más utilizado para un cariotipo sin bandas; aunque no es el único.

APLICACIÓN.



Cabe mencionar que aparte de las universidades, también se utiliza en estudios citogenéticos como: diagnóstico prenatal, consejo genético, detección de defectos congénitos e inter sexo, hipogonadismo, cariotipo de tumores, aborto habitual, razones médico – legales y por supuesto para investigación.

CLASIFICACIÓN.

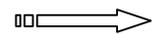
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

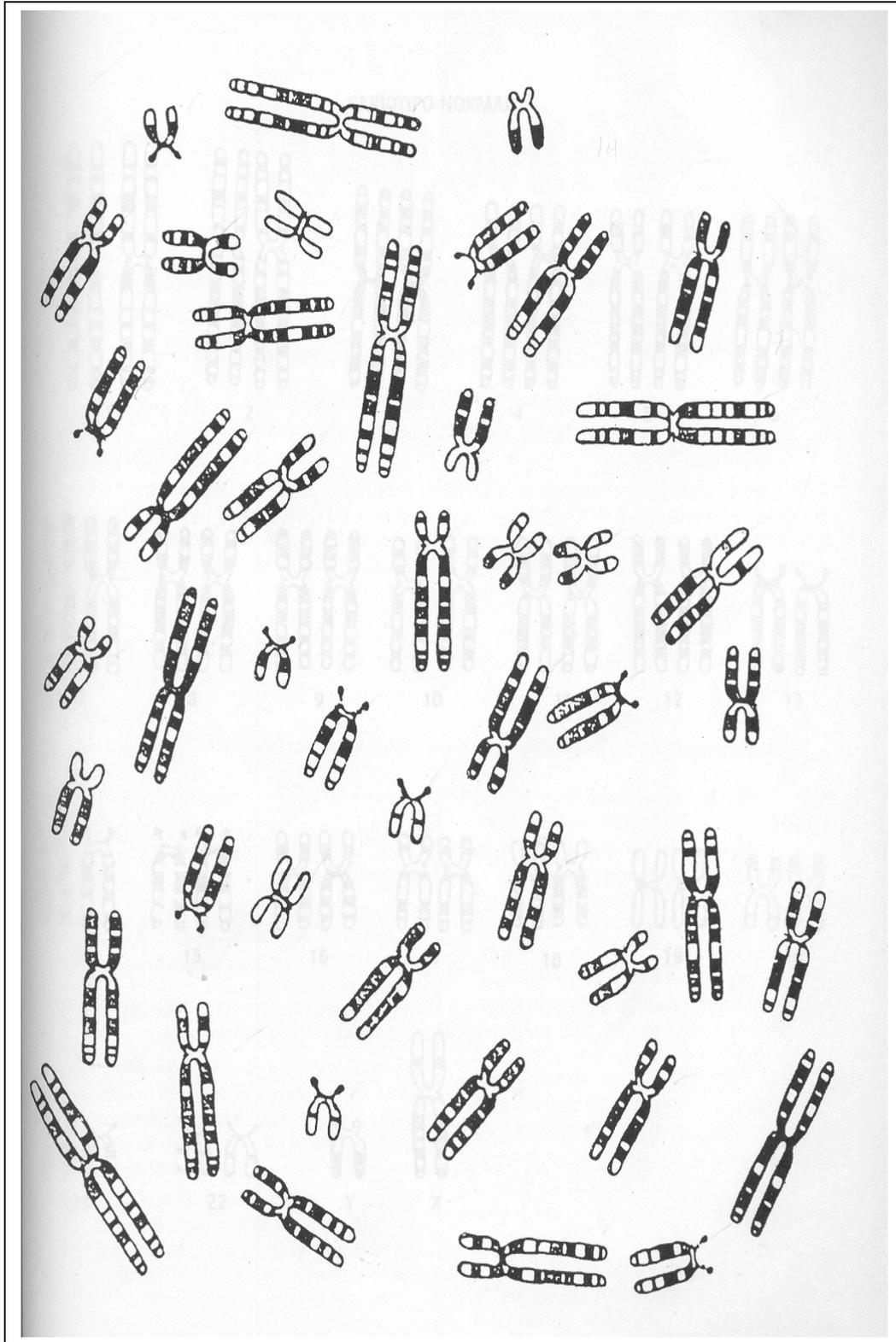
Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



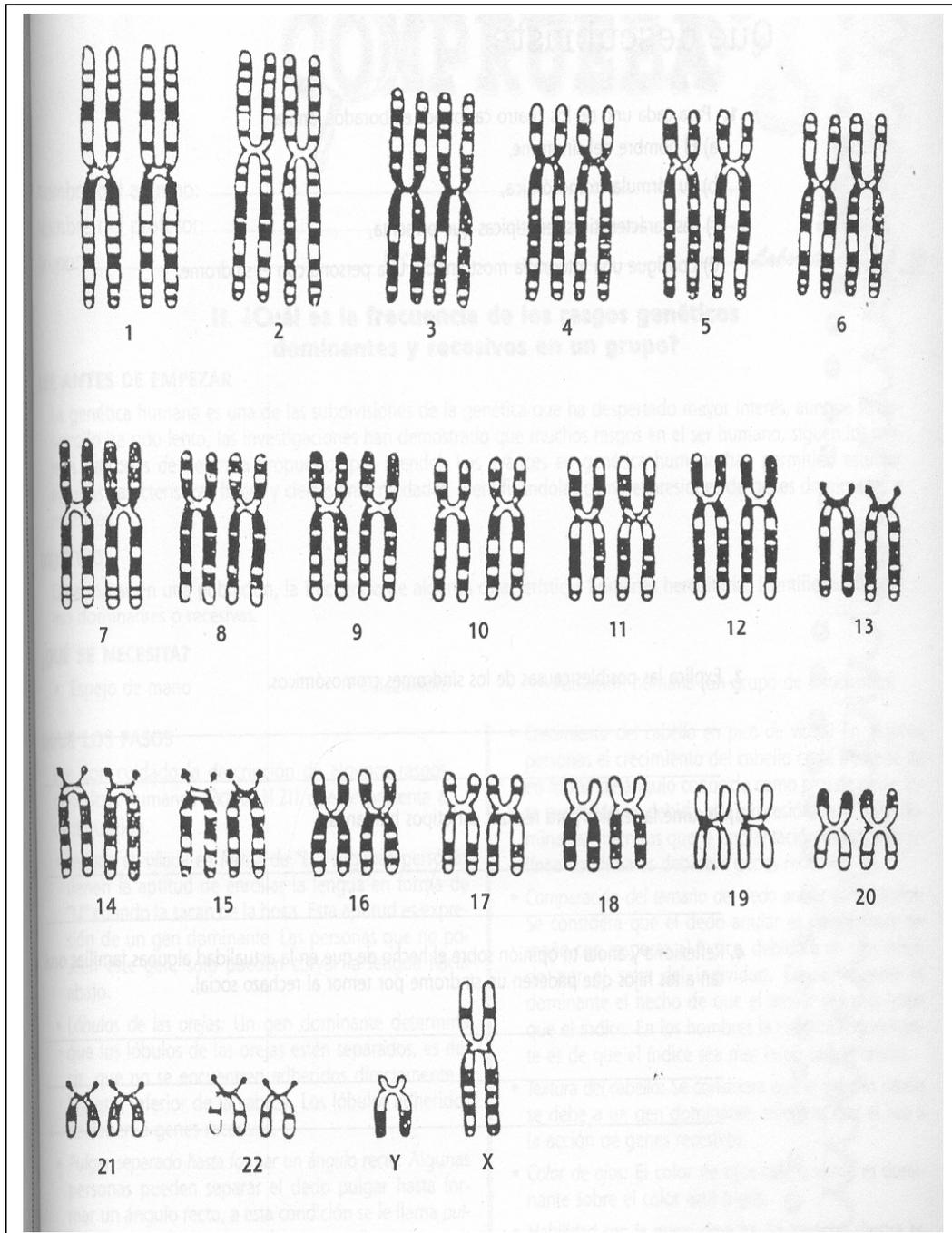
1.-Dra. DÍAZ Barriga. A. Sandra y Q.F.B. BONILLA Sánchez Rosalba, Técnicas básicas en citogenética (elaboración y análisis en cariotipos), México, FESC – UNAM, 2001.

ESQUEMA 7 H CARIOTIPograma HUMANO



SEGURA.

ESQUEMA 7 I CARIOTIPO HUMANO



SEGURA.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Obtener cromosomas de cebolla a partir de una preparación de células de la raíz, e identificar las formas cromosómicas con un colorante para ácidos nucleicos y armar un cariotipo.

IMPORTANCIA.



Resulta ser una práctica muy eficaz dado que, su elaboración es muy práctica y sencilla. Además es muy ilustrativa para el nivel básico.

¡NOTA IMPORTANTE!



Al macerar la raíz, hágalo con una navaja y además cuide de que los tiempos de exposición a los reactivos si se cumplan; desde que se aplica el ácido clorhídrico.

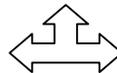
7.5.E.- OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS DE CEBOLLA

MÉTODO- TÉCNICA



- I.- Colocar un poco de agua de la llave a un frasco mediano y enseguida colocarle una cebolla, de tal manera que quede sobre la boquilla, procurar que la zona de las raíces esté tocando el agua.
- II.- Dejar de 5 – 8 días en un lugar seguro hasta que las raíces alcancen una longitud de $\approx 2.5 - 3$ cm de longitud.
- III.- Tomar 2 ml de acetocarmin, colocarlos en un tubo de ensayo y calentar en el mechero de 10" – 20" seg; sin que hierva la solución.
- IV.- Colocar las puntas de las raíces cortadas en el vidrio reloj y agregar 1ml de HCl 1M a 60°C, dejar activar de 10' – 15' min.
- V.- Luego macerar con la punta de una navaja, enseguida agregar unas gotas de acetocarmin y dejar que el colorante penetre las raíces, termine de checar su tiempo hasta que se haya cumplido.
- VI.- Poner un portaobjetos limpio y colocar la raíz con una aguja de disección, disgregarla.
- VII.- Colocar un trozo de papel clínex o higiénico y presionar con la goma de un lápiz hasta extender la raíz, colocar entonces un cobre objetos y observar al microscopio 1° en objetivo 40x y luego en 100x. Seleccionar las mejores metafases y fijar las laminillas con barniz transparente, por los bordes de los cubreobjetos. Localizar las metafases, anotar sus coordenadas y armar un cariotipo a partir de una copia o fotocopia.

FUNDAMENTO



Se denomina cariotipo al conjunto de cromosomas de una célula de una especie biológica determinada (obtenidos de una célula en metafase). Dicho corpúsculos se hacen evidente con colorantes nucleares. El ADN al tener una estructura helicoidal tridimensional permite que otras estructuras moleculares con hibridación sp² planas, se inserten adecuadamente entre los puentes de hidrógeno y las base para realizar una resonancia electrónica, permitiendo de ésta manera que se de un halo de fluorescencia en toda la molécula.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien en los tres niveles, además de que se puede aplicar en otros frutos y vegetales para identificar anomalías cromosómicas y número de los mismos.

CLASIFICACIÓN.

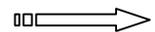
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



- 1.- PONCE. Salazar. R. Margarita, Biología I, Libro de recursos para el profesor, México, Santillana, 1998.
- 2.- CAMPOS G. y DELGADO. N. L. Manual de Bioquímica Celular, FESC-UNAM México, 1993.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Realizar la preparación de reactivos y condiciones para la obtención de cromosomas de *Drosophila melanogaster* y a su vez conocer la forma de preparar permanentemente los cromosomas.

IMPORTANCIA.



Es importante resaltar que la selección de las larvas se da en base al conocimiento del ciclo de la misma mosca.

Una vez realizada la copula se presenta un huevo, a las 22 horas se desarrolla una larva que pasa por 3 estadios, luego pasa a pupa, pasadas 132 horas, a las 287 horas se tienen moscas recién nacidas y a las 299 horas se obtiene moscas adultas (imago) bien definidas y con capacidad reproductiva.

¡NOTA IMPORTANTE!



El ciclo de vida de una *Drosophila melanogaster* dura entre 12 y 15 días a 20° C; pero si se varía la temperatura a 25° C, el ciclo puede reducirse a 10 días.

7.5.F- PREPARACIÓN DE DROSOPHILA MELANOGASTER Y SU CONSERVACIÓN DEL ADN

MÉTODO- TÉCNICA



Preparación de soluciones:

Acido láctico – acético: Ác. Láctico 85%, ác. Acético 60% y agua desionizada 1:1:1

Lacto – aceto – orceína: Orceína sintética 1% en volúmenes iguales de ácido láctico 85%: ácido acético 60%. Ponga a ebullición durante varios minutos, enfríe y filtre si se forman precipitados.

Ac. Acético 45% recién preparado

Solución Ringer para *Drosophila melanogaster*: 7.5 g de NaCl, 0.35g de KCl₂ y 0.21g de CaCl₂, diluir en agua destilada o desionizada y aforar a un litro de solución.

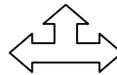
Pesar un trozo de plátano suficiente para llenar 1/4 de un frasco de gerber chico, hacer pure y agregar el 3% de su peso en proporción de ácido propiónico para evitar la contaminación por hongos.

I.- Realizar un cultivo de moscas *Drosophila melanogaster* en un frasco de gerber (aproximadamente a las 40 horas) seleccione las larvas que están en las paredes del frasco (las que están próximas a formar pupas) para la práctica posterior.

II.- Una vez que se ha llevado a cabo la preparación, observa los “puffs” intente identificar los brazos de los cromosomas 1, 2 y 3. Al n° 4 no podrás distinguirlo ya que es muy pequeño y forma parte del cromocentro, la estructura que une a los centrómeros de todos ellos.

III.- Para realizar preparaciones permanentes se congelan los cromosomas colocándolos sobre hielo seco. Una vez congelados, se desprende el cubre objetos con la ayuda de una navaja, exacto o cutre. En seguida se colocan las preparaciones en una jarra “Coplin” con etanol helado y ahí se dejan hasta que el etanol disminuya su temperatura a la ambiental.

FUNDAMENTO



Tanto en los adultos como en las larvas de los dípteros se pueden obtener glándulas salivales, cuyas células facilitan la obtención de cromosomas “politénicos” (cromosomas gigantes). Con un colorante como la lacto-aceto – orceína (colorante afín a las bases nucleicas) es fácil hacer evidente un aumento del diámetro de los cromosomas o aparición de “puffs” en regiones muy específicas.

APLICACIÓN.



Es una técnica muy útil, en investigación citogenética ya que se cuenta con los elementos necesarios para el cultivo de la mosca y para la conservación permanente del mismo ADN. Ésta técnica se puede aplicar al nivel medio para obtener cruces de moscas híbridas y cuantificar sus variaciones fenotípicas.

CLASIFICACIÓN.

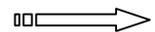
Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.- D. en C. LÓPEZ López Marisol, UAM Xochimilco, 2005 (Técnicas – fotocopias) M. en C. CERVANTES Peredo Alicia, Facultad de química UNAM. 2005 (Técnicas – Fotocopias)

¿PARA QUÉ SIRVE?



Observar los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de *drosophila melanogaster*, induciendo la formación de “puffs”



IMPORTANCIA.

Bridges fue el primero en estudiar a las moscas *drosophila melanogaster*, construyendo un mapa genético de sus cromosomas obteniendo 102 divisiones para los genes politénicos. La mosca cuenta con 4 pares de cromosomas que están unidos por sus centrómeros (cromocentro). En el conjunto se pueden observar 5 brazos que se clasifican como sigue: uno del 1(X) que es acrocentrico, el 2(R) (R, de right) y el 2L (L, de left); el 3 con sus brazos 3R y 3L ; y un brazo muy corto que es el cromosoma 4, el cual no se observa por estar incrustado en el “cromocentro”. Se pueden observar muy claramente unas 5000 bandas en subdivisiones claras (correspondientes ala eucromatina) y subdivisiones oscuras (correspondientes a la heterocromatina); el patrón de bandas es estable ontogénica y filogenéticamente.

¡NOTA IMPORTANTE!



Al disectar las glándulas, éstas deben permanecer en ácido acético al 45% por corto tiempo, evitando que se sequen.

7.5.G.- TÉCNICA PARA OBTENER CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE DROSOPHILA MELANOGASTER

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Iluminar el microscopio de manera que la luz llegue a un ángulo y el fondo se vea oscuro. Colocar la larva en un portaobjetos y añadir una gota de ácido acético al 45%

II.- Colocar la aguja de una jeringa de insulina en la región cefálica donde se ven las partes oscuras de la boca y otra aguja en la región media del cuerpo. Separar ligeramente la región media del cuerpo, con ambas manos, tomando las agujas con los dedos índice y pulgar a modo de que queden 2 segmentos de la larva. Clavar la larva segmentada en un corcho rectangular a la medida de la muestra. Las glándulas quedan expuestas con ésta acción (Si el tubo digestivo y otros tejidos forman una masa, regrese al paso n° I con una nueva larva).

III.- Una vez que localice las glándulas, pase a la disección. Estas deberán permanecer en ác. Acético al 45% durante 3” seg. Eliminar el abdomen, para observar los cromosomas no es necesario quitar el cuerpo graso.

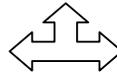
IV.- Eliminar con cuidado la cabeza sin dejar las partes bucales en el portaobjetos ya que al hacer el “squash” no podrás observar los cromosomas dado que las células son más delgadas y no se podrá ejercer presión sobre ellas.

V.- Con sumo cuidado remover el ácido acético inclinando el portaobjetos y absorberlo con papel, lejos de las glándulas. Enseguida añadir 1 gota de HCl 1N por 30” seg y eliminarlo con cuidado.

Rápidamente enjuagar la glándula con ácido lacto – acético para impedir que precipite el colorante. Añadir una gota de colorante y cubrir con la mitad de una caja Petri y esperar 15’ min.

VI.- Pasado el tiempo enjuagar las glándulas con ácido lacto – acético (5” – 10” seg.), colocar un cubre objetos sobre la glándula y envolver en una capa de toalla de papel. Presionar firmemente sobre el cubreobjetos con la goma de un lápiz nuevo, cuidar que no haya el rompimiento o el desliz del cubreobjetos. Observar los cromosomas en el microscopio óptico compuesto, empezando por el objetivo 10X, buscando las zonas rosas con las regiones nucleares.

FUNDAMENTO



A partir de un cromosoma puff se pueden obtener hasta 512 copias de ADN y en cada politénico, un total de 1024 copias que corresponden al desarrollo de la larva, que inician con la transcripción de ciertos genes tempranos. El sitio del gen específico se mide en “centimorgans” (cmg). La observación de los genes también se puede lograr mediante la técnica de FISH (Fluorescencia de hibridación in situ), siguiendo el cambio cromosómico en sus bandas dado a que se inicia la transcripción de ARN (conforme avanza el desarrollo larvario). En buena medida son inducidos con la hormona ecdisona por aumento de temperatura, 40’min a 37 °C.

APLICACIÓN.



Es una técnica muy útil, en investigación citogenética ya que se cuenta con los elementos necesarios para la identificación de bandas en los “puffs” Ésta técnica se puede complementar muy bien con la técnica de FISH, para identificar cambios en los patrones de bandas irradiadas por agentes físicos en moscas híbridas , y a su vez cuantificar sus variaciones fenotípicas.

CLASIFICACIÓN.

Básico Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

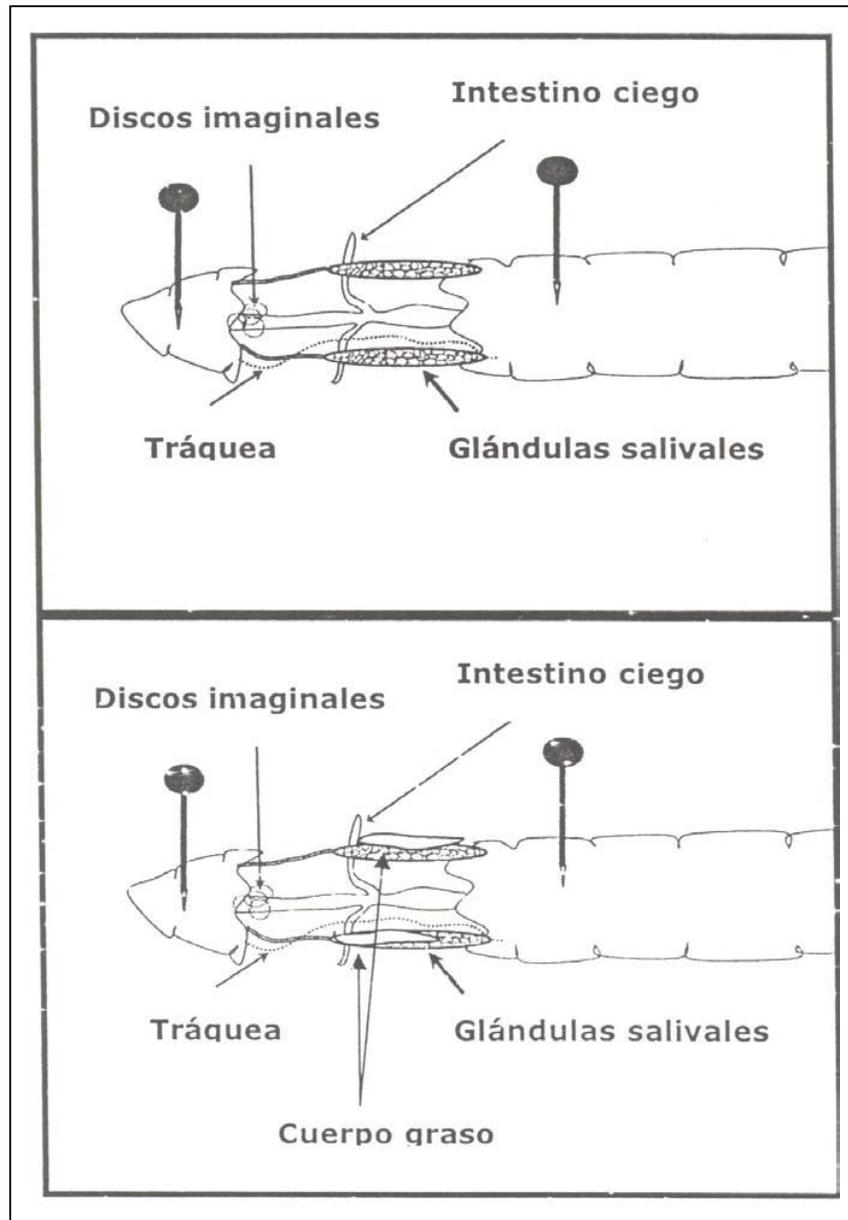
Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



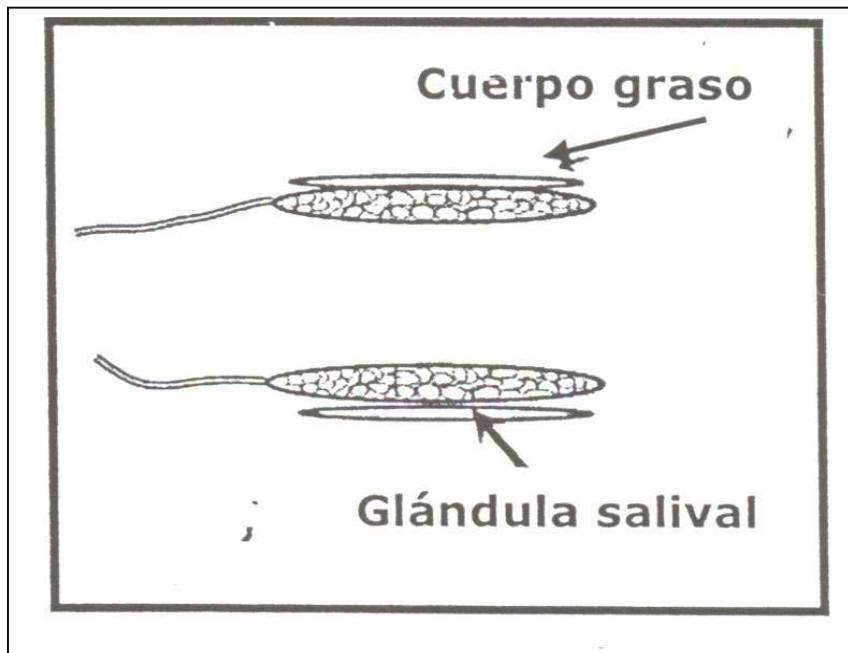
1.- D. en C. LÓPEZ López Marisol, UAM Xochimilco, 2005 (Técnicas – fotocopias) M. en C. CERVANTES Peredo Alicia, Facultad de química UNAM. 2005 (Técnicas – Fotocopias)

ESQUEMA 7 J CROMOSOMAS POLITÉNICOS

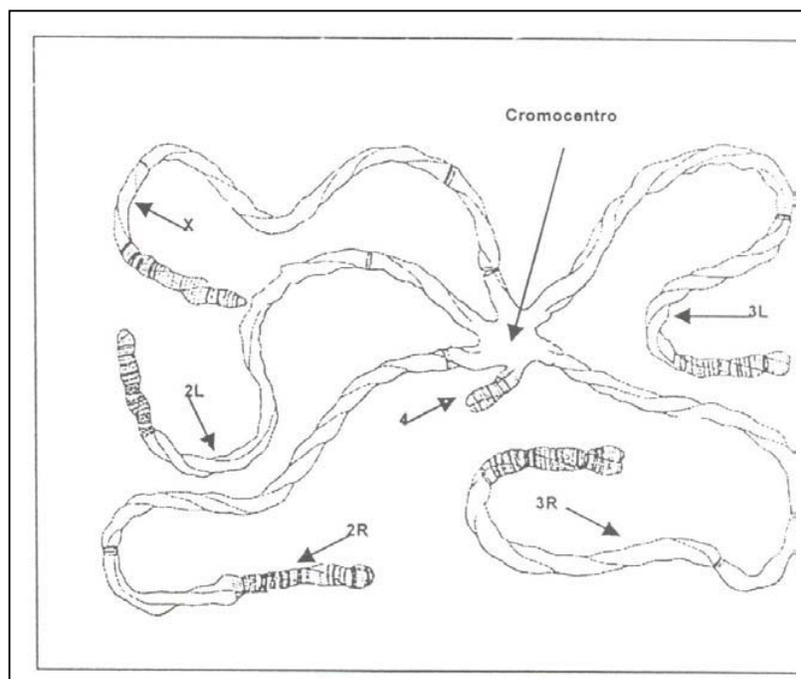


DRA. EN CIENCIAS MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
Esquema que nos muestra la disección de las glándulas salivales en larva de mosca

ESQUEMA 7 K *CROMOSOMAS POLITÉNICOS*

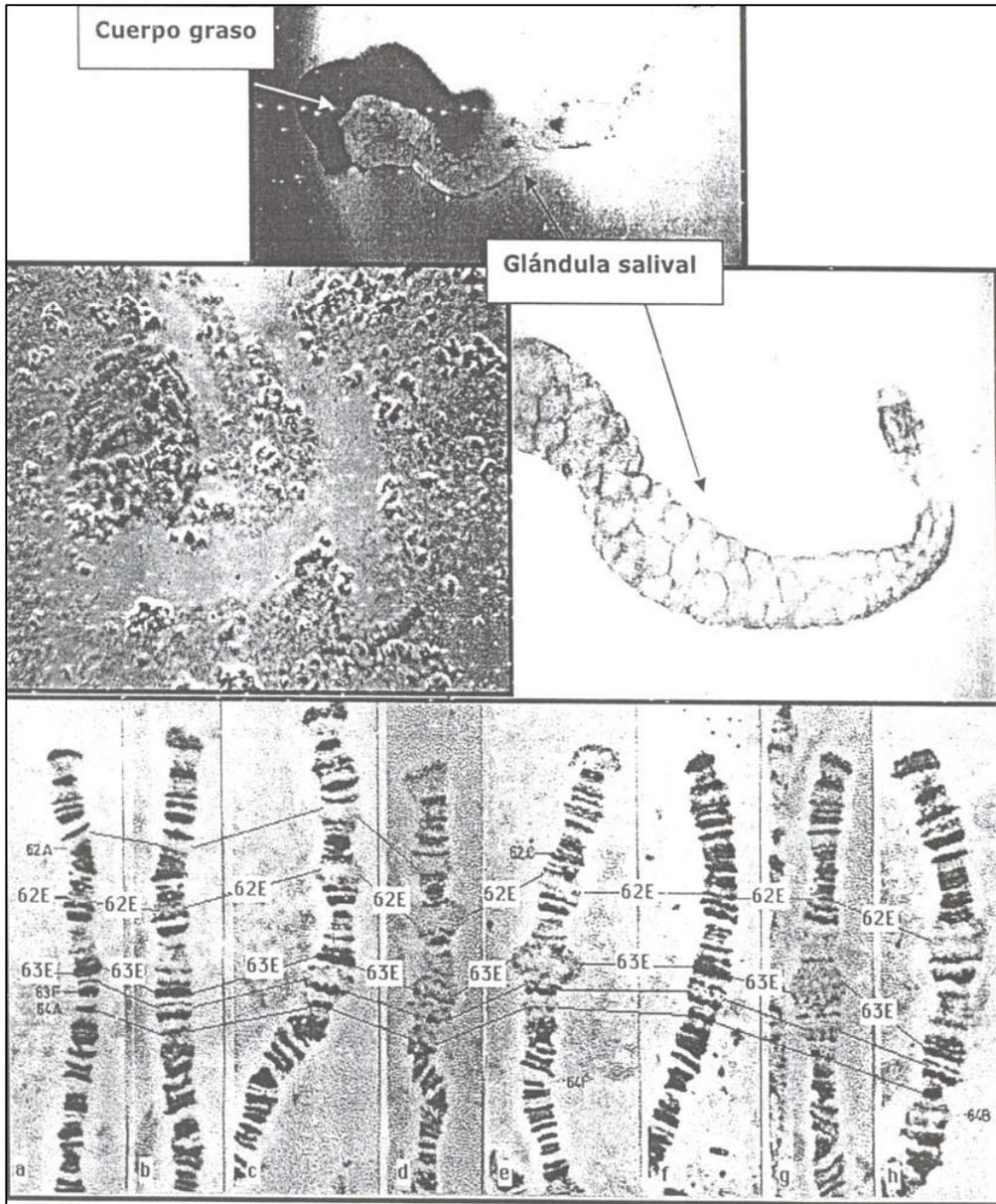


DRA. EN CIENCIAS MARISOL LÓPEZ LÓPEZ.
Esquema que nos muestra una diseción de glándulas salivales en mosca



DRA. EN CIENCIAS MARISOL LÓPEZ LÓPEZ.
Esquema que nos muestra a un cromosoma politénico

ESQUEMA 7 L CROMOSOMAS POLITÉNICOS



DRA. EN CIENCIAS MARISOL LÓPEZ LÓPEZ.

En la parte superior el cuerpo graso y una glándula salival de *Drosophila melanogaster*
a 100X

En la parte inferior se observan los cromosomas politénicos a 40X

INTRODUCCIÓN



La palabra ácido ribonucleico (ARN) deriva del Griego **ácido por oxigene, ὄξύς y ribonucleico** por el azúcar que lo complementa, **la ribosa**.

El ARN se complementa a partir del ADN, y a diferencia del ADN solo esta constituido de 1 sola cadena de nucleótidos, no tiene la forma de la doble hélice, sino varias formas.

La constituyen 4 bases: Adenina = A, Guanina = G, Citosina = C, y Uracilo = U en vez de Timina; otra diferencia más es el azúcar que cambia de desoxirribosa (ADN) por ribosa (ARN). Su función específica consiste en ser un intermediario en la síntesis de proteínas, en donde primero se transcribe del ADN y luego se traduce en una proteína. Se encuentra principalmente en núcleo, ribosomas, citoplasma, mitocondrias, cloroplastos y virus.

En las células eucariontes existen principalmente 6 tipos de ARN:

ARN ribosomal (ARNr) del que se conocen 3 ó 4 formas, es la molécula más grande de entre todos los ARN, cuya función es facilitar la unión del ARNm con el ARNr además de interactuar con otros ARN's para lograr la síntesis de proteínas. Los ribosomas se dividen en 2 sub unidades. La sub unidad grande (50 - 60S) contiene 3 moléculas de ARNr, cuya longitud va de 120 a 4500 nucleótidos y posee alrededor de 50 proteínas distintas, en esta subunidad se presentan 2 sitios de unión con el ARNt. La subunidad pequeña (30 - 40S), se forma de 1800 nucleótidos y cerca de 30 proteínas diferentes; y es la sub unidad que se une al ARNm.

La síntesis proteica se inicia con la unión de las 2 subunidades y la unión de los a.a. a su correspondiente ARNt formando aminoacil - ARNt, que se catalizan directamente por la formación de los enlaces peptídicos por el sitio **A** aceptor de aminoácidos y el sitio **P** portador de la cadena polipeptídica.

PIE DE FOTO.



Imagen que representa el mecanismo de regulación que se da entre el DNA y el RNA para la síntesis de proteínas a partir de la formación de aminoácidos.

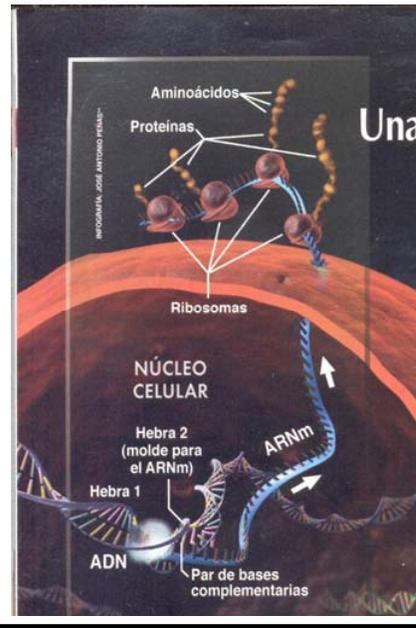
7.6.- LOS ARN'S

CITA TEXTUAL



Las células animales y vegetales cuentan con eficaz mecanismo de seguridad para triturar genes procedentes de agentes infecciones, de células tumorales e incluso de su propio ADN. La alarma se dispara cuando la célula detecta los ARN de cadena doble producidos por este material genético "indeseable", que son desmenuzados por una enzima. Estos micro ARNs producidos de forma sintética empiezan a ser empleados con fines terapéuticos. El ribosoma - un ARN con actividad enzimática - se ancla al ARNm patógeno que porta una secuencia de letras complementarias. Una vez unido, lo fragmenta y queda libre para volver a actuar.

IMAGEN:



GUÍA DEL ESTUDIANTE. ?

- 1).- ¿Cuál es el azúcar característica del ARN?
- 2) ¿Cómo se llama a la técnica que identifica el azúcar anterior?
- 3).- De que otro organelo se llega a obtener ARN?

COMENTARIOS



ARN de transferencia (ARNt), con aproximadamente 25 estructuras diferentes. Es una molécula pequeña y tiene la forma de un trébol o cruz, su función principal es la de leer el código del ARNm anclado en el ribosoma, y añadir los aminoácidos en un orden exacto para fabricar la proteína, transporta los aminoácidos desde el citoplasma, hasta el sitio donde se forman las proteínas.

ARN mensajero (ARNm), de los que existen tantas variantes como proteínas hay en un organismo. Su secuencia es complementaria a al del ADN y se encarga de transferir la información codificada en un gen para la síntesis de proteínas desde el núcleo hasta los ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso.

ARN heteronuclear (ARNht), que se considera el precursor del RNAm, se encuentra en el núcleo y su primer contacto es con éste mismo

RNA pequeños nucleares (ARNsn), con actividad catalítica o enzimática y se encarga de romper y ligar sustratos de ARN

RNA interferente pequeño o silenciador (ARNip), se encarga del silenciamiento de genes. Cuando la célula huésped detecta un gen maligno, la maquinaria del ARNip corre a silenciarlo, para ello intercepta y destruye el ARNm del invasor, rompiendo y degradándolo, lo que hace que se aborte la síntesis de proteínas para la que codifica (regularmente proveniente de un virus), pero sin perturbar la función de los demás genes. En la actualidad se conocen otras sinonimias de este ARN como ARN bicatenario, ARN y ARNs.

FUENTES.



- 1).- M. COMPERIAS .Enrique, Nueva Medicina, ARN, La gran esperanza, Nueva Medicina, Muy Interesante, Año XXI, No 3, 2004.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Aislar específicamente ARNr por una técnica de centrifugación con los reactivos correspondientes.

IMPORTANCIA.



Lo importante de ésta práctica es que se puede extraer y conservar ARNr específicamente (exento de proteínas y ADN) para análisis posteriores.

¡NOTA IMPORTANTE!



¡Cuidado!, al usar la mezcla de Fenol – Cresol, utilice guantes de plástico para no quemarse.

7.6.A.- AISLAMIENTO DE ARN RIBOSOMAL

MÉTODO- TÉCNICA



I.- Enfriar un homogenizador a 5°C, macerar un hígado fresco y suspenderlo en 4 – aminosalicilato de sodio al 6% (p/v) + NaCl en Fenol - Cresol al 1%; empleando 5 ml de solución / 1g de muestra, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 20' min.

II.- Centrifugar a 8 000 G / 10' min a 5 ° C, al quedar alguna emulsión volver a centrifugar hasta quitarla, procure que se combinen las fases líquidas superiores.

III.- Añadir 3g de NaCl / 100 ml de fase superior, y extraer la mezcla con 0.5 ml de Fenol – Cresol / 10' min a temperatura ambiente.

IV.- Ahora centrifugar la mezcla a 10 000 G durante 15' min a 2° C. Separar la mezcla en 3 fases: la inferior- amarillo transparente, la intermedia – sólida y la superior – blanca lechosa. Quitar la fase superior sin tocar la fase intermedia (de proteínas) y volver a centrifugar a 20 000G / 5' min hasta aclarar.

V.- Mezclar la fase acuosa con 2 volúmenes de la mezcla alcohol etílico / m – cresol 9:1, dejar reposar de 30' – 60' min a 2°C.

V.- Centrifugar a 20 000 G / 5' min. A 5°C, recoger el precipitado y extraer 2 veces con 12 ml de acetato de sodio 3 M frío a pH =6.

VI.- Obtener el ARN de ribosomas por una centrifugación a 20 000 G / 5' min. A 5°C.

VII.- Una vez obtenida la muestra, lavar con 12 ml de una mezcla 1:3 de NaCl al 4% / alcohol etílico; una vez con alcohol etílico / agua, 3:1, y 2 veces con alcohol etílico. Desecar al vacío sobre CaCl₂.

Su rendimiento debe ser de 40 mg / 7g de hígado.

Disolver 10 mg de muestra en NaOH 0.01 M, a razón de 1mg / ml; para análisis ulteriores.

*Checar tabla de fraccionamiento subcelular

FUNDAMENTO



A parte de los cambios químicos antes mencionados en los aislamientos de ADN animal y vegetal, es importante resaltar que el pH, la velocidad de centrifugación, y el tiempo son determinantes para la obtención de los organelos y biomoléculas que se desean extraer, rompiendo y capturando a través de trampas químicas y físicas.

APLICACIÓN.



Dada la preescisión del trabajo en ésta práctica, solo se recomendable para los niveles superior y en los niveles de postgrado.

CLASIFICACIÓN.

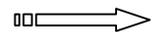
Básico Medio Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo ♦

Cuantitativo.

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-RENDINA. G. Técnicas de bioquímica aplicada, España, Interamericana, 1997.

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cuantitativa la presencia de un azúcar en muestras biológicas.

Determinar la presencia de ribosa, carbohidrato del orden de los monosacáridos presentes en el ARN, valiéndose de un método llamado curva patrón y una técnica colorimétrica.



IMPORTANCIA.

Su importancia radica en que diferencia entre ribosa y la desoxirribosa mediante un vire de color característico.

Además es una prueba determinante y específica para ARN.

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida. Recomendable para el nivel superior e investigación.

¡NOTA IMPORTANTE!



Calibre adecuadamente el espectrofotómetro y prepare muy bien los tubos a leer problema, patrón y blanco.

7.6.B.- CURVA PATRÓN DE LA RIBOSA CON ORCINOL

MÉTODO- TÉCNICA



Preparar las siguientes soluciones:

Sol. 3 Tubos de ARN en disolución salina (50µg / ml) 10ml, (100µg / ml) 10ml, (150µg / ml) 10ml

Sol. De orcinol I. 100mg de FeCl₃ . 6 H₂O en 100ml de HCl.

Sol. De orcinol II. Orcinol al 6% en alcohol.

I.- Tomar 2ml de la solución de ARN + 3ml de solución de orcinol I + 3.5 ml de solución de orcinol II.

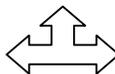
II.- Se procede a calentar en baño maría durante 20' min.

III.- Preparar una curva patrón con 5 tubos patrones a diferentes concentraciones en solución (como se indica en la tabla posterior) y su respectivo blanco, leer a 660 nm.

R (+) = Color Verde

***Checar tabla de parámetros de medición de ARN con Orcinol**

FUNDAMENTO



Al calentarse las pentosas con ácido clorhídrico concentrado, se transforma en furfural, el cual en presencia de FeCl₃, da una coloración con el orcinol. Solo los nucleótidos púricos dan reacción.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas, es muy usual para la identificación de ARN.

Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ARN desconocidos, por ende se utilizan muy bien en todos los niveles superiores y de investigación, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se haga cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

TABLA 7 H

Reactivos	Tubo número									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A) Patrón de RNA (50 mg/litro) en TCA al 5 por 100, ml		0.2 (0.01 mg)	0.5 (0.025 mg)	1.0 (0.05 mg)	2.0 (0.10 mg)					
B) TCA al 5 por 100, ml	2.0	1.5	1.5	1.0	0.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
C) Extractos, ml						0.5 Homogeneizado	0.5 Núcleos	0.5 Mitocondrias	0.5 Microsomias	0.5 Sobrenadante
D) Reactivo de orcinol	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

RENDINA. Tabla que nos muestra los parámetros de medición para la curva patrón del ARN con Orcinol.
Práctica 7.6.B

¿PARA QUÉ SIRVE?



Determinar de manera cuantitativa la presencia de un azúcar en muestras biológicas.

Determinar la presencia de desoxirribosa, carbohidrato del orden de los monosacáridos presentes en el ARN, valiéndose de un método llamado curva patrón y una técnica colorimétrica.

IMPORTANCIA.



Su importancia radica en que diferencia entre desoxirribosa y ribosa mediante un virre de color característico.

Además es una prueba determinante y específica para ADN y ARN, que suele ser cuantitativa.

Prueba sumamente eficaz, sensible y rápida. Recomendable para el nivel superior e investigación.

¡NOTA IMPORTANTE!



Calibre adecuadamente el espectrofotómetro y prepare muy bien los tubos a leer problema, patrón y blanco.

7.6.C.- CURVA PATRÓN DE LA RIBOSA CON DIFENILAMINA

MÉTODO- TÉCNICA



Preparar las siguientes soluciones:

10ml de ácido tricloroacético al 10%

Reactivo de difenil amina. 1 g de difenil amina en 100ml de ácido acético glacial + 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado.

I.- Siguiendo el paso VII de "Extracción de ARN Animal II", tomar 2ml de ésta solución y añadir 1 ml se ácido tricloroacético al 10% + 5ml de reactivo de difenil amina.

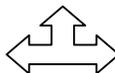
II.- Realizar una ligera mezcla y calentar 10'min a baño maría

III.- Preparar una curva patrón con 5 tubos patrones a diferentes concentraciones en solución (como se indica en la tabla posterior) y su respectivo blanco, leer a 595 nm.

R (+) = Color Azul - Verdoso

***Checar tabla de parámetros de medición de ADN, solo que en éste caso cambie por ARN, tabla correspondiente a la práctica 7.2.D.**

FUNDAMENTO



El azúcar conocido como desoxirribosa, reacciona fácilmente con la difenil amina en medio ácido, dando una reacción positiva solo en los azúcares unidos a bases púricas, ya que éstas se liberan adoptando una configuración abierta dentro de la cadena de ARN.

APLICACIÓN.



Se aplica muy bien a las prácticas del laboratorio escolar para identificar azúcares reductores en diversas muestras biológicas, es muy usual para la identificación de ARN en los procesos y métodos de investigación.

Es importante resaltar que estas prácticas son de gran relevancia para la identificación de ARN, por ende se utilizan muy bien en todos los niveles e investigación, aunque bien, se puede aplicar al nivel básico, siempre y cuando se haga cualitativa.

CLASIFICACIÓN.

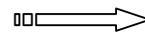
Básico ♦ Medio ♦ Superior ♦

Cualitativo.

Semicuantitativo.

Cuantitativo ♦

REFERENCIAS DE LA TÉCNICA.



1.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F. Biomoléculas Lecciones de Bioquímica Estructural, REVERTE, España, 1993.

TABLA 7 I

Reactivos	Tubo número									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A) Patrón de DNA (50 mg/100 ml) en ácido perclórico 1 N, ml		0.1 (0.05 mg)	0.2 (0.1 mg)	0.4 (0.2 mg)	0.8 (0.4 mg)					
B) Extractos, ml						1.0 Homogeneizado	1.0 Núcleos	1.0 Mitocondrias	1.0 Microsomas	1.0 Sobrenadante
C) PCA 1 N	1.0	0.9	0.8	0.6	0.2					
D) Reactivo de difenil-amina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

RENDINA. Tabla que nos muestra los parámetros de medición para la curva patrón del ARN, Ribosa con Difenil Amina (sustituyendo ADN por ARN). Práctica 7.6.C.

ESQUEMA 7 M

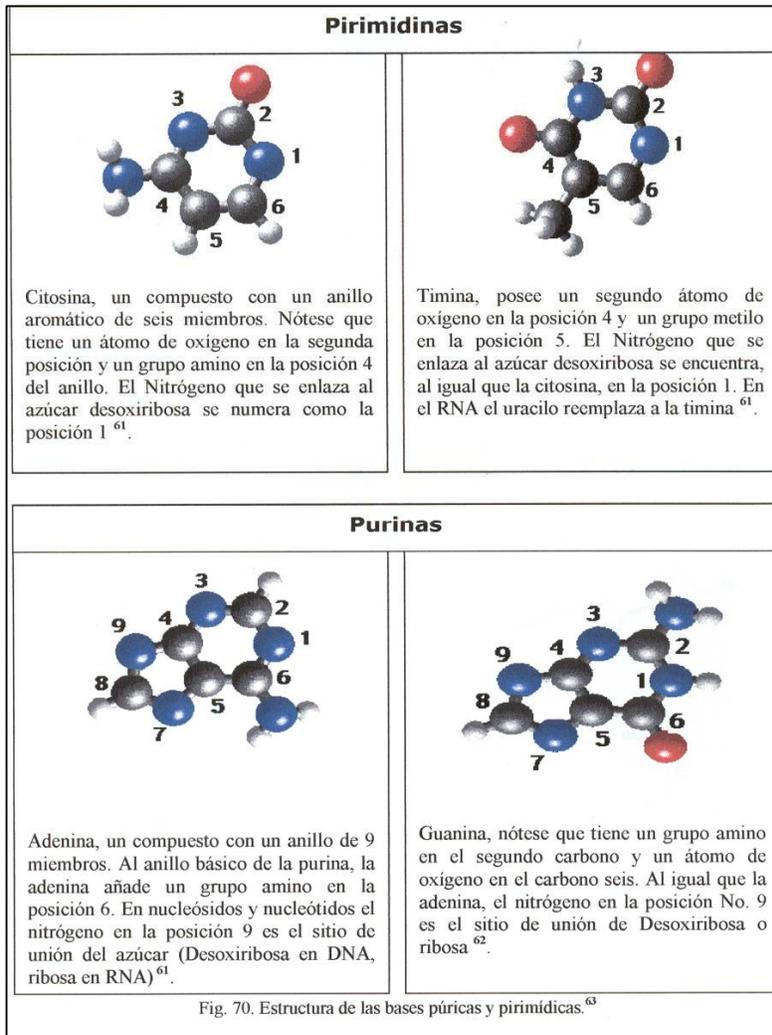
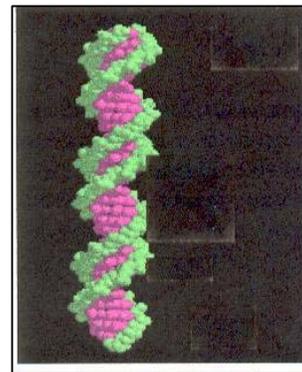


Fig. 70. Estructura de las bases púricas y pirimídicas.⁶³

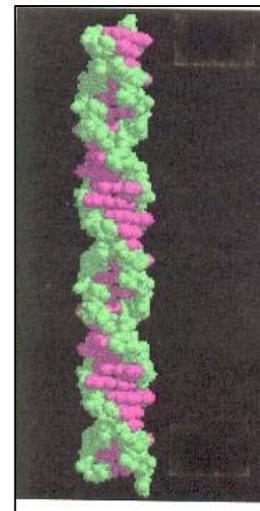
Esquema que muestra la estructura molecular de las bases púrica y pirimídicas

Base	Nucleósido	Nucleótido	Abreviatura	
			RNA	DNA
Adenina	adenosina	ácido adenílico	AMP	dAMP
Guanina	guanosina	ácido guanílico	GMP	dGMP
Citosina	citidina	ácido citidílico	CMP	dCMP
Timina	timidina	ácido timidílico		dTMP
Uracilo	uridina	ácido uridílico	UMP	

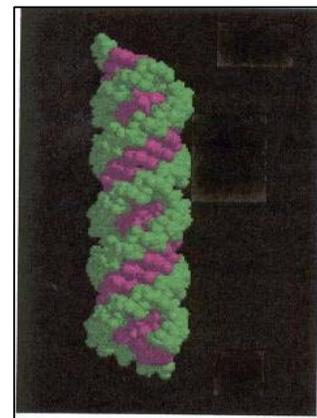
Conformación y nomenclatura de los ácidos nucleicos
TESIS Verónica



ADN- B



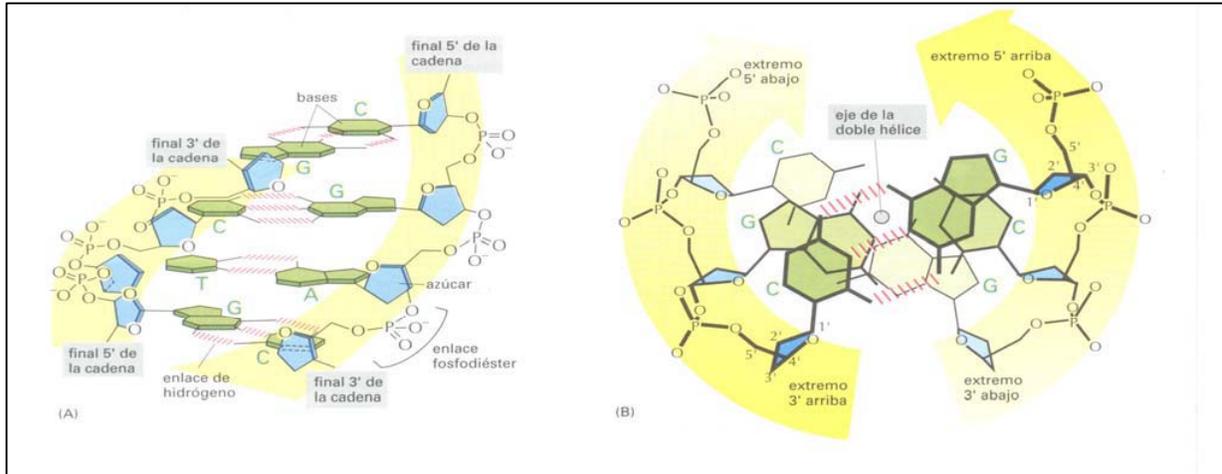
ADN- A



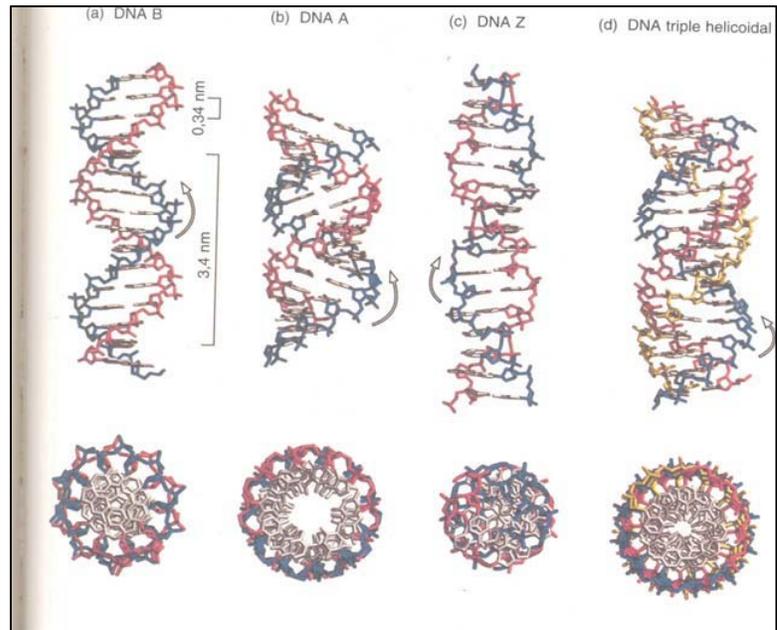
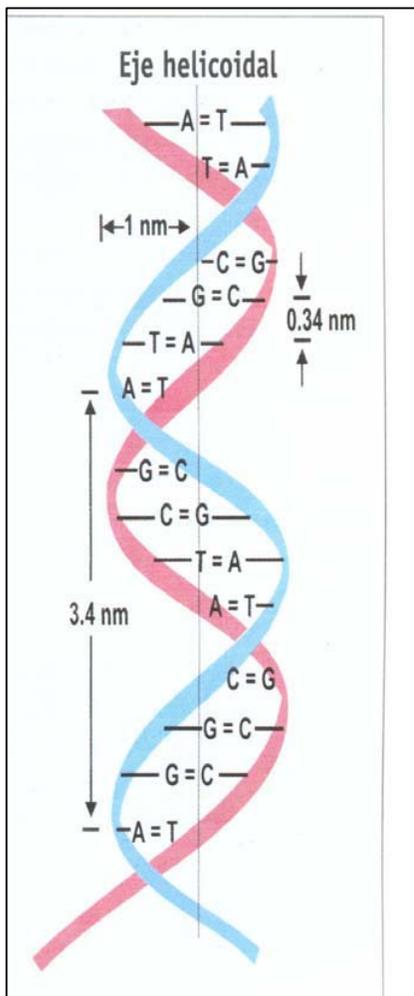
ADN- Z

Diferentes conformaciones del ADN

ESQUEMA 7 N



AUDESIRK



LODISH

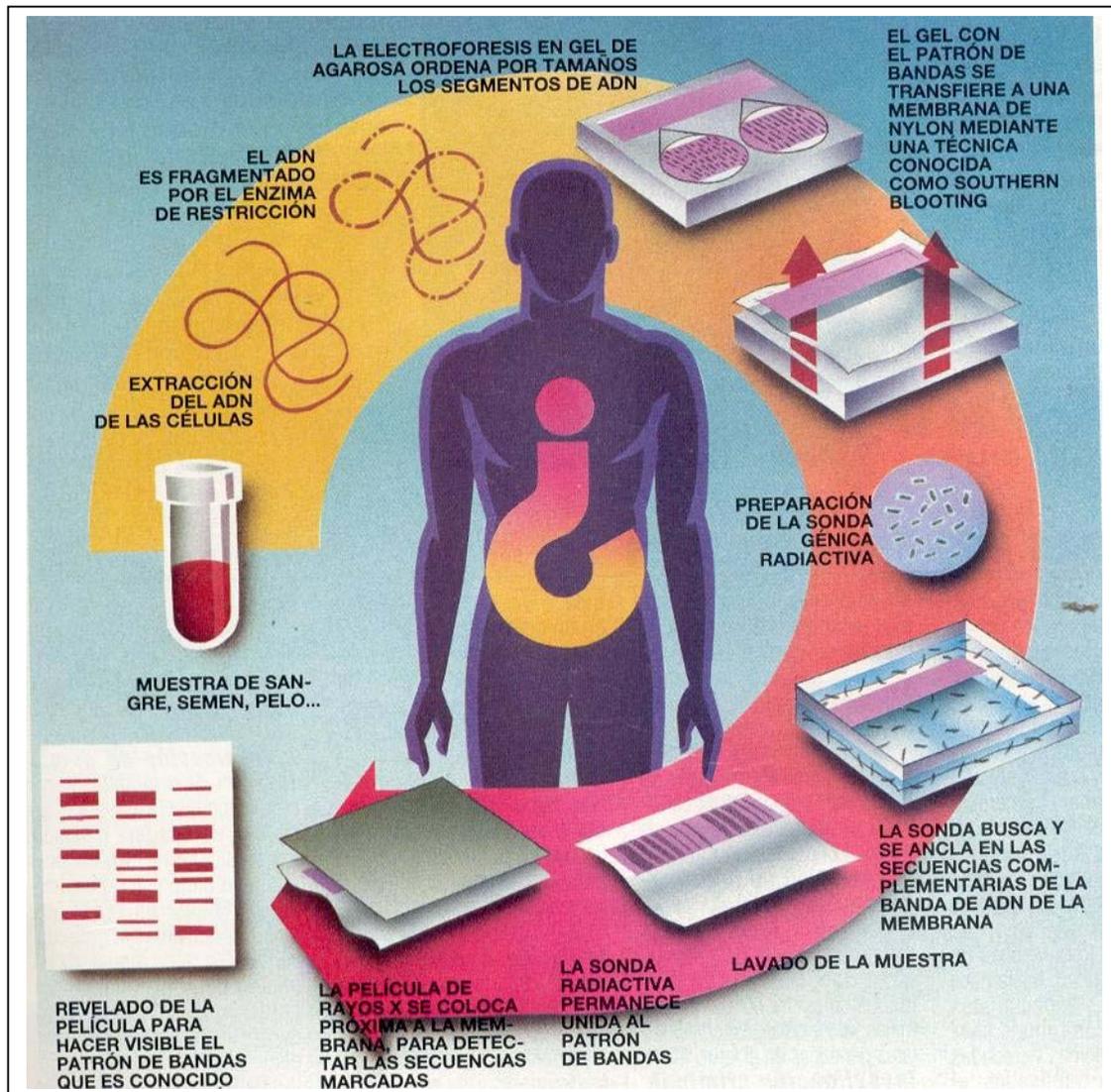
Representación del ADN a través de modelos, vistos desde diferentes puntos de vista.

TABLA 7 J

	Southern Blot	Northern Blot	Western Blot
1	Extraer el DNA de las células	Extraer el RNA de las células	Extraer Proteinas de las células
2	Cortar con enzimas de restricción	Desnaturalizar con formaldehído	Desnaturalizar con SDS
3	Electroforesis en gel (generalmente agarosa)	Electroforesis en gel (generalmente agarosa)	Electroforesis en gel (generalmente poliacrilamida-SDSPAGE)
4	Desnaturalizar DNA con álcali		
5	Transferir a Nitrocelulosa (generalmente por capilaridad)	Transferir a Nitrocelulosa (generalmente por capilaridad)	Transferir a Nitrocelulosa (generalmente por electroforesis)
6	Bloquear con DNA en exceso	bloquear con RNA en exceso	Bloquear con proteína en exceso
7	Hibridizar con sonda de DNA marcada.	Hibridizar con sonda de DNA marcada.	Hibridizar con sonda de anticuerpo marcado.
8	Lavar para eliminar sonda no unida.	Lavar para eliminar sonda no unida.	Lavar para eliminar sonda no unida.
9	Autoradiografía	Autoradiografía	Autoradiografía o revelado enzimático con sustrato cromogénico

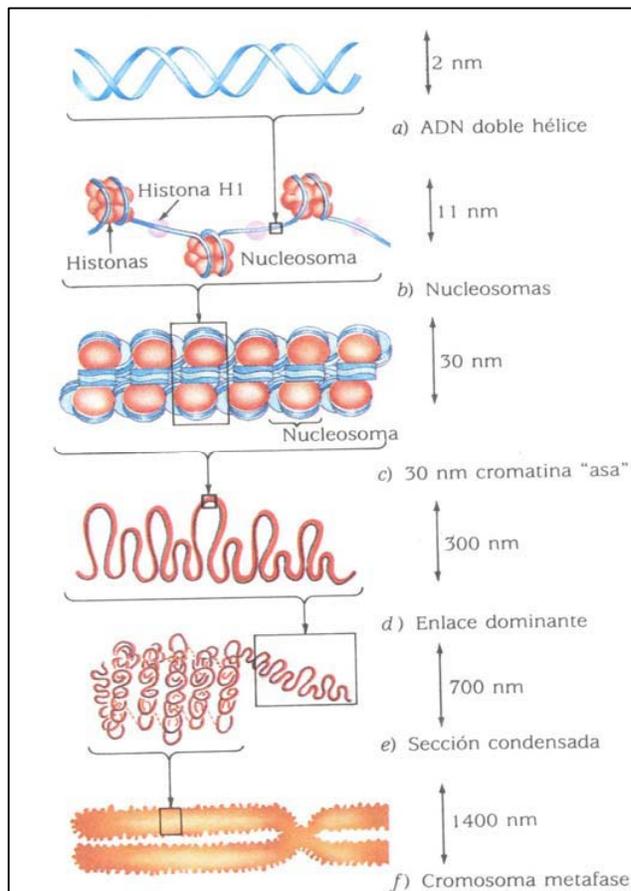
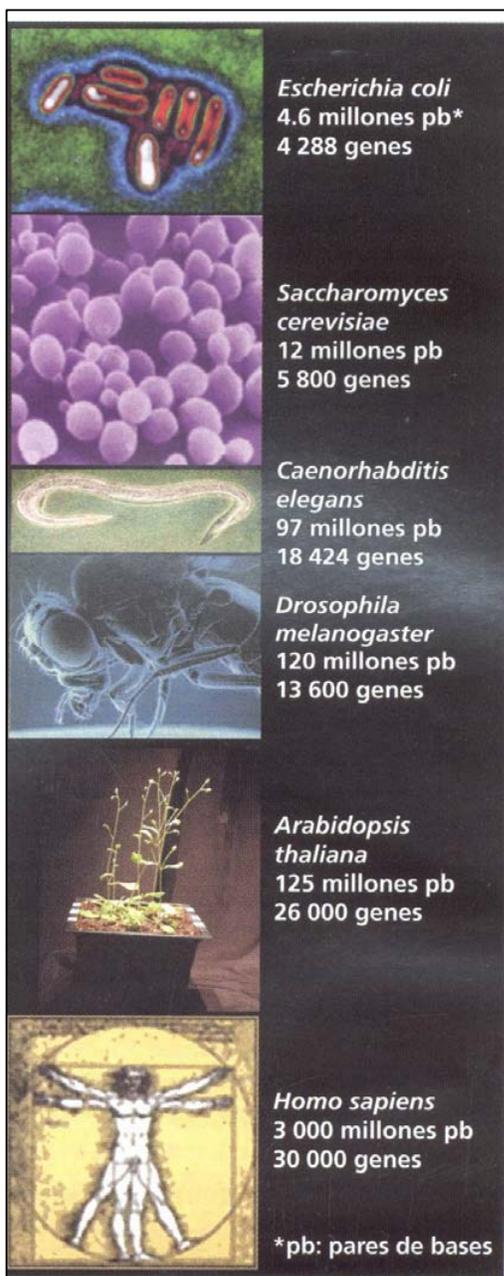
Procedimiento de trabajo para las sondas - Tesis Verónica usando una cámara cromatográfica

ESQUEMA 7 Ñ



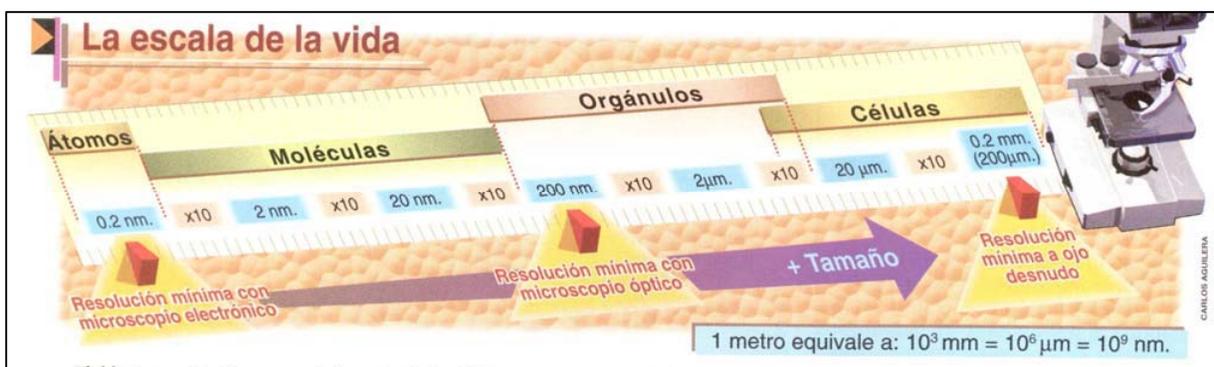
Esquema que nos muestra la preparación de una huella Génica - Muy Interesante especial de genética

ESQUEMA O

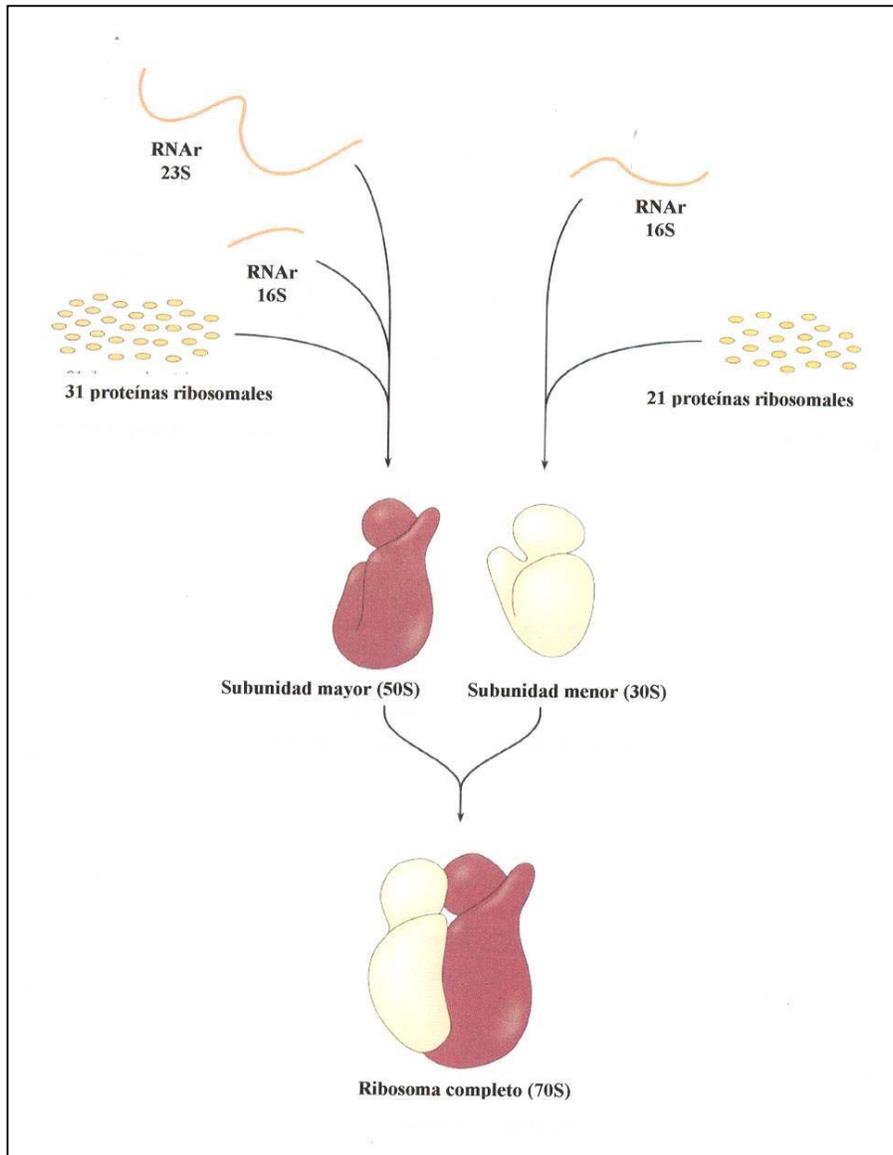


Armado de una escala cromosómica - Lodish

Comparación de genes en una escala – Muy Interesante

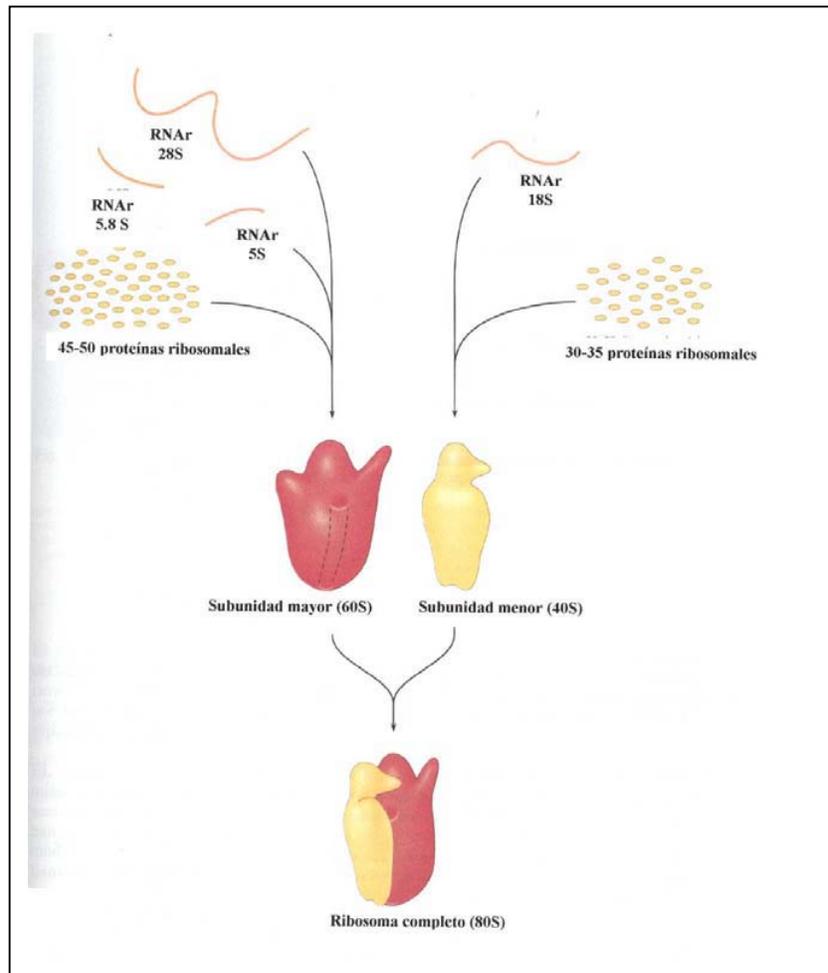


ESQUEMA 7 P



TESIS VERÓNICA. ARN representativo de células Procariotas

ESQUEMA 7 Q



ARN representativo de células Eucariotas – Tesis Verónica

TESIS VERÓNICA. ARN representativo de células Eucariotas

RESULTADOS

El presente manual es el resultado de la unión entre un sistema conocido como fichas de triple entrada y las necesidades existentes de un manual en el área de bioquímica en la FESC (carrera de Q.F.B.), elaborado con la finalidad de apoyar didácticamente a los alumnos y docentes de éste nivel en sus prácticas de laboratorio escolar y en la teoría, por ende, se procuró ajustar lo más objetivamente a cada práctica, a las necesidades y requerimientos de los respectivos planes de estudio, y a las necesidades de los laboratorios escolares.

En consecuencia, se obtuvo un manual con los capítulos recomendados y acordes para el desarrollo, y el contexto de cada uno de los temas elegidos en el área bioquímica. Por lo tanto para el marco teórico y para marco experimental se buscó un protocolo adecuado y sencillo capaz de llenar no solo las necesidades de la carrera sino que también llenará las necesidades de 2 niveles más; el nivel secundaria y el nivel de preparatoria. Con ésta finalidad se procuraron mejoras didácticas para dichos alcances. Además se incluyó un índice general, un apéndice complementario de figuras que va intercalados en cada capítulo, un apéndice con algunos datos relevantes y bibliografías suficientes para consultar; elementos que facilitarán la localización rápida en cualquier punto del marco teórico o del marco experimental o lo relacionado con el tema buscado facilitando el trabajo al máximo.

Si logro mi propósito de poner en manos de los docentes algo útil y práctico para la formación de sus alumnos, será para mí una satisfacción el haber contribuido en ésta forma al encauzamiento y mejor preparación de nuestros futuros profesionistas.

*Licencia del derecho de autor en trámite.

CONCLUSIONES

El trabajo realizado cumple con los objetivos descritos, al proporcionar un manual con una metodología nueva conocida como fichas de triple entrada que aborda la parte teórica y experimental de los siete grandes grupos de biomoléculas.

Tanto la parte teórica como las prácticas se complementan para facilitar el acceso a un tema específico, sencillo y concreto con el fin de cumplir finalmente con la integración de la pedagogía y la bioquímica.

Finalmente tanto el marco teórico como el marco experimental cumplen adecuadamente con la finalidad de facilitar y reforzar el aprendizaje en el área bioquímica, química y biológica; tanto en los alumnos de la FESC como en los alumnos de nivel preparatoria y secundaria respectivamente y de acuerdo a los planes de estudio actuales.

APÉNDICE

EL LABORATORIO ESCOLAR Y SUS MEDIDAS DE SEGURIDAD

Todos los laboratorios experimentales de los distintos niveles escolares son escenarios muy propensos a los accidentes. Muy pocos son los laboratorios que cuentan con verdaderas normas de seguridad y que realmente las llevan a cabo. No obstante lo que denominamos “accidentes” no es algo que ocurre casualmente, sino que está ocasionado por procedimientos inadecuados, por descuidos, por ligerezas o por jugar. Por ésta razón todos los estudiantes deberán estar regidos por un reglamento interno del laboratorio y por sus respectivas normas de seguridad, en caso de alguna irregularidad deberás avisar al profesor titular, al profesor del laboratorio, al asistente del laboratorio o al laboratorista; reflexiona que tu eres responsable de tu propio comportamiento y de tu propia seguridad.

Recuerda que se te está entrenando para trabajar con sustancias y equipos de una manera segura y responsable. Si observas cuidadosamente las precauciones que se citan a continuación, te evitarás contratiempo y sobre todo accidentes. Por consiguiente, deberás, aprender el hábito de adoptar medidas de seguridad, que te resultarán de un valor inestimable, no solo en el laboratorio escolar, sino también en el ámbito profesional y laboral.

I.- Evita punzadas, cortes y laceraciones.

- a) Cuando taladre un corcho y posteriormente introduzca una varilla de vidrio, lubríquela antes con agua jabonosa o aceite.
- b) Protege tus manos con una franela.
- c) Cuando gire la varilla, nunca la utilice como palanca, tómelala por la parte más próxima al corcho.
- d) Para sacar una varilla de vidrio o un termómetro proceda de igual manera que cuando lo va a meter.

II.- Protección contra incendios.

- a) Los disolventes orgánicos inflamables por debajo de los 100° C, como por ejemplo metanol, etanol, cloroformo, benceno, éter de petróleo, ligroína, etc; deberán destilarse, calentarse o evaporarse sobre un baño maría o de vapor y nunca a fuego directo.
- b) Los disolventes inflamables deberán guardarse en frascos bien cerrados, no deberán estar juntos aquellos que reaccionen y menos cerca del fuego.
- c) No se deberán verter sustancias inflamables en las tarjas.
- d) El laboratorio dispondrá de un extintor vigente, de una regadera y de ser posible, una manta. Deberá conocer su empleo.
- e) Los incendios ocasionados por elementos del grupo 1 y solventes orgánicos que reaccionen con agua, deberán sofocarse con arena seca o carbonato sódico, y después recoja todos los residuos para colocarlos en un lugar seguro.

III.- Proteja su cuerpo con los implementos necesarios como:

- a) Bata blanca de algodón y de manga larga.
- b) Zapato cerrado de cuero y con suela antiderrapante.
- c) Goggles o lentes.
- d) Y otros más como guantes, cubrebocas, cofia, etc.
- e) Lave siempre sus manos al término de cada práctica.
- f) No permita el contacto innecesario de sustancias con la piel
- g) No pruebe nunca ninguna sustancia ni ingiera alimentos durante las prácticas.
- h) Nunca huela directamente los reactivos, manténgalo a distancia y abaníquelos con su mano.

IV).- Protección general

- a) Nunca trabaje sólo en un laboratorio.
- b) Trabaje limpiamente en su mesa de trabajo, si salpica algo límpielo.
- c) Nunca caliente un sistema cerrado completamente en donde se genere un gas, procure dejar una abertura de tamaño adecuado o permita que hay una conexión con un tubo de vidrio y otro recipiente.
- d) Procure que no haya inundaciones en las mesas de trabajo y sobre todo si están al alcance las tomas de corriente.
- e) Nunca exponga los cables de corriente a las tajas metálicas, puede ocasionar un accidente.
- f) Evite mirar por las boquillas de tubos de ensayo y por los matraces cuando se esté llevando a cabo una reacción o se este calentando una sustancia.
- g) No sacuda un tubo de ensayo o una probeta bruscamente, ni siquiera describiendo un arco.
- h) Cuando vea un pequeño incendio, arroje un trapo de algodón empapado con agua.
- i) Cerciórese que las llaves de gas y tomas de corriente están bien cerradas.
- j) Sólo haga uso del extintor, la manta de asbesto o la regadera en casos extremos de seguridad.
- k) Si la sustancia de un frasco se prende, ahogue el fuego tapando el recipiente con un vidrio una cápsula de porcelana o un tapón húmedo.
- l) En caso de haya humo y sea denso, procure arrastrarlo hacia la salida.

V).- Normas:

- a) Deberá existir un reglamento interno bien establecido.
- b) Deberá existir un botiquín adecuado a las necesidades del laboratorio escolar.
- c) Deberán existir extintor, regadera, campana extractora, tela de asbesto, manual de primeros auxilios, un directorio con los teléfonos de emergencia de la zona, bitácora de entradas, un código de colores para las instalaciones y un código de color para identificar la naturaleza de los reactivos.
- d) Deberán existir láminas que indiquen como se deben tratar los desechos químicos, los accidentes ocasionados por químicos y otros letreros de seguridad.

VI).- Reacciones

- a) Recuerde que el sodio y el potasio reaccionan con el aire y con el tetracloruro de carbono.
- b) Recuerde que los agentes oxidantes fuertes y los agentes reductores (sustancias que se oxidan con facilidad), deberán mezclarse en pequeñas cantidades y con suma precaución.
- c) Nunca mezcle ácido nítrico con alcohol (reductor orgánico altamente explosivo) u otra sustancia que se oxide fácilmente.
- d) Absorba los gases irritantes en agua u otro medio adecuado.
- e) Mantenga todos los frascos de reactivos volátiles bien cerrados para evitar su reacción con otros.
- f) Nunca exponga glicerina con permanganato de potasio
- g) Nunca ponga tapones de goma a los frascos que contengan solventes orgánicos ya que éstos atacan a la goma y causan contaminación.
- h) Nunca deje trozos o escamas de sodio en las papeleras o en las tarjas, colóquelas en queroseno y pregunte al profesor don pueden colocarse.
- i) El trabajo con bromo, tricloruro de fósforo cloruro de acetilo, yodo, cloruro de benzoílo y demás sustancias irritantes deberán realizarse en la campana extractora.
- j) Por último, cuando tenga duda sobre una reacción pregunte a su profesor más cercano, no se quede con la duda, ya que esto puede salvar su integridad o hasta su vida.

TRATAMIENTOS DE ACCIDENTES QUÍMICOS EN EL LABORATORIO ESCOLAR

TIPOS DE SUSTANCIAS	INHALACIÓN	INGESTA	DAÑO EN PIEL	DAÑO EN OJOS
<p>ÁCIDOS CORROSIVOS (CONCENTRADOS)</p> <p>AC. SULFÚRICO. AC. NÍTRICO. AC. FOSFÓRICO. AC. ACÉTICO. ETCETERA.</p>	<p>Ojos llorosos, irritación en membranas, tos, estornudos, dolor de pecho, dificultad para respirar, dolor de cabeza, náusea</p>	<p>Aflojar la ropa, dar leche de magnesia, evitar el vómito, diluir el ácido en el estómago, llamar a la ambulancia</p>	<p>Comezón, quemadura blanca, ampollas, daño en tejidos, shock.</p>	<p>Sensación de quemadura, enrojecimiento, dolor en ojos y párpados y úlcera en tejidos.</p>
<p>BASES CORROSIVAS</p> <p>HIDROXIDOS DE: SODIO, AMONIO, POTASA, ETCETERA</p>	<p>Irritación en nariz, ojos y garganta, sensación de quemadura en garganta, dificultad para respirar, tos y fluidos en pulmones</p>	<p>Sensación de quemadura intensa en boca, garganta y estómago, membranas blancas, dolor al tragar y vómito con hemorragias.</p>	<p>Dolor, ulceración resbalosa. Daño profundo en tejido y estado de shock.</p>	<p>Dolor intenso e irritación inmediata de ojos y párpados. Ojos llorosos. Cierre continuo de ojos con fuerza. Ulceración.</p>
<p>SUSTANCIAS QUE REACCIONAN CON EL AGUA.</p> <p>LITIO, SODIO, POTASIO, ACIDOS Y BASES FUMANTES METALES ALCALINOS Y ALCALINOTERREOS</p>	<p>Irritación en nariz y ojos, tos violenta, dificultad para respirar, aspecto azul en la piel, fluidos pulmonares.</p>	<p>Irritación en boca y garganta, salivación, sensación de quemadura en estómago, náuseas, cólicos y vómito con hemorragia.</p>	<p>Comezón, irritación y sensación de quemadura. Enrojecimiento, ulceración y necrosis</p>	<p>Comezón y sensación de quemadura</p>
<p>DISOLVENTES ORGÁNICOS</p> <p>CLOROFORMO, ÉTER, BENCENO, ACETONA, ESTERES ALDEHIDOS ETCETERA.</p>	<p>Respiración agitada, excitabilidad, "borrachera", fatiga, dolor de cabeza, náuseas con vómito, fatiga, pérdida del conocimiento.</p>	<p>Evitar el vómito, Aflojar la ropa, Si hay convulsiones; evitar que se lastime, no dejarlo solo, llamar al médico.</p>	<p>Retirar todo el Reactivo con agua abundante. Llamar al médico</p>	<p>Sensación picante con dolor en los ojos. Inflamación de párpados.</p>

<p>DISOLVENTES HALOGENADOS</p> <p>TODOS LOS CLORADOS, YODADOS, FLUORADOS, ETCETERA.</p>	<p>Irritación leve en ojos y nariz, cabeza caliente, excitabilidad, "borrachera," falta de coordinación, dolor de cabeza.</p>	<p>Irritación gástrica, Los mismos síntomas que en inhalación</p>	<p>Lavar el área afectada con agua y jabón neutro, secar con toallas de papel, evacuar el área, llamar al médico.</p>	<p>Vapores molestos y salpicados: Ojos irritados, dolorosos y llorosos, inflamación de párpados</p>
<p>COMPUESTOS DE BARIO:</p> <p>CROMATO DE BARIO BERILATO DE BARIO CARBONATO DE BARIO PERSULFATO DE BARIO, ETC.</p>	<p>Compuestos que irritan la nariz y ojos, fibrilación muscular, fatiga, cólicos, sudor frío y pulso lento.</p>	<p>Sensación de sabor desagradable, fibrilación muscular, náuseas, vómito, dolor de estómago, diarrea, ansiedad, pulso lento</p>	<p>Irritación en piel, membranas y mucosas. Contacto prolongado, ulceración y necrosis en piel.</p>	<p>Irritación mecánica y química. Ojos llorosos, inflamación en párpados, sensación en párpados.</p>
<p>DERIVADOS DE ANILINA Y COLORANTES (SUSTANCIAS HEMOTÓXICAS)</p>	<p>Color profundamente azul en cara, manos y labios. Dificultad para respirar, mareo, confusión mental, debilidad y convulsiones.</p>	<p>Mismos síntomas que en inhalación, irritación de boca y estómago, cólicos con diarrea.</p>	<p>Irritación, vesículas y ampollas. Enrojecimiento, ulceración y necrosis.</p>	<p>Irritación, enrojecimiento de párpados, dolor al mirar la luz, daño severo en ojos</p>
<p>SÍLICA GEL (SÓLIDOS AMORFOS)</p> <p>SILICATO META SILICATO ORTO</p>	<p>Estornudos, ligera irritación en nariz y tos</p>	<p>No hay síntomas</p>	<p>Comezón y enrojecimiento</p>	<p>Irritación mecánica y dolor Ojos llorosos, inflamación de párpados.</p>
<p>MERCURIO Y SUS DERIVADOS</p> <p>ACETATO DE MERCURIO FOSFATO DE MERCURIO</p>	<p>Sabor metálico, dificultad para respirar, tos, bronquitis seguida de neumonía química, riesgo de fluidos en los pulmones, inflamación de la boca.</p>	<p>Sabor metálico, sed intensa, dolor al tragar, dolor estomacal o abdominal, náuseas y vómito, diarrea con sangre vercosa.</p>	<p>Irritación, inflamación y ampollas.</p>	<p>Irritación, ojos llorosos, inflamación de párpados, En caso de no atención, lesiones graves.</p>

<p>SALES ALCALINAS O BÁSICAS</p> <p>HIDROXIDOS DE: COBRE MERCURIO CADMIO Y ZINC</p>	<p>Irritación en nariz, Garganta y ojos. Sensación de quemadura, dificultad para respirar, tos, neumonía química, y fluido en pulmones.</p>	<p>Sensación inmediata de quemadura en boca, garganta y estomago, daño en membranas bucales. Dolor al tragar, salivación profusa, náuseas, cólicos.</p>	<p>Comezón, quemadura dolorosa, ulceración dolorosa, piel resbalosa, estado de shock, sudor frío.</p>	<p>Irritación muy dolorosa de ojos y párpados, lagrimeo intenso, cierre de ojos con fuerza, quemadura de membranas y mucosas.</p>
<p>FÓSFORO Y ANTIMONIO</p> <p>ANTIAMONIATO ORTO ANTIAMONIANO PIRO</p>	<p>Dolor de cabeza, mareo, náuseas, fatiga. Dificultad para respirar, palidez, tos seca, sudor frío y dolor abdominal.</p>	<p>Mismos síntomas que en inhalación. Irritación de boca y garganta. Dolores quemantes en el estomago, náuseas, vomito y diarrea.</p>	<p>Irritación dolorosa, inflamación, ampollas y ulceración rápida en piel.</p>	<p>Irritación inmediata en ojos, lagrimeo, sensación de quemadura, riesgo de daño severo.</p>
<p>SALES DE PLOMO</p> <p>SULFATO DE PLOMO PERSULFATO DE PLOMO, ETC.</p>	<p>Irritación en nariz y ojos. Dolor de cabeza, cólicos, fatiga, mareo, confusión.</p>	<p>Sabor metálico, constricción de garganta, dolor estomacal, náuseas. Vomito y diarrea.</p>	<p>Irritación e inflamación</p>	<p>Irritación, enrojecimiento, lagrimeo, inflamación de párpados.</p>
<p>CIANUROS</p> <p>CIANURO Y SULFOCIANUROS</p>	<p>Llamar a la ambulancia, retirar a la víctima, embeber un pañuelo con Amil nitrito y darlo a oler a la víctima de 3 –4 veces durante 30" seg, con intervalos de 5" seg; acostarlo y darle aire.</p>	<p>Ver inhalación, aflojar la ropa, enjuague bucal, darle agua o leche, inducirle el vomito (guardar para un análisis). No dejar solo a la víctima.</p>	<p>Compuestos gaseosos o líquidos; fase de excitación. Dolor de cabeza mareo o náuseas, vomito, respiración agitada y ansiedad.</p>	<p>Irritación y lagrimeo</p>

TRATAMIENTO GENERAL

INHALACIÓN

Aflojarle la ropa y darle aire y retirar a la víctima del área contaminada.
Si suda frío mantenerla abrigada.
Si vomita y no puede incorporarse, voltearle la cabeza para que no se ahogue.
Darle un poco de agua si así lo desea. Pedirle que tosa si no lo ha hecho espontáneamente.
Revisar su pulso cada 5 minutos; comprobar que respira. No dejar solo al paciente hasta que se le atienda.
Llamar al médico o a la ambulancia.
* Excepto para cianuros

INGESTA

Retirar a la víctima y tranquilizarla. Aflojarle la ropa y llamar al médico.
Darle de beber un baso con agua o leche.
No darle de comer o beber excepto agua o leche.
Esperar 1 ó 2 minutos e inducir el vómito con agua y café salado si no ocurre espontáneamente.
Una vez que haya vomitado darle 2 cucharaditas de carbón activado en ½ baso de agua.
Pedirle que enjuague su boca varias veces.
Mantener a la víctima en reposo y vigilarla hasta que llegue el médico.
* Excepto para cianuros, ácidos y disolventes orgánicos

DAÑO EN PIEL

En caso necesario quite cuidadosamente la ropa que interaccionó con la sustancia o quemadura.
Llamar al médico, a la enfermera, al paramédico o a la ambulancia ; según la gravedad del asunto
Limpiar muy bien el área afectada y exponer la zona a la regadera o al chorro del agua durante 15 minutos.
No aplique pomadas, ungüentos, ni ácido tánico.
Si se producen ampollas no las reviente
Secar el área afectada y cubrirla con una gasa seca y estéril.
Vestir al paciente con ropa limpia y seca no dejar sola a la víctima hasta que sea atendida por un médico.
* Excepto para disolventes halogenados y orgánicos.

DAÑO EN OJOS

Mantener al chorro del agua el área afectada durante 15 minutos o más y llamar al médico, paramédico, enfermera o ambulancia.
Pedir a la víctima que se siente y coloque la cabeza hacia atrás.
No permitir al paciente que se talle los ojos, ni aplicar colirios.
Evitar que cierre los ojos en forma continua.
En caso de que no se tolere la luz, proteja le los ojos con un pañuelo (flojo), pidiendo que parpadee de vez en cuando.
Tranquilece al paciente y no deje al paciente hasta que reciba ayuda de un médico.

TRATAMIENTOS ESPECIALES DE SEGURIDAD URGENTE

QUEMADURAS POR FUEGO U OBJETOS CALIENTES

Al ser quemaduras pequeñas se deberá poner soluciones diluidas de ácido pícrico, vaselina esterilizada, linimento oleocalcáreo o tanino al 5%; vendar con gasa sin apretar demasiado.

QUEMADURAS CON BROMO, FOSFORO Y ÁCIDOS

Se debe lavar con agua abundante y agregar con una gasa una solución de bicarbonato de sodio al 5% ligeramente. Si acaso se debe recubrir la quemadura con vaselina esterilizada o ácido pícrico diluido o la solución de tanino al 5%.

En caso de que la quemadura sea ocasionada por bromo, se debe humedecer rápidamente con solución concentrada de tiosulfato sódico y lavar después al chorro de agua.

QUEMADURAS CON METALES ALCALINOS Y ALCALIS EN GENERAL

Lavar al chorro de agua y después agregue una solución acuosa de ácido acético al 5%. Después ponga alguno de los preparados antes indicados y vende rápidamente.

SALPICADURAS CON AGENTES CAUSTICOS EN OJOS

Lavar al chorro de agua abundante, después lave con una solución de bicarbonato de sodio al 5% por último ponga un colirio calmante.

Al tratarse de álcalis, lave al chorro de agua abundante y después agregue una solución de ácido bórico al 5% y ponga un colirio

INTOXICACIONES POR INGESTA O POR INHALACIÓN

En primera instancia haga respirar aire puro y si es necesario aplique respiración artificial durante varias horas.

Las intoxicaciones dadas por ingesta se tratan con eméticos (vomitivos), a excepción de cuando se trata de álcalis cáusticos o ácidos minerales:

Ácido acético.- Emético, óxido de magnesio y leche de magnesio.

Ácidos (sulfúrico, clorhídrico y fosfórico).- No use eméticos por ningún motivo, de en su lugar leche de magnesia a ciertos periodos y luego leche o clara de huevo.

Hidróxidos de sodio y potasa.- No use eméticos por ningún motivo, de en su lugar a beber soluciones de ácido acético al 5%, o vinagre comercial o jugo de limón y después leche o clara de huevo.

Compuestos de mercurio, plomo, bario y arsénico.- De un emético y enseguida del vómito, administre 500ml de una solución de tiosulfato de sodio al 1%; después de leche o clara de huevo

Cianuros.- ¡Actúe rápidamente!, De respiración artificial, suministre un emético y de a beber después, 300ml de agua que contenga 10 ml de peróxido de hidrógeno al 3% o sulfato ferroso al 5% seguida de bicarbonato de sodio al 5%. Rápidamente embeber un pañuelo con Amil nitrito y darlo a oler a la víctima de 3 –4 veces durante 30 segundos, con intervalos de 5 seg; acostarlo y darle aire.

2 Preparaciones del Antídoto Universal:

2 partes de pan quemado

3 Partes de carbón activado

1 parte de leche de magnesia

1 parte de oxido de magnesia

Una parte de the fuerte (the negro)

1parte de ácido tánico en agua 1:1

El pan quemado o el carbón activado dan la fuente de carbón que absorbe los venenos, la leche de magnesia proporciona una fuente de oxidantes que proporciona en efecto calmante a las membranas y mucosas del sistema digestivo, y una acción laxante que neutraliza a los venenos ácidos; y el the fuerte proporciona una fuente concentrada de ácido tánico que neutraliza a las sustancias álcalis cáusticas.

ESTÁNDARES DE SEGURIDAD PARA UN LABORATORIO ESCOLAR

- Bata, goggles, guantes cubre bocas, cofia, babero, zapato antiderrapante.
- Manual de primeros auxilios
- Botiquín de primeros auxilios
- Regadera de seguridad
- Manta de asbesto
- Extinguidor
- Directorio con los teléfonos de emergencia de la zona
- Reglamento interno muy preciso (lámina y copias)
- Letreros de seguridad
- Registro de prácticas (Entradas programadas con material, reactivos y equipos utilizados)
- Bitácora de entradas extra ordinarias
- Plano del laboratorio escolar con ubicación de ductos, llaves de paso, lugares de riesgo (letreros de seguridad) y codificación de instalaciones:

Gas--- Amarillo

Luz---Rojo

Agua---Azul

Drenaje---Negro

Ventilación-----Blanco

Estándares de seguridad---Verde

- Papeletas de préstamo de material, equipo y reactivos
- Reporte de instalaciones por periodos
- Reporte de deudores de material
- En caso de tener un grupo científico, formar un expediente personal con proyecto de trabajo

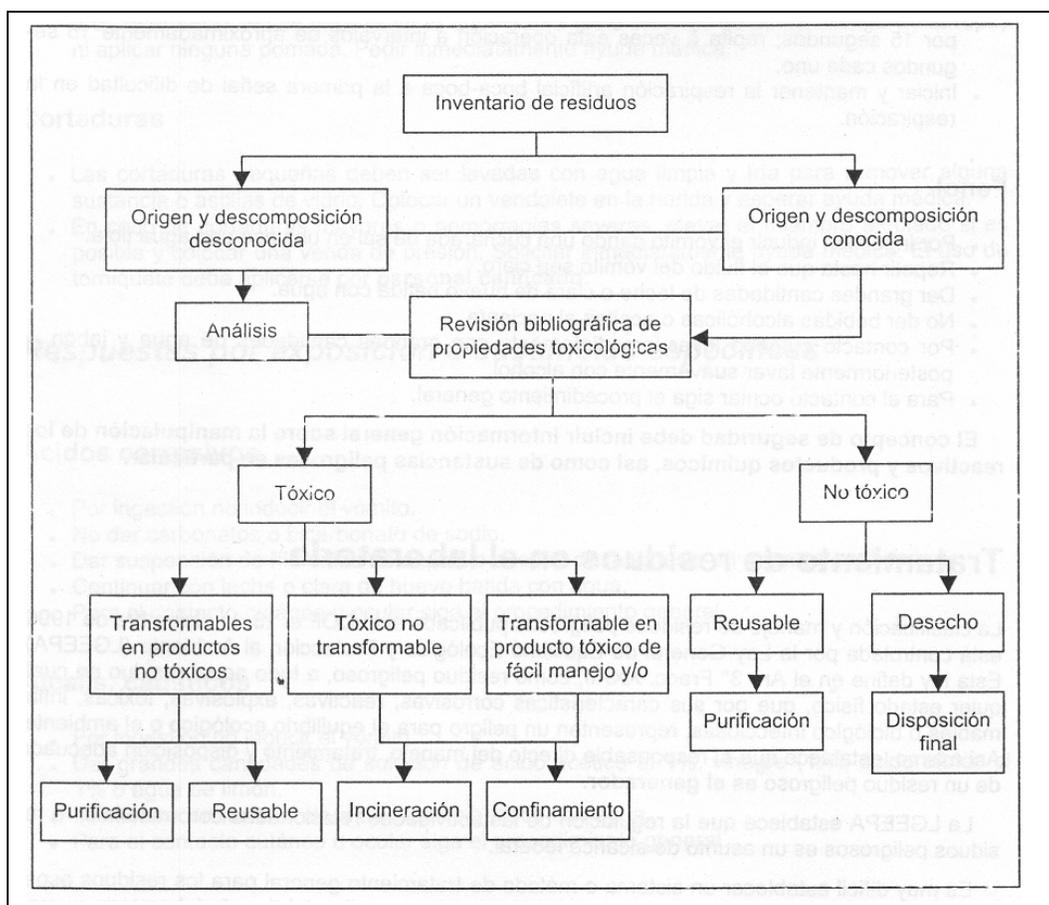
BOTIQUÍN DE PRIMEROS AUXILIOS (USO EXCLUSIVO DEL LABORATORIO)

1 kg. Carbón activado	10 Sobres de The Negro y 10 de manzanilla
2- 5 Frascos Leche de magnesia	Solución de quitosan (caparazón decrustaceos)
Frascos de Amil Nitrito	15 Sobres de gasas
1-3 Tepezcohuite en polvo o en unguento	500 ml de agua Oxigenada
1 Kg. Bicarbonato de Sodio	3-5 Carretes de cinta para gasas
Vinagre comercial	1 Galón de agua de garrafón
500 ml de Solución de cloruro de benzalconio al 1%	1 Paquete de algodón grande
2 Frascos de mertiolate blanco	1 Tijeras
1 Antídoto Universal *Ver preparación	5 Vendas triangulares
2 Frascos de merteolate rojo	5 Paquetes de vendas largas (de 10 cms. de ancho)
2-3 Tubos de ungüento de picrato compuesto	2 Goteros con colirio y 2 lavajojos
2-3 Frascos de Isodine Tópico	1 Frasco de solución de ácido bórico al 5%
2-3 Tubos de vitacilina	1 Frasco de solución de ácido tánico al 5%
2 Frascos violeta de genciana	1 Frasco de solución de de ácido pícrico
2-3 Tubos de vaselina estéril	1 Frasco con ácido acético al 5%, o vinagre comercial
500 ml de etanol al 96%	500ml de una solución de tiosulfato de sodio al 1%

REACTIVOS CARCINOGENICOS AVILA. Z.

Sulfato de metilo	Diazometano
Azirdina	Yoduro de metilo
Diclorometiléter	Hidrazina
Fenilhidracina	Acrilonitrilo
4-aminobifenilo	2-naftilamina
2-nitronaftaleno	Benceno
Tricloroetileno	Etilenamina
3,4-benzopireno	Nitrito de sodio
Berilio y sus compuestos	Aminonaftol
N,N-dimetilnitrosamina	Cromatos
Níquel y sus compuestos	Cloruro de vinilo
Cadmio y sus compuestos	Sales de arsénico

TRATAMIENTO DE REACTIVOS AVILA. Z.



INCOMPATIBILIDAD DE REACTIVOS AVILA. Z.

A	B
Ácidos	Bases
Metales alcalinos y alcalino térreos	Agua
Carburos	Ácidos
Hidruros	Compuestos orgánicos halogenados
Hidróxidos	Agentes oxidantes
Óxidos	Cromatos, dicromatos
Peróxidos	Halógenos, nitratos
Cianuros inorgánicos	Ácidos, bases fuertes
Nitratos inorgánicos	Ácidos, metales, nitritos
Nitritos inorgánicos	Ácidos, agentes oxidantes
Sulfuros inorgánicos	Ácidos
Compuestos orgánicos	Agentes oxidantes
Acilhaluros	Bases
Anhídridos orgánicos	Bases
Compuestos halogenados	Aluminio (metal)
Compuestos nitro	Bases fuertes
Metales en polvo	Ácidos, agentes oxidantes
Acetileno	Halógenos
Amoníaco, hidróxido de amonio	Agentes halogenantes, plata, mercurio
Peróxido de hidrogeno	Sales metálicas, y metales
Ácido nítrico	Metales, ac. sulfurico, reductores, permanganatos, cromatos
Mercurio	Amoníaco, hidróxido de amonio, ac. nítrico
Ácido sulfúrico, percloratos, permanganatos	Metales, cloratos, ac. nítrico

NATURALEZA DE LOS REACTIVOS Y SU CLASIFICACIÓN

Cabe aclarar que dependerá de la bibliografía que se consulte, ya que algunas citan 7 clasificaciones, por ejemplo:

EXPLOSIVO.- En determinadas condiciones ambientales tales como... puede producir una explosión.

CORBURENTE.- Puede inducir la combustión de ciertas sustancias tales como...

FLAMABLE.- En condiciones especiales de luz, flama directa u otra fuente de calor que proporcione una temperatura mayor o igual a... puede arder fácilmente.

CORROSIVO O IRRITANTE.- El contacto directo con algunos materiales sintéticos, metales corrientes, otros materiales y el organismo, pueden provocar su corrosión.

REACTANTE.- El contacto directo de éstos materiales con otros reactivos tales como... Puede producir reacciones y / o derivados nocivos, tales como...

VENENOSOS.- Su ingesta, inhalación, o contacto directo de tales reactivos como... Pueden producir la muerte a corto o a largo plazo.

TÓXICO O NOCIVO.- Su manejo, contacto, inhalación o ingesta pueden producir daños severos al organismo.

REACTIVO HIGROSCÓPICO.- Son aquellos que absorben humedad del medio ambiente.

REACTIVO FOTOSENSIBLE.- Son aquellos que sufren cambios con la incidencia de la luz directa.

REACTIVO TERMOLABIL.- Son aquellas sustancias que sufren cambios con la mínima variación de temperatura.

REACTIVO AEROSENSIBLES.- Son aquellas sustancias que sufren cambios con el aire directo.

REACTIVO BIOSENSIBLE.- Son aquellas sustancias que sufren descomposición o cambios con los microorganismos del medio ambiente.

*Checar ejemplos en la tabla “Características de las sustancias”

SISTEMA BAKER SAF – T - DATA

Sistema BAKER SAF-T-DATA™

Para ayudar a tener un mayor conocimiento sobre prácticas vitales de seguridad y salud, en las siguientes etiquetas de J.T. Baker, aparece una advertencia fácil de entender. Usando como guía el sistema BAKER-SAF-T-DATA^{MR} usted podrá rápidamente aprender el riesgo que cada sustancia representa para su salud y seguridad, el equipo de protección personal para laboratorio que debe ser usado para el manejo, y el almacenaje recomendado de productos compatibles por el código de color.

A **Clave Numérica de Riesgo**

0	1	2	3	4
*Nulo	Ligero	Moderado	Severo	Extremo

Las sustancias están calificadas en una escala de 0 (no peligrosas) a 4 (extremadamente peligrosas) en cada una de las 4 categorías de riesgo:

* No hay información científica que sugiere peligrosidad.

Categorías de Riesgos

Riesgo para la salud-El peligro o efecto tóxico que produce una sustancia al ser inhalada, ingerida o absorbida, incluyendo efectos en los procesos reproductivos de animales o humanos.

Riesgo de flamabilidad-La tendencia de la sustancia a incendiarse.

Riesgo de reactividad-El potencial de una sustancia para explotar o reaccionar violentamente con el aire, agua u otras sustancias.

Riesgo de contacto-El peligro que una sustancia presenta cuando es expuesta en la piel, ojos y membranas mucosas.

Símbolos de advertencia

Una sustancia clasificada en 3 ó 4 en cualquier categoría de peligro, mostrará también un símbolo de advertencia. Estos pictogramas fáciles de entender enfatizan los peligros relacionados a la sustancia.

SALUD				
	veneno	cancer	Riesgo de vida	radioactivo
FLAMABILIDAD		CONTACTO		
	material inflamable		corrosivo	Riesgo de vida
REACTIVIDAD				
	explosivo	oxidante	reactivo con agua	reactivo con aire

B Equipo de Protección para Laboratorio

Esta serie de pictogramas sugiere la indumentaria de protección personal y equipo para su uso cuando se maneja la sustancia en una práctica de laboratorio. Los pictogramas se refieren a la combinación de peligros representados por la sustancia.



La señal de ALTO indica que la sustancia representa un riesgo extremo y la MSDS* y otras referencias deben consultarse antes de su manejo.

*Material Safety Data Sheet

C Código de Colores para Almacenaje

La etiqueta SAF-T-DATA^{MR} sugiere un singular método para establecer su área de almacenaje químico. Los productos compatibles son etiquetados con el mismo color. Simplemente agrupando todos estos colores juntos y seguir las recomendaciones para el almacenaje apropiado:

- AZUL:** Riesgo de salud. Almacenar en un área libre de tóxicos.
- ROJO:** Riesgo de inflamabilidad. Almacenar en un área de líquidos inflamables.
- AMARILLO:** Riesgo de reactividad. Almacenar separadamente y a distancia de materiales combustibles ó inflamables.
- BLANCO:** Riesgo al contacto. Almacenar en un área a prueba de corrosivos.
- NARANJA:** Sustancias con una clasificación no mayor de 2 en ninguna categoría de riesgo. Almacenar en un área general de químicos.

Etiquetas rayadas: Los materiales no compatibles con el mismo color tienen etiquetas rayadas. Estos productos aproximadamente 40 No deben ser almacenados junto a sustancias con etiquetas del mismo color. Un almacén apropiado deberá asignarse individualmente.

D Clave de Control para Derrames

Esto indica cuál es el equipo adecuado para Control de derrames de J.T. Baker para usarse con la sustancia.

E NFPA Sistema

Este sistema fue adoptado por la NFPA* en 1975 para salvaguardar la vida de los bomberos. Está basado en los peligros originados por una sustancia en un incendio. Por esta razón, las clasificaciones de riesgo en el sistema SAF-T-DATA^{MR}, aunque están basados en una práctica de laboratorio, no siempre corresponden con la clasificación de la NFPA.



Los rombos del diamante se utilizan para indicar la escala de riesgo para cada categoría. El rombo izquierdo para riesgos a la salud, el superior para inflamabilidad y el derecho para reactividad. El rombo inferior se utiliza para indicaciones especiales de riesgo.

*National Fire Protection Association.

Información de Riesgos

Las etiquetas de J.T. Baker proporcionan información adicional de precauciones de riesgos que se deben considerar, como: primeros auxilios y así como símbolos de precaución, reconocidos internacionalmente.

SAF-T-DATATM AND BAKER ANALYZED® son marcas registradas de Mallinckrodt Baker, Inc.



Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc (55320)



¡PELIGRO!

Acetona

EXTREMADAMENTE INFLAMABLE. DAÑO SI SE INGIERE O INHALA. CAUSA IRRITACION EN PIEL, OJOS Y TRACTO RESPIRATORIO. AFECTA EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. Mantenga alejado de calor, chispas o flama. Guarde en recipiente bien cerrado. Use con ventilación adecuada. Lávese perfectamente después de manejarlo. Evite respirar los vapores. Evite contacto con los ojos, piel, o ropa. Use con ventilación adecuada. PROCEDIMIENTO DE EMERGENCIA Y PRIMEROS AUXILIOS. Si se ingiere, NO provoque el vómito. Administre grandes cantidades de agua o leche si se puede. Nunca administre algo por la boca a una persona inconsciente. Si se inhala, lleve a la persona al aire fresco. Si no respira administre respiración artificial. Si respira con dificultad, dele oxígeno. En caso de contacto con la piel, lave con agua en abundancia durante 15 minutos. En caso de contacto con los ojos, lávelos inmediatamente con agua en abundancia durante 15 minutos. En cualquier caso llame a un médico.

Acetone

DANGER!

EXTREMELY FLAMMABLE. HARMFUL IF SWALLOWED OR INHALED. CAUSES IRRITATION TO SKIN, EYES AND RESPIRATORY TRACT. AFFECTS CENTRAL NERVOUS SYSTEM. Keep away from heat, sparks and flame. Keeps container closed. Use with adequate ventilation. Wash thoroughly after handling. Avoid breathing vapor. Avoid contact with eyes, skin and clothing. EMERGENCY AND FIRST AID PROCEDURES CALL A PHYSICIAN. If swallowed, DO NOT induce vomiting. Give large quantities of water or milk if available. Never give anything by mouth to an unconscious person. If inhaled, remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen. In case of contact, immediately flush skin with plenty of water for at least 15 minutes. In case of eye contact, immediately flush with plenty of water for at least 15 minutes. In all cases call a physician.



+44809060324
+SL104864*

J.T. Baker

4L
Acetona
Acetone
Acetona

9006-03

REACTIVO BAKER® A.C.S.

(CH₃)₂CO P.M. 58.08
ANÁLISIS REAL, LOTE L 33477

Cumple Especificaciones ACS

Ensayo (CH ₃) ₂ CO (por CG, Correg. por H ₂ O)	99.5%
Color (ALPHA)	<10
Solubilidad en H ₂ O	Pasa Prueba
Residuo después de la Evaporación	0.0006 %
Acido Titulable (µeq/g)	0.25
Base Titulable (µeq/g)	0.06
Aldehidos (como HCHO)	0.002%
Alcohol Isopropilico (CH ₃ CHOHCH ₃) (por CG)	0.05%
Metanol (CH ₃ OH) (por CG)	0.05%
Substancias Reductoras de Permanganato Pasa Prueba	
Humedad (por K.F., volumétrico)	0.5%
Cobre (Cu)	0.1 ppm
Metales Pesados (como Pb)	1 ppm
Hierro (Fe)	0.1 ppm
Niquel (Ni)	0.1 ppm

Densidad (g/ml) a 25 °C (típico)	0.7857
Acetona	CAS No. 67-64-1
Agua	CAS No. 7732-18-5

Sistema BAKER SAF-T-DATA®

SALUD	INFLAMABLE	REACTIVIDAD	CONTACTO
1	4	2	1
LIGERO	SEVERO	MODERADO	LIGERO

EQUIPO DE PROTECCION DE LABORATORIO

LENTES DE OJOS BATA DE LAB. CAMPAÑA DE PROTECCION VENTILACION APROPIADA EXTRA GLOVES
ALMACENAR EN AREA COLOR ROJO

ORGANOS QUE AFECTA: Sistema respiratorio, pulmón, boca, piel y sistema nervioso central.
NOMBRE COMUN: Acetona
FLASH POINT: -18°C (0°F) (Tapa Cerrada)
J.T. Baker SCLUSCRB® es recomendado para control de derrames de este producto
Empacado bajo Nitrógeno.

UN 1090
CAS NO: 67-64-1

HECHO EN MEXICO



NFPA

J.T. Baker
Una división de Mallinckrodt Baker, Inc.
Xalostoc, 55320, Edo. de Mex., México
(5) 5691100 Fax (5) 7552978



A
B
C
D
E
F

CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS

SUSTANCIAS TÓXICAS, NOCIVAS O VENENOSAS (AZUL)	SUSTANCIAS FLAMABLES O CORBURENTES (ROJO)	SUSTANCIAS OXIDANTES Y/ O EXPLOSIVAS (AMARILLO)	SUSTANCIAS CORROSIVAS O IRRITANTES (BLANCO)	SUSTANCIAS SIN PROBLEMAS DE ALMACEN (VERDE)
Anilina Óxido de calcio Tetracloruro de carbono Acetato de plomo Sulfato de plomo Mercurio Óxido de mercurio Nicotina Cromato de potasio Cloruro de cinc	Acetona Etanol Metanol Magnesio metálico Éter de petróleo Sodio metálico Disoluciones de tinción Disoluciones de indicador universal Éter etílico	Nitrate de: Amonio, aluminio, mercurio, plata, potasio, etc. Permanganato de potasio Peroxido de sodio Agua oxigenada Dicromato de potasio Yodato de sodio Ácido Nítrico	Ácido acético Amoniaco Agua clorada Hidróxido de sodio (sosa) Ácido sulfúrico Hidróxido de amonio Ácido clorhídrico(muriático)	Aluminio Cobre Hierro Ácido ascórbico Ácido cítrico Bicarbonato de sodio Cloruro de amonio

MEDIDAS ESTÁNDAR

1 Atmósfera = 76.2 cm de Hg a 16.6°C \equiv 1.035 kg / cm²

1 m de agua a 16.6°C = 0.1 kg / cm²

1 mol = Número de abogadro = 6.022×10^{-13}

R = Constante de los gases 2.43×10^{-5} kcal cm⁻¹ atm⁻¹

T = Temperatura Estandar = 25°C a 1 atm.

VALORES CALORICOS.

1cal = 4.2 julios = 1 N.m = 1Kg (m / s)²

Es una unidad de energía. Se define como la cantidad de energía requerida para elevar la temperatura de un gramo de agua aun grado centígrado. Dado que la capacidad térmica del agua cambia con la temperatura, esta definición no es precisa. La caloría básica o termoquímica (cal_{TH} real es). La tabla internacional de calorías se define como 4. 1864 julios.

La unidad básica utilizada por los nutriólogos debe ser la kilocaloría (kcal), por lo tanto el factor de conversión es: 1 kcal = 4. 1864 kj.

¡Nota! Al calcular el valor energético de las biomoléculas de importancia en la dieta, se ignora deliberadamente la contribución, si es que existe, de otros azúcares como la celulosa y el de otros ácidos orgánicos, así como el del gasto energético que realiza el metabolismo en su mismo proceso.

Por lo tanto, los factores de conversión de la energía metabólica son objeto de investigación y de controversia.

El país de Inglaterra recomienda un factor de conversión de 3.75 kcal para el carbohidrato utilizable (monosacárido). Entonces el valor calórico se calcula como sigue.

Valor calórico total (kcal x 100g) =

P x 4.0 (calorías de la proteína)+

F x 9.0 (calorías de la grasa) +

C X 3.75 (calorías del carbohidrato)

En donde

P = contenido proteico en %

F = contenido de grasa en %

C = contenido de carbohidrato utilizable en %

Biomolécula	Factor de conversión (kcal / g)	Factor de conversión (kjulios / g)
Monosacárido	3.75	16
Almidón	4.1	-
Sacarosa	3.9	-
Glucosa y fructuosa	3.75	16
Alcohol	7.0	29
Lípido	9.0	37
Proteína	4.0	37

Por lo tanto tenemos que:
 Valor calórico total (kj x 100g) =
 P x 17 (julios de la proteína)+
 F x 37 (julios de la grasa) +
 C X 16 (julios del carbohidrato)

En donde
 P = contenido proteico en %
 F = contenido de grasa en %
 C = contenido de carbohidrato utilizable en %

¡Nota! Los valores dados en la tabla son los propuestos por el U.K.Ministryofagriculture, Fisheries & Food. Food Standards Comité (October 1976)

ULTRACENTRIFUGACIÓN

1 Catal = Se usa para medir velocidad de reacción enzimática en un sistema analítico a condiciones dadas.

1 Catal = 1 mol / seg.

Dalton = Unidad de masa molar en gramos.

Dalton = Masa Molar (gramos) / 1 mol de la molécula de la proteína o ácido nucleico en cuestión, por lo tanto

Dalton = M.M. Relativa / $1/12$ Parte de un átomo de carbono (solo en éste caso es adimensional)

M = Masa molecular Conocida (para proteínas globulares) \equiv 6000 como constante

$M = (6000) \times S^{3/2} = \text{Daltons}$

Por ejemplo: Se desea saber el peso molecular del quimiotripsinogeno, en donde $S = 2.54$

$M = (6000) \times S^{3/2}$

$M = (6000) \times (2.54^{1.5}) = 24, 288 \text{ Daltons} = 24. 288 \text{ Kd} = 24, 288 \text{ g/mol}$

S = Unidad de sedimentación para proteínas, ácidos nucleicos y organelos

$S = 1 \text{ Svedberg} = 10^{-13} \text{ seg.}$ Una biomolécula tiene un rango que va del 1 S – 200 S.

$xg = \text{Fuerza gravitacional, } 1xg = \text{Una gravedad} = 980 \text{ cm / seg.}$

G = Campo centrifugo, en donde

$\omega = \text{Velocidad angular en radianes / seg. De la centrifuga}$

$r = \text{distancia radial en cm. De la centrifuga} = \text{r.p.m.}$

$\omega = 2\pi (\text{r.p.m.}) / 60 \text{ para campo centrifugo} \quad \omega = (r / 60) (2 \pi) \text{ para S}$

$$G = \omega^2 r$$

$$G = 4 \pi^2 (\text{r.p.m.})^2 r / 3600$$

CCR = Campo Centrifugo Relativo

$CCR = 4 \pi^2 (\text{r.p.m.})^2 r / 3600 \times 980$

Simplificando decimos que:

$CCR = 1.11 \times 10^{-5} (\text{r.p.m.})^2 r$

Fuentes de Consulta para Artículos

A. Hiller, J. Plazin y D. D. Van Slyke, J. Biol. Chem. 176 1401 (1948) véase también P. L. Kirk, Anal. Chem 22 354 (1950).

A.G. Gornall, C. J. Bardawill y M. M. David, J. Biol. Chem. 177 757 (1949).

O. H. Lowry y col. J. Biol. Chem 193. 265 (1951).

P.L. Kirk, Advances in Protein chemistry 3 139 (1947).

O. Warburg y W. Christian, Biochim, Z. 310 384 (1941).

J. B. Murphy y M. W. Kies, Biochem. Biophys. Acta 45 382 (1960).

E. A. Kabat y N. Mayer, Experimental Immunochemistry, C. C. Thomas Co., Springfield, Ill., 1961.

G. E. Perlman y L. G. Longworth, J. Am. Chem. Soc. 70 2719 (1948).

*Cohen, E. J., and Edsall, J. T. Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and dipolar ions. Reinhold Publishing Corp., New York, 1943.

Edsall, J. T., and Wyman, J. Biophysical Chemistry. Academic Press Inc., New York. 1958.

Colowick, S. P., and Kaplan, N.O. (Eds.) Methods in Enzimology. Academic Press Inc., New York, 1955.

Sherage, H. Protein Structure. Academic Press Inc., New York. 1961.

Laboratory Manual of Physiological chemistry. Department of Physiological Chemistry, Johns Hopkins University Baltimore, 1957.

Kleiner, I. S., and Dotti, L. B. Laboratory Instructions in Biochemistry. C. V. Mosby Co., St. Louis. 1966.

Carter, H. E., et al. (Eds.) Biochemical Preparations (in 12 Volumes). John Wiley and Sons, Inc., New York, 1949 – 68.

Daniel, L. J., and Leslie, N. A. Laboratory Experiments in Biochemistry, Academic Press Inc., New York, 1966.

Neurath, H., and Bailey, K. The proteins (in two volumes). Academic Press Inc., 1953 – 54.

Alexander, P., and block R. J. Laboratory Manual of analytical Methods in protein chemistry. Pergamon Pres, Long Island City. N. Y. 1960.

Fuentes de Consulta Bibliográfica

- 1.-ANGELES. O. Glafira, 1998, “Prácticas de química 1 -2 Enseñanza Media superior”, 2^a/e^d, Ed. Publicaciones culturales, México D.F.
- 2.-ANGELES. O. Glafira, 1998, “Prácticas de química 3 -4 Enseñanza Media superior”, 5^a/e^d, Ed. Publicaciones culturales, México D.F.
- 3.-ANGEL. G. M., 1997, “Diccionario del laboratorio clínico”, 2^a/e^d, Ed. Panamericana, Bogota Colombia.
- 4.-ASHBY. J. F., 1998, “Principios de química biológica”, Ed. Acribia, Barcelona España.
- 5.-AUDESIRK. Tera y Gerard, 1996, “Biología 1 Unidad en la diversidad”, 4^a/e^d, Ed. Printice Hall, Denver E.E. U.U.
- 6.-AVILA, Z. José Gustavo. et.al., 2001, “Química orgánica experimental con un enfoque ecológico”, Ed. Dirección general de publicaciones y fomento editorial UNAM, México D.F.
- 7.-BADUI. Salvador., 1993, “Química de los alimentos”, 3^a/e^d, Ed. Pearson Educación México D.F.
- 8.-DR. BARKER. B. y DR. GARCÍA. R. J. L., 1975, “Química Orgánica de los compuestos Biológicos”, Ed, Alhambra, Barcelona España.
- 9.-BARRAL. T. Adela. et.al., 1988, “¿Eso es química?”, Biblioteca de recursos didácticos, Ed. Alhambra, México D. F.
- 10.-BENSON Sydney. W., 1983, “Cálculos químicos, una introducción al uso de las matemáticas en la química”, 10^a/e^d, Ed. Limusa, México. D.F.
- 11.-BEST & TAYLOR., 1990, “Bases Fisiológicas de la Práctica Médica”, 11^a/e^d Ed. Médico - Panamericana, Argentina.
- 12.-BREWSTER. Q. Ray., 1978, “Curso de Química Orgánica Experimental”, Ed. Alhambra, Barcelona España.
- 13.-BRUCE Albert y DENIS Bray, et. al., 2002, “Biología Molecular de la Célula”, 3^a/e^d, Ed.Omega, Barcelona España.
- 14.-BRIAN. F. C., 1979, “El Código Genético”, Ed. Omega, Barcelona España.
- 15.-BURTON. Zachary. F. 1997, “Experiments in Molecular Biology: Biochemical Applications, Ed, Academic Press, EUA.
- 16.-CAMPOS. G. y DELGADO. N. L., 1993, “Manual de Bioquímica Celular”, Ed. FESC – UNAM, México.

- 17.-CHAPMAN. D., 1973, “Lípidos”, Ed. Alhambra, Barcelona España.
- 18.-CLARK. F. C. 1997, “El código Genético”, Ed. Omega, España.
- 19.-COHEN. Yves y PRADEAU. Dominique, 1998, “Análisis Químicos Farmacéuticos de medicamentos”, Ed. UTHEA NORTEGA EDITORES, México.
- 20.-CONN. Eric., 2002, “Bioquímica Fundamental”, 4^a/e^d, Ed. Limusa, México. D.F.
- 21.-CONNORS. Kenneth. 1980, “Curso de Análisis Farmacéutico, Ensayo del Medicamento”, 2^a/e^d, Ed. REVERTE, Barcelona España.
- 22.-COOK. H. C. 1976, “Mucinas de los Tejidos Humanos”, Ed, Manual Moderno, México.
- 23.-CÓRDOVA, F. José Luís, 1997, “La química y la cocina, colección la ciencia para todos”, 2^a/e^d, Ed. Fondo de Cultura Económica, México. D.F.
- 24.-CRISTENSEN, 1980, “Cinética Enzimática”, Ed. REVERTE, España.
- 25.-CROLAND. P. Murice, 1988, “Estudios históricos en el Lenguaje de la Química”, Ed. UNAM, México.
- 26.-FEIGL. Fritz., 1978, “Pruebas a la gota en análisis orgánico”, 7^a/e^d, Ed. UNAM Manual Moderno, México. D.F.
- 27.-FEIGL. Fritz. , 1980, “Pruebas a la gota en análisis inorgánico”, 6^a/e^d, Ed. UNAM Manual Moderno, México. D.F.
- 28.-FENNEMA. Owen. R., 2000, “Química de los Alimentos”, 2^a/e^d, Ed. Acribia, España.
- 29.-FRANKLIN.W. 1987, “Mecánica de la Herencia”, Ed. UTHEA NORTEGA EDITORES, México.
- 30.-FRESA. Baudillo. Jusca, 1995, “Guía de la flora medicinal”, 2^a/e^d, Ed. Aedos, Barcelona España.
- DAINTITH. Jhon. 1998, “Diccionario de la química, Colección de la llave de la ciencia”, 13^a/e^d, Ed. Grupo Editorial Norma Educativa, Colombia.
- 31.-DEVLIN. T. M., 2004, “Bioquímica con aplicaciones Clínicas”, Tomos I y II., 11^a/e^d Ed. Médico - Panamericana, Argentina.
- 32.-DIAZ. Barriga. A. Sandra y BONILLA. Sánchez. Rosalía., 2001, “Técnicas Básicas en Citogenética (Elaboración y análisis en cariotipos)”, Ed, FESC – UNAM, México.
- 33.-DONALD. V, 1995, “Biochemistry”, 2^a/e^d, Ed. Jhon Wiley & Sons, E.U.A.

- 34.-DOMINGUEZ. Xorge. Alejandro, 1983, “Experimentos de química general e inorgánica”, 5^a/e^d, Ed. Limusa, México. D. F.
- 35.-DOMINGUEZ. Xorge. Alejandro, 1983, “Experimentos de Química Orgánica” 5^a/e^d, Ed. Limusa, México. D.F.
- 36.-DOMINGUEZ. Xorge. Alejandro, 1978, “Fundamentos y problemas de química Orgánica”, 3^a/e^d, Ed. Limusa, México. D.F.
- 37.-DURAND. M y P. Flavio., 1978, “La Célula Estructura y Anatomía Molecular”, 2^a/e^d, Ed. Omega, España.
- 38.-DVORKIN. Mario. A. y CARDINALLI. Daniel. P., 2003, “Bases Fisiológicas de la Práctica Médica”, 13^a/e^d, Ed. Panamericana, Argentina.
- 39.-GARRIDO. Fariño. G. Isauro, 2003, “Manual de Colorantes para Laboratorio de Ciencia Básica”, Ed. Cuautitlán – UNAM FESC, México.
- 40.-GASCA. Alberto, 1995, “Cuaderno de Laboratorio para Biología y Química”, Preparatoria Lázaro Cárdenas, Plantel Cuautitlán.
- 41.-GOMÉZ. Gómez Victor. J., 1999, “Diccionario de Mitología Griega y Romana, Dioses, Mitos y Héroeos”, Ed. Gómez Gómez Hermanos Editores. México D.F.
- 42.-HARPER. Harold. A., 2002, “Química de Harper”, 14^a/e^d, Ed. El Manual Moderno S.A., México D.F.
- 43.-HENRY Richard. J., 1980, “Química Clínica, Principios y Técnicas”, Tomo II, 2^a/e^d, Ed. JIMS, España.
- 44.-HARVEY. Lodish. et. al., 2002, “Biología Celular y Molecular”, 4^a/e^d, Ed. Panamericana, Argentina.
- 45.-HERNANDEZ. S. Roberto. et. al., 2002, “Metodología de la Investigación”, 2^a/e^d, Ed. Mc. Graw. Hill., México D.F.
- 46.-HERRERA L Leonor y PENTERES. C. J. Guillermo., 1993, “Nomenclatura Sistematizada”, Ed. UNAM – FESC, México.
- 47.-HUTON. Kenneth., 1963, “¿Qué es la Química? - Colección quiero saber...”, Ed. Novaro, México D.F.
- 48.-KARP. Gerard., 2001, “Biología Celular y molecular”, Ed. Mc. Graw. Hill., México.
- 49.-KOOLMAN. Jan y ROM. Klaus – Heinrich, 2004, “Bioquímica, Texto y Atlas” 3^a/e^d, Ed. Panamericana, Buenos Aires Argentina.
- 50.-KRUH, 1975, “Bioquímica – Estudios Médicos y Biológicos”, 2^a/e^d, Ed. Omega, Barcelona España.

- 51.-LAGUNA y PIÑA, 1990, “Bioquímica”, 4^a/e^d, Ed. Salvat, España.
- 52.-LOTAR. T., 1998, “La esencia de la Biología Molecular”, Ed. Manual Moderno, México D.F.
- 53.-LUBERT. S., 1995, “Bioquímica”, T.2, 4^a/e^d, Ed. REVERTE, Barcelona España.
- 54.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F., 1993, “Biomoléculas, lecciones de bioquímica estructural”, 3^a/e^d, Ed. REVERTE, Barcelona España.
- 55.-MACARULLA. M. J. y GONI. M. F., 2004, “bioquímica humana, curso básico”, 6^a/e^d, Ed. REVERTE, Barcelona España.
- 56.-MATISSEK. Reinhard., 1992, “Análisis de los alimentos”, 2^a/e^d, Ed. Acribia, Barcelona España.
- 57.-MELO. Ruiz Virginia., CUAMATZI. Tapia Ozcar., 2004, “Bioquímica de los Procesos Metabólicos”, Ed. REVERTE, Barcelona España.
- 58.-MERTZ. T. Edwin, 1977, “Bioquímica”, 3^a/e^d, Ed. Publicaciones culturales S.A., México D.F.
- 59.-MERTZLER. David. E., 1981, “Bioquímica, las reacciones químicas en las células vivas”, Ed. Omega, Barcelona España.
- 60.-MURRAY. Robert. K., 1998, “Bioquímica de Harper”, 4^a/e^d, Ed. Manual Moderno, México D.F.
- 61.-OCON. D., et. al., 1999, “Ciencias de la salud, Fundamentos y técnicas de análisis bioquímico”, Ed. Paraninfo, España.
- 62.-ONDARZA. N. Raúl, 1996, “Biología Moderna”, 10^a/e^d, Ed. Trillas, México.
- 63.-OSBORNE. D. R. y VOOEGT. P., 1986, “Análisis de los nutrientes de los alimentos”, Ed. Acribia, Barcelona España.
- 64.-ORTEN . Neuhaus, 1995, “Bioquímica humana”, Ed. Médico - Panamericana, México D.F.
- 65.-PEARSON. D., 1991, “Técnicas del laboratorio para el análisis de los alimentos”, 6^a/e^d, Ed. Acribia, España.
- 66.-PEÑA. D. E. y BEGOVICH. A. A., 1995, “Bioquímica”, 5^a/e^d, Ed. Limusa, México D.F.
- 67.-PESCE.J. Amadeo., 1990, “Química Clínica, Métodos”, Ed. Panamericana, Argentina.

- 68.-PONCE. Salazar. R. margarita y ANDRADE. Salas. Leticia., 2000, “Biología I, Libro de recursos para el maestro”, 3^a/e^d, Ed. Santillana, México D.F.
- 69.-PORTER. George, 1962, “Química hoy; Colección, Hay que saber”, Ed. Teide, Barcelona España.
- 70.-RENDINA. G., 1997, “Técnicas de bioquímica aplicada” Ed. Interamericana.
- 71.-RODIER. J. y MALLÉN. R., 1970, “Manual de Bioquímica Práctica – Técnicas para uso de los laboratorios de análisis clínicos”, 3^a/e^d, Ed. JIMS, Barcelona España.
- 72.-RUIZ. A. Manuel. 1992, “Bioquímica Estructural, Conceptos fundamentales y test con respuestas razonadas”, Ed. Tebar Flores, Barcelona España.
- 73.-SALAMANCA. Gómez Fabio. 1993, “Citogenética Humana, Fundamentos y Aplicaciones Clínicas”, 2^a/e^d, Ed. Panamericana, México D.F.
- 74.-SEGURA. Zamora. T. Diana., 2000, “Biología II – Libro de Recursos para el Maestro” 2^a/e^d, Ed. Santillana, México D.F.
- 75.-SILBERNAGL. F. & DESPOPOULUS A., 1985, “Atlas de Fisiología Médica”, Ed. Científica P. L. M., México D.F.
- 76.-SOBERON. A. Guillermo DR. et. al., 1988, “Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos”, 5^a/e^d, Ed. Secretaria de Salud, México.
- 77.-SOLIS. Correa. Hugo. E., 1994, “Nomenclatura Química”, Ed. Mac Graw Hill, México.
- 78.-STAHL. F. W., 1967, “Mecánica de la Herencia”, Ed. Hispanoamericana, México D.F. 5^a/e^d
- 79.-STEPHESON. 1983, “Introducción a la Bioquímica” 7^a/e^d, Ed. Limusa, México D.F.
- 80.-STRIYER. Lubert., BERG. Jeremy. M., TIMOCZKO. Jhon.L., 2003, “bioquímica”
- 81.-TEIJON. R. José. Ma. et. al., 1992, “Bioquímica Estructural”, Ed. Tabor Flores, Barcelona España.
- 82.-TIRADO. Benedi Domingo, 1998, “La enseñanza de las ciencias de la naturaleza”, 14^a/e^d, Ed. Fernandez editores S.A., México.
- 83.-TOPOREK. Milton, 1990, “Bioquímica”, 7^a/e^d, Ed. Interamericana, México.
- 84.-TREMOLIER. J, 1994, “Nutrición y Metabolismo”, Ed. EPAX, España.
- 85.-VEGA. Linda. P. 1993, “Manual de laboratorio Bioquímico para M.V.Z.”, Ed. UNAM – FESC, México.

86.-WILLIAMS. Bryan. L., 1981, “Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental”, Ed. Omega, España.

87.-WILSON. Keith y WILLIAMS L. Bryan, 1980, “Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental”, Ed. Omega, España.

88.-ZARZA. Meza., “Introducción a la Bioquímica”, 4^a/e^d, Ed. Trillas, México D.F.

Fuentes de Correo Electrónico

1.-ADN Diagnostic Center “Spiraling Through Genetic History
[http:// www.dnacenter.com/geneticshistory.html](http://www.dnacenter.com/geneticshistory.html)

2.-Genome News Network Archibald E. Garrod (1857 – 1936) postulates that genetics defects cause many inherited diseases. [http:// gnn.tigr.org/timeline/1908_garrod.shtml](http://gnn.tigr.org/timeline/1908_garrod.shtml)

3.-Gregor. The molecular Genetics virtual Tutor. Guanine
<http://gregor.rutgers.edu/DNAstructure/DNA2.html>

4.-www.Joseacortes.com/practicas/extraccionADN.htm

5.-The Medical Research Council. Laboratory of Molecular Biology. Fred Sanger – 1958.
[http:// www2.mrc – lmb.cam.ac.uk/archive/Sanger58.html](http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/archive/Sanger58.html)

6.-Transgenics Animals. [http://wwwframe.org.uk/Transenics.htm](http://www.frame.org.uk/Transenics.htm)

7.-Universidad de Murcia. Aula Virtual de Biología.
<http://www.um.es/~molecular/anuc103.htm>

8.-Universidad de Granada . Expresión de la Información Genética.
<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiología/10Micro.html>

Referencias de Tesis

- 1.-CRUZ. Dominguez Dinora, 1998, “Metodología de Investigación Documental y de las prácticas demostrativas de apoyo en la Asignatura del Paquete Terminal de Enzimas De Uso Alimentario”, Tesis I.Q., FESC – UNAM, México.
- 2.-ESCALANTE. Reynoso Gabriela, 1992, “Variación fenotípica en *Drosophila melanogaster* al ser sometida a la luz ultravioleta durante las fases de cigoto, larva y pupa”, Tesis Q.F.B., FESC – UNAM, México.
- 3.-GARCÍA. Fajardo. Luz Verónica, 2003, “DNA Recombinante: Guía Didáctica para Q.F.B.”, Tesis Q.F.B., FESC – UNAM, México.

Referencias de Revistas Científicas

- 1).-STEPHEN. J. El origen de la vida en la tierra, National geographic, vol.2, N°3, Marzo 2000.
- 2).- Dra. KOFMAN – Alfaro Susana, Q.F.B. CERVANTES Peredo Alicia et. al., Genética / Terapéutica, PAC MAG – 1, Programa de Actualización Continua para Médicos Generales, Parte B, Libro 1, 1996.
- 3).- Dr. LISKER Rubén, ¿Qué es el genoma humano?, CIENCIA, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias, vol.53, num.1, Enero – Marzo 2002.
- 4).- LAU Nelson C. & BARTEL David P, Interferencia de ARN, Investigación y Ciencia, Edición en Español de Scientific American, número 335, Octubre 2003.