

Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica



**MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA METABOLICA**

M. en P. E. Ana Margarita Arrizabalaga Reynoso
Dr. Enrique Morales Ávila
QFB. Cynthia Elena Enríquez García

Toluca de Lerdo; Estado de México. 1 de Febrero de 2018



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Facultad de Química
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica
Reestructuración, 2015



Fecha de Aprobación
20 de Septiembre de 2018
Sesión Ordinaria de los H. H. Consejo Académico y de Gobierno



INDICE

	Página
Presentación	3
Propósito general del curso	4
Introducción	5
Sistema de Evaluación	9
Reglamento de Laboratorio de la Bioquímica Metabólica	10
Programa de Prácticas de Laboratorio	12
1. Propiedades fisicoquímicas de los Lípidos	13
2. Separación de Fosfolípidos por cromatografía en capa fina	24
3. Hidrólisis enzimática de los Lípidos de la leche	34
4. Determinación de la actividad de las Transaminasas	41
5. Determinación de Urea	47
6. Extracción y purificación de Ácido Desoxirribonucleico de chícharos	52
7. Aislamiento y purificación de Ácido Ribonucleico de levadura de panificación	58
8. Determinación de Fósforo en Ácido Ribonucleico	63
Bibliografía	70
Anexos	71
Anexo núm.1 Preparación de reactivos especiales	72
Anexo núm.2 Lineamientos de Laboratorio	74
Anexo núm.3 Reglamento Interno de Laboratorios	77
Anexo núm.4 Formato del Reporte de Laboratorio	



PRESENTACION

La **BIOQUÍMICA** se define como la ciencia que estudia los fundamentos químicos de la vida (Harper, 2010). Considerando a la célula (del latín *cellula*, diminutivo de *cella*, 'hueco') como la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo; la **BIOQUÍMICA** es la ciencia de los constituyentes químicos de las células, de las reacciones y de los procesos que experimentan.

El principal objetivo de la **BIOQUÍMICA** es la comprensión, en el nivel molecular, de todos los procesos químicos relacionados con las células. Para lograr este objetivo los bioquímicos han buscado aislar las numerosas moléculas que se encuentran en las células, determinar su estructura y analizar su función.

El conocimiento de la **BIOQUÍMICA** es esencial para todas las ciencias de la vida. Por ejemplo, la **BIOQUÍMICA** de los Ácidos Nucleicos ocupa un lugar fundamental justo en el corazón de la Genética; a su vez, el uso de métodos genéticos ha sido crucial para dilucidar muchas áreas de la **BIOQUÍMICA**. La Fisiología, el estudio de la función del cuerpo, se superpone con la **BIOQUÍMICA** casi por completo. En la Inmunología se emplean muchas técnicas bioquímicas y numerosos métodos inmunológicos han encontrado amplio uso por investigadores bioquímicos. La Farmacología y la Farmacia se fundamentan en un solo conocimiento de la **BIOQUÍMICA** y de la Fisiología, en particular, casi todos los fármacos son metabolizados mediante reacciones catalizadas por Enzimas. Los venenos actúan sobre reacciones o procesos bioquímicos; lo cual representa el objeto de estudio de la Toxicología. Los métodos bioquímicos cada vez reciben un uso más amplio en la investigación relacionada con los aspectos básicos de la Patología (el estudio de la enfermedad), como la inflamación, la lesión celular y el cáncer. Muchos investigadores en Microbiología emplean métodos bioquímicos de manera casi exclusiva para la identificación de microorganismos.

Estas relaciones no sorprenden porque la vida como se le conoce depende de reacciones y procesos bioquímicos. De hecho las antiguas barreras entre las ciencias de la vida están derrumbándose y la **BIOQUÍMICA** está llegando a ser, cada vez de manera más frecuente, su lenguaje común.

Ahora bien, una relación recíproca entre la **BIOQUÍMICA** y la Medicina han estimulado avances mutuos. Las dos preocupaciones más importantes para los investigadores en las ciencias de la salud -y en particular para los médicos- son tanto el entendimiento y el mantenimiento de la salud, como la comprensión y el tratamiento efectivo de las enfermedades. La **BIOQUÍMICA** tiene enormes repercusiones sobre estas dos preocupaciones fundamentales de la medicina y del estudio de aspectos relacionados con la salud y la enfermedad (Harper, 2010).



PROPÓSITO DEL CURSO

Involucrar al estudiante en el estudio de los fenómenos bioquímicos, a través del método científico para reforzar los conocimientos de la teoría, analizando las reacciones químicas implícitas en las rutas metabólicas, de tal manera que sea capaz de aplicar y vincular conceptos para adquirir habilidades y competencias básicas dentro de un laboratorio de **BIOQUÍMICA**.

La enseñanza de la unidad de aprendizaje de **BIOQUÍMICA** se realiza empleando actividades estratégicas en donde el profesor toma un papel más directivo al inicio del curso, proporcionando un contexto de apoyo (andamiaje) amplio; a medida que aumenta la competencia del alumno en este dominio, se reduce la participación del profesor. Durante todo este proceso el alumno debe manifestar un alto nivel de compromiso en la ejecución de las actividades diseñadas en este manual.

El programa de estudios de la unidad de aprendizaje de **BIOQUÍMICA METABÓLICA** incluye la descripción de las biomoléculas como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos; los procesos metabólicos para el aprovechamiento y síntesis de los lípidos y de las proteínas, así como los mecanismos de replicación, transcripción, traducción del ADN y la participación del ARN en la síntesis de proteínas. Los contenidos fueron seleccionados para proporcionar al estudiante aprendizajes teórico – metodológicos, además de desarrollar las habilidades, actitudes y valores necesarios para proceder científicamente en el manejo de información tanto analógica (libros, revistas, publicaciones) como digital (bases de datos, internet) requeridos para su desempeño profesional como Químico Farmacéutico Biólogo acorde a lo que demanda su entorno social.

La unidad de aprendizaje de **BIOQUÍMICA METABÓLICA Y LAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO**, se ubican en el cuarto periodo escolar del Proyecto Curricular 2015 de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México y está enfocada básicamente al estudio de las propiedades y métodos de identificación de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los procedimientos aquí utilizados no son excluyentes de otros que pudieran ensayarse, los que aquí se presentan fueron elegidos con base en su factibilidad técnica, en recursos humanos y económicos, así como en tiempo, ajustándose a los objetivos que marca el programa de la unidad de aprendizaje.



INTRODUCCION

La **BIOQUÍMICA** es la ciencia que estudia las bases moleculares de la vida; por lo que se ocupa de la composición química de la materia viva, la relación estructura-función de las moléculas características de los seres vivos (biomoléculas), así como de las transformaciones químicas que se llevan a cabo en dichos organismos (metabolismo) y los mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de tales transformaciones.

La **BIOQUÍMICA** es una ciencia relativamente nueva, ya que se reconoce como tal a inicios del siglo XX y de hecho el término **BIOQUÍMICA** se empleó por vez primera en el año 1903. La **BIOQUÍMICA** ha contribuido al desarrollo de otras especialidades biológicas, particularmente las biomédicas.

Numerosos aportes de la **BIOQUÍMICA** han desempeñado un papel destacado en los logros experimentados en las ciencias médicas, entre estos la comprensión completa de las causas moleculares de numerosas enfermedades, el desarrollo de variadas técnicas para el diagnóstico, así como el fundamento para la elaboración de ciertos medicamentos en el tratamiento de determinadas afecciones son ejemplos de la aplicación directa de la **BIOQUÍMICA** a la Medicina. De ahí la importancia de su estudio para los profesionales de las ciencias médicas.

Cuadro núm. 1

Algunos usos de las investigaciones bioquímicas y pruebas de laboratorio con relación a las enfermedades

Uso	Ejemplo
Revelar las causas y los mecanismos fundamentales de enfermedades	Demostración de la naturaleza de los defectos genéticos en la fibrosis quística
Sugerir tratamientos racionales de enfermedades con base en los resultados del inciso anterior	Prescripción de una dieta con bajo contenidos de fenilalanina para el tratamiento de la fenilcetonuria
Ayudar en el diagnóstico de enfermedades específicas	Uso de las concentraciones plasmáticas de troponina I o T en el diagnóstico del infarto al miocardio
Actuar como pruebas de detección para el diagnóstico temprano de ciertas enfermedades	Uso de la medición de la tiroxina o de una hormona estimulante de la tiroides (THS) en la sangre en el diagnóstico neonatal de hipotiroidismo congénito
Ayudar a vigilar el progreso (recuperación, empeoramiento, remisión o recaída) de ciertas enfermedades	Uso de la enzima plasmática Alanina Aminotransferasa (ALT) en la vigilancia del progreso de hepatitis infecciosa
Ayudar en la evaluación de la respuesta de enfermedades a la terapia	Uso de la medición del antígeno carcinoembrionario (CEA) en la sangre en ciertos pacientes que han recibido tratamiento para cáncer de colon

Fuente: Harper, 2010.



La **BIOQUÍMICA** como una disciplina científica que aborda el estudio de las biomoléculas y los biosistemas integra de esta forma las leyes químico – físicas y la evolución biológica que afecta a los sistemas biológicos y a sus componentes. Lo hace desde un punto de vista molecular y trata de entender y aplicar su conocimiento a amplios sectores de la Medicina (terapia génica y biomedicina), la agroalimentación, la Farmacología, entre otros.

Constituye un pilar fundamental de la Biotecnología y se ha consolidado como una disciplina esencial para abordar los grandes problemas y enfermedades actuales y del futuro, tales como el cambio climático, la escasez de recursos agroalimentarios ante el aumento de la población mundial, el agotamiento de las reservas de combustibles fósiles, la aparición de nuevas alergias, el aumento del cáncer, las enfermedades genéticas, la obesidad, etc.

La **BIOQUÍMICA** es una ciencia experimental y por ello recurrirá al uso de numerosas técnicas instrumentales propias y de otros campos, pero la base de su desarrollo parte del hecho de que lo que ocurre en vivo a nivel subcelular se mantiene o se conserva tras el fraccionamiento celular y a partir de ahí poder estudiarlo y obtener conclusiones.

El pilar fundamental de la investigación de la **BIOQUÍMICA CLÁSICA** se centra en las propiedades de las proteínas, muchas de las cuales son enzimas. Sin embargo, existen otras disciplinas que se centran en las propiedades biológicas de los carbohidratos (Glucobiología) y lípidos (Lipobiología).

Por razones históricas la **BIOQUÍMICA** del metabolismo de la célula ha sido intensamente estudiada, en importantes líneas de investigación actuales (como el Proyecto Genoma Humano, cuya función es identificar y registrar todo el material genético humano), las cuales se dirigen hacia la investigación del Ácido Desoxirribonucleico, el Ácido Ribonucleico, la síntesis de proteínas, la dinámica de la membrana celular y los ciclos energéticos.

La **BIOQUÍMICA METABÓLICA** es un área de la **BIOQUÍMICA** que pretende conocer los diferentes tipos de rutas metabólicas a nivel celular y su contexto orgánico, para lo cual son esenciales conocimientos de Enzimología y Biología Celular. Esta rama de la **BIOQUÍMICA** estudia todas las reacciones bioquímicas celulares que posibilitan la vida, así como los índices bioquímicos orgánicos saludables, las bases moleculares de las



enfermedades metabólicas o los flujos de intermediarios metabólicos a nivel global.

De aquí surgen disciplinas académicas como la Bioenergética (estudio del flujo de energía en los organismos vivos), la Bioquímica Nutricional (estudio de los procesos de nutrición asociados a rutas metabólicas) y la Bioquímica Clínica (estudio de las alteraciones bioquímicas en estado de enfermedad o traumatismo). En este sentido se ha definido la **METABOLÓMICA** como el conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio completo del sistema formado por el conjunto de moléculas que constituyen los intermediarios metabólicos, metabolitos primarios y secundarios que se pueden encontrar en un sistema biológico.

Una característica del metabolismo es la similitud de las rutas metabólicas básicas incluso entre especies muy diferentes. Por ejemplo: la secuencia de pasos químicos en una vía metabólica como el Ciclo de Krebs es universal entre células vivientes tan diversas como la bacteria unicelular *Escherichia coli* y organismos pluricelulares como el elefante. Esta estructura metabólica compartida es muy probablemente el resultado de la alta eficiencia de estas rutas y de su temprana aparición en la historia evolutiva.

La unidad de aprendizaje de **BIOQUÍMICA METABÓLICA** incluye la revisión de las características de los lípidos, los cuales constituyen más del diez por ciento del peso corporal de un individuo adulto normal y aporta aproximadamente el cuarenta por ciento de las calorías de la alimentación diaria, en promedio. Los lípidos se consideran importantes porque son una fuente de energía; un manto térmico, ya que aísla al cuerpo contra la pérdida de calor; forman parte de la estructura de las membranas biológicas; son una "almohada" protectora para muchos tejidos y órganos, forma parte de la estructura de caracteres sexuales secundarios. Además de fuente de energía (9 calorías por gramo), la función más importante de los lípidos se relaciona con el hecho de que un buen número de ellos, son moléculas anfipáticas que en presencia de agua se asocian formando bicapas. Éstas constituyen la base sobre la cual se organiza la complicada estructura de las membranas celulares.

Además la unidad de aprendizaje de **BIOQUÍMICA METABÓLICA** incluye la revisión del metabolismo de las proteínas. Las proteínas son compuestos altamente polimerizados, que están formados por aminoácidos. También se unen a componentes no proteicos. Las proteínas se encuentran entre los nutrientes más importantes, junto con los lípidos y los carbohidratos. Además de su función energética (1 g de proteína proporciona 4,1 Kcal al organismo), dada su naturaleza nitrogenada, son necesarias para la síntesis de compuestos propios del organismo implicados en la estructura de las



membranas junto con los lípidos, como glicoproteínas en funciones de lubricación y como nucleídos que posibilitan la síntesis de otras proteínas propias del organismo, así como la formación de los cromosomas y la división celular.

Finalmente el programa de la unidad de aprendizaje aborda lo relacionado con la información genética que era considerada inherente a una sustancia química intracelular, hecho descrito por primera vez en 1928 por Griffith, ahora es evidente que la información genética reside en la estructura del Ácido Desoxirribonucleico, muchos de los experimentos realizados durante las últimas décadas así lo confirman.

Los ácidos nucleicos son moléculas polianiónicas de alto peso molecular compuestas por una secuencia específica de subunidades o monómeros llamados nucleótidos; la totalidad se le denomina polinucleótidos, los ácidos nucleicos se dividen en dos categorías el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) y el Ácido Ribonucleico (ARN). El ADN se encuentra principalmente en el núcleo de la célula, mientras que el 90% del ARN se encuentra en el citoplasma, el 10% restante se encuentra en el núcleo. El ADN contiene las bases púricas (adenina y guanina) y las pirimidínicas (citosina y timina), mientras que en el ARN en las pirimidinas existe en lugar de timina el uracilo. La secuencia de los nucleótidos en las cadenas de ADN y ARN permite a las células sintetizar proteínas con amplia diversidad de funciones; como por ejemplo, su actividad enzimática, de defensa, hormonal, entre otras, de gran importancia para el desarrollo de las células.

Los conocimientos metodológicos para estudiar las biomoléculas avanza a grandes pasos y en la mayoría de las ocasiones se requieren reactivos y equipos costosos, por lo que es más que imposible abarcar la extensa gama de conocimientos relacionados con protocolo bioquímicos.

El manual de prácticas de laboratorio de **BIOQUÍMICA METABÓLICA** se integra por prácticas sencillas y representativas, que intentan explicar algunas de las propiedades de la biomoléculas y las técnicas para estudiarlas. Se espera que el estudiante adquiera los conocimientos necesarios que permitan ilustrar y complementar conceptos o mecanismos moleculares complejos de la química de los seres vivos que se asocian a la estructura y a la dinámica del funcionamiento celular y de tejidos.



SISTEMA DE EVALUACION

La evaluación del curso de la unidad de aprendizaje de Bioquímica Metabólica se integra de la siguiente forma:

Evaluación	Valor ponderado
Primer Examen Parcial	40%
Segundo Examen Parcial	40%
Evaluación de Prácticas de Laboratorio	20%

Si el alumno en esta ponderación alcanza una evaluación igual o mayor a 8.0 puntos, estará exento de presentar el Examen Final; si la evaluación obtenida en esta ponderación es menor de 8.0 puntos y mayor o igual a 6.0 puntos, el alumno tendrá que presentar el Examen Final.

Examen Final	100%
--------------	------

La evaluación integral del curso de prácticas de laboratorio comprende los siguientes parámetros:

Parámetro de la evaluación	Porcentaje
Presentación de seminario	15%
Bitácora de trabajo	15%
Trabajo en el laboratorio: trabajo en equipo, organización, manejo correcto de material y muestras, desarrollo de habilidades, actitudes y valores durante la realización de cada práctica	25%
Informes o reportes de la práctica	15%
Examen	30%
Total	100%



REGLAMENTO PARA EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA METABOLICA

1. Para estar inscrito en la unidad de aprendizaje de Bioquímica Metabólica y a cursar las prácticas de laboratorio, el discente debe presentar el recibo de pago que lo acredite como alumno del cuarto periodo escolar del programa educativo de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.
2. Deber de tener derecho a cursar la unidad de aprendizaje de Bioquímica Metabólica.
3. La asistencia es obligatoria, porque el alumno debe de adquirir y/o desarrollar las habilidades para el trabajo experimental en el laboratorio.
4. El alumno que tenga menos del 80% de asistencia tendrá una calificación de 2.9 en el laboratorio, con lo cual automáticamente debe repetir el curso de prácticas de laboratorio; tal como lo establece el Reglamento Interno de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México.
5. El alumno debe de contar con el manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica Metabólica, ya que en él se encuentran todas las instrucciones que se desarrollaran durante el curso.
6. La bitácora es un cuaderno de trabajo en el cual los estudiantes deben explicar la secuencia de la práctica de laboratorio, para lo cual deberán elaborar un diagrama de flujo de la metodología a seguir en la práctica. Esta bitácora deberá ser entregada de forma individual con base en los lineamientos que el profesor indique.
7. Las prácticas de laboratorio se iniciarán a la hora indicada en los horarios publicados por la Subdirección Académica de la Facultad, con una tolerancia de 5 minutos a la entrada, no habrá retardos.
8. El registro de la asistencia a las prácticas de laboratorio se llevará a cabo cinco minutos después de la hora indicada para el inicio de la sesión de prácticas de laboratorio.
9. No se permitirá el acceso al laboratorio sin portar adecuadamente la bata; es decir, la bata debe estar limpia y abotonada.
10. El alumno debe llevar al laboratorio todos los materiales solicitados en cada práctica, un trozo de franela, un marcador indeleble y masking tape.
11. No se permitirá salir y entrar innumerables veces del laboratorio para completar el material y/o equipo requerido para el desarrollo de la práctica.
12. Los laboratorios son espacios de trabajo, por lo que cualquier indisciplina será sancionada con base al Reglamento Interno de la Facultad de Química y la normativa correspondiente de la Universidad Autónoma del Estado de México.



13. Durante el desarrollo de las prácticas queda estrictamente prohibida la entrada de personas ajenas al grupo.
14. También queda estrictamente prohibido salir del laboratorio sin causa justificada.
15. Está rigurosamente prohibido sentarse en las mesas de trabajo, en el piso y cualquier espacio dentro del laboratorio; para ello se encuentran los bancos correspondientes.
16. Por razones de seguridad, queda estrictamente prohibido comer dentro del laboratorio.
17. El material y equipo prestado por la institución para el desarrollo de las prácticas de laboratorio que sea roto o descompuesto deberá ser repuesto o reparado inmediatamente, por el responsable directo o por el equipo de alumnos que estén efectuando la práctica.
18. El informe o reporte de la práctica del laboratorio deberá de entregarse de acuerdo con las instrucciones del profesor.
19. La evaluación de las prácticas del laboratorio corresponde al 20% de la evaluación final de la unidad de aprendizaje de Bioquímica Metabólica.
20. Los alumnos asistentes a la práctica de laboratorio tendrán un visto bueno, el cual lo obtendrán cuando se discuta y entreguen los resultados de la misma.
21. El alumno que no tenga visto bueno en su bitácora no acreditará su asistencia a la práctica de laboratorio.
22. Antes de desechar los productos obtenidos en la práctica, deberán de ser tratados y dispuestos adecuadamente para evitar al máximo contaminación.
23. Los alumnos que presenten el seminario tienen la obligación de indicar cual es el tratamiento final que deberá de darse a los productos generados durante la práctica.
24. Además de estas pautas de comportamiento en el laboratorio de Bioquímica Metabólica se aplicarán los **Lineamientos de Laboratorios de la Facultad de Química** (Versión vigente núm. 01 de fecha 30 de Junio de 2016) y el **Reglamento Interno de Laboratorios de la Facultad de Química** de la UAEM (Versión vigente núm. 01 de fecha 18 de abril de 2016), los cuales se encuentran en el ANEXO del presente manual de prácticas de laboratorio.
25. Lo no previsto en este reglamento será sancionado por el Consejo Académico y el de Gobierno de la Facultad de Química de la UAEM.



PROGRAMA DE PRÁCTICAS

1. Propiedades fisicoquímicas de los lípidos
2. Separación de fosfolípidos por cromatografía en capa fina
3. Hidrólisis enzimática de los lípidos de la leche
4. Determinación de la actividad de las Transaminasas
5. Determinación de Urea
6. Extracción y purificación de ADN de chícharos
7. Aislamiento y purificación de ARN de levadura de panificación
8. Determinación de fósforo en ARN



Práctica núm. 1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS LÍPIDOS

INTRODUCCIÓN

El término lípido se refiere a cualquier sustancia natural no polar que sea casi o totalmente insoluble en agua, pero soluble en solventes no polares como el cloroformo, el disulfuro de carbono, el éter y el alcohol caliente. Debido a su diversidad, tanto estructural como funcional, esta definición es necesariamente vaga y muy general. Sin embargo, una propiedad de los lípidos en su naturaleza no polar, que se debe, en la mayoría de los casos, a la presencia de uno o más residuos de ácidos grasos.

Los lípidos se han clasificado de acuerdo a su complejidad estructural como:

1. Lípidos simples: Este grupo incluye a los ésteres de ácidos grasos y el glicerol.
2. Lípidos compuestos: Son aquellos que contienen otras sustancias además de un alcohol y de un ácido graso (carbohidratos, fosfato, compuestos nitrogenados).
3. Lípidos derivados: Aquí se incluyen cualquier material que concuerde con la definición general de un lípido, pero que no pueda clasificarse en los dos grupos anteriores; por ejemplo los esteroides, los carotenoides y las vitaminas insolubles en agua.

Para la caracterización y análisis de los lípidos se precisa de utilizar más de una técnica: índice de saponificación, grado de insaturación, contenido de fósforo, nitrógeno, etc. Es común, en la actualidad, efectuar una hidrólisis ácida o alcalina e identificar posteriormente los productos de la hidrólisis. Esta identificación se ha facilitado por la introducción de técnicas como la cromatografía en papel, en columna o en fase de vapor (McKee, 2014).



PROPÓSITO

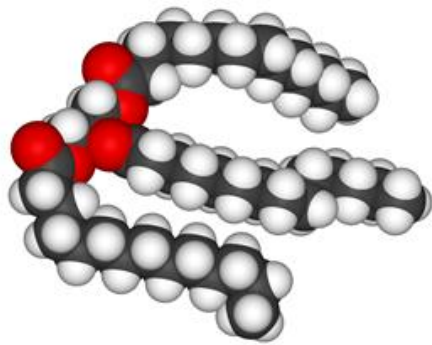
Al término de la práctica el alumno tendrá la habilidad de identificar en el laboratorio a los lípidos y las propiedades fisicoquímicas más comunes de los mismos.

TIEMPO DE REALIZACIÓN

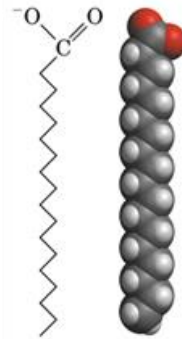
Dos horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

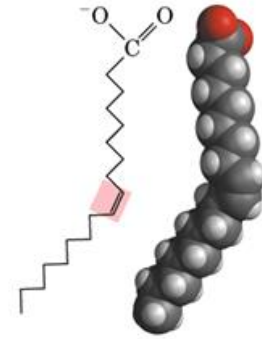
Los lípidos, son un grupo heterogéneo de compuestos, de naturaleza anfipática, es decir que contienen regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas. La mayor parte de los lípidos abundantes en la naturaleza (triacilgliceroles), están formados por ácidos grasos de cadenas hidrocarbonada con número par de átomos de carbono, saturados o insaturados. Los lípidos llevan a cabo múltiples funciones en el organismo, como: almacenamiento de energía, de transporte, funciones hormonales, actuar como vitaminas, formar parte de las membranas celulares confiriéndoles la propiedad de permeabilidad selectiva, al permitir el paso o no de algunas sustancias y en determinada dirección, así como la conducción nerviosa y el transporte activo como la bomba de Na^+/K^+ . A diferencia de los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, no forman polímeros, son moléculas pequeñas que presentan una fuerte tendencia a asociarse mediante fuerzas no covalentes. Algunas de las propiedades de los lípidos pueden ser usadas para su reconocimiento, ya que pueden reaccionar con una variedad de agentes originándose productos coloridos, desprendimiento de vapores, formación de jabones, entre otros.



Acilglicérido



Ácido Graso Saturado



Ácido Graso Insaturado

Fuente: Nelson, 2015.

Las principales características de los lípidos son: biomoléculas muy diversas; están formados por cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, en general lineales, pero algunos tienen anillos aromáticos; otros son flexibles, mientras que unos más son rígidos o semiflexibles hasta alcanzar casi una total flexibilidad molecular; algunos comparten carbonos libres y otros forman puentes de hidrógeno.

La mayoría de los lípidos tiene algún tipo de carácter polar, además de poseer una gran parte apolar o hidrofóbica ("que le teme al agua" o "rechaza al agua"), lo que significa que no interactúa bien con solventes polares como el agua. Otra parte de su estructura es polar o hidrofílica (que tiene afinidad por el agua) y tenderá a asociarse con solventes polares como el agua; cuando una molécula tiene una región hidrófoba y otra hidrófila se dice que tiene carácter anfipático. La región hidrófoba de los lípidos es la que presenta solo átomos de carbono unidos a átomos de hidrógeno, como la larga "cola" alifática de los ácidos grasos o los anillos de estero del colesterol; la región hidrófila es la que posee grupos polares o con cargas eléctricas, como el hidroxilo ($-OH$) del colesterol, el carbonilo ($-COO^-$) de los ácidos grasos, el fosfato ($-PO_4^-$) de los fosfolípidos, etc. La estructura química que presentan los lípidos es la responsable de las propiedades fisicoquímicas de ellos, como la solubilidad en solventes polares, la



insaturación y la configuración de la molécula (cis o trans), la formación de emulsiones y la permeabilidad de las bicapas de las membranas celulares.

Los lípidos son sustancias que no se disuelven en agua, por eso es necesario emulsificarlos. Una emulsión esta compuesta por una fase dispersa (que sería, por ejemplo, la grasa en la mayonesa), una fase dispersante (puede ser agua) y un emulsificante. La función del agente emulsificante es como si se tuvieran muchas gotitas de grasa suspendidas en el agua, entonces el emulsificante lo que hace es mantener esas gotitas separadas, ya que tiene una estructura química que tiene afinidad tanto con el agua como con la grasa. Otros ejemplos de emulsificaciones serían la crema de leche, que es una emulsión de grasa en agua; la manteca que es una emulsión de agua en grasa; la leche, que también tiene lípidos en emulsión. En el cuerpo humano las sales biliares son emulsificantes de las grasas que consumimos; forman pequeñas gotitas de grasa, para que las enzimas las puedan digerir.

La grasa se almacena en el tejido adiposo, donde también sirve como un aislante térmico de los tejidos subcutáneos y alrededor de ciertos órganos. Los lípidos no polares actúan como aisladores eléctricos, lo que permite la propagación rápida de las ondas de despolarización a lo largo de nervios mielinizados. Las combinaciones de lípido y proteína (lipoproteínas) sirven como el medio para transportar lípidos en la sangre. El conocimiento de las propiedades bioquímicas de los lípidos es necesario para entender muchas áreas biomédicas importantes, como obesidad, diabetes mellitus, aterosclerosis y la función de diversos ácidos grasos poliinsaturados en la nutrición y la salud (Harper, 2009; Stryer, 2013).



MATERIAL Y REACTIVOS

Material	Reactivos
Tubos de ensayo	Éter anhidro
Gradilla	Cloroformo
Baño de hielo	Carbonato de Sodio al 1%
Bulbo de hule	Alcohol etílico
Pipetas de 1, 5 y 10 mL	Tetracloruro de Carbono
	Solución de Albúmina al 1%
	Solución de Extran 100 a 1%
	Solución de Tween 80 al 1%
	Ácido Nítrico concentrado
	Ácido Oleico saturado en Butanol
	Ácido Esteárico saturado en Butanol
	Sales Biliares al 5%
	Cobre metálico
	Bromo en Tetracloruro de Carbono al 5%
	Fosfolípidos (lecitina de huevo) 4% en Butanol
	Colesterol (4% en Butanol)
	Butanol
	Azul de Metileno al 0.025% en Butanol
	Éter Etílico

PROCEDIMIENTO

Propiedad núm. 1: Solubilidad

La solubilidad es una medida de la capacidad de disolverse de una determinada sustancia (soluto) en un determinado medio (disolvente). Uno de los criterios para definir a los lípidos es su solubilidad en disolventes orgánicos no polares, por lo que es conveniente comprobarlo y analizar a que se debe esta propiedad común de los lípidos.

Técnica

Agregar 5 gotas de una muestra de aceite en un tubo de ensayo, adicionar 1 mL del solvente por probar y anotar sus observaciones en el cuadro:



Aceite	Agua	Alcohol frío	Alcohol caliente	Éter	Tetracloruro de carbono
Cártamo					
Ajonjolí					
Linaza					
Ricino					

Anote en el cuadro sus conclusiones acerca de la solubilidad de acuerdo a lo que observó.

Propiedad núm. 2: Emulsificación

Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea: Un líquido (la fase dispersa) es adicionado en otro (la fase continua o fase dispersante). Muchas emulsiones son de aceite/agua, empleando aceites o grasas alimenticias como uno de los tipos más comunes de agentes dispersantes encontrados en la vida diaria. El objetivo de esta prueba es comprender esta propiedad en los lípidos y los factores que la modifican.

Técnica

En tubos de ensayo debidamente etiquetados adicione 5 gotas de una muestra de aceite y 2 mL del emulsificante en cada uno, anotando sus observaciones en el cuadro siguiente:

Muestra	Agua	Alcohol	Albúmina al 1%	Extran al 1%	Na ₂ CO ₃ al 1%	Sales Biliares al 5%
Ajonjolí						
Algodón						
Ricino						
Linaza						

Anote en el cuadro el tiempo que tarda en romperse la emulsión. Puede utilizarse Tween 80 al 1% y otros aceites que disponga el profesor.



Propiedad núm. 3: Insaturación

Una sustancia orgánica insaturada es aquella que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono. Particularmente, se piensa que la saturación de las grasas determina su capacidad para bloquear la circulación de la sangre dentro del cuerpo. Esta prueba nos permite comprender el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos, basándose en la propiedad que tienen los dobles enlaces de adicionar halógenos; utilizando para ello una solución de Bromo en Tetracloruro de Carbono al 5%, observado la desaparición de la coloración café de esta solución, por la adición de Bromo al doble enlace, siendo la intensidad del color proporcional a la saturación del lípido o ácido graso, e inverso a la insaturación.

Técnica

Esta prueba se efectúa en tubos de ensayo secos, utilizando 5 gotas de la muestra lipídica (aceite) y siguiendo las indicaciones del siguiente cuadro:

Reactivo	Ajonjolí	Linaza	Aceite de Maíz	Acido Oleico	Acido Esteárico	Testigo
Éter anhidro	Adicionar 5 mL, tapar y enfriar en hielo por 10 minutos					
Reactivo de Bromo al 5%	Adicionar 0.5 mL a todos los tubos con MUCHO CUIDADO EN LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN					
Tiempo de reacción	Dejar reposar una hora en baño de hielo					
Grado de insaturación						

De acuerdo con sus lecturas, indique si se trata de un lípido saturado, insaturado o poliinsaturado.



Propiedad núm. 4: Isomería cis - trans

La isomería cis – trans (o isomería geométrica) es un tipo de estereoisomería de los alquenos y cicloalcanos. Se distingue entre el isómero *cis*, en el que los sustituyentes están en el mismo lado del doble enlace o en la misma cara del cicloalcano, y el isómero *trans*, en el que están en el lado opuesto del doble enlace o en caras opuestas del cicloalcano. Ambos poseen la misma fórmula, presentan diferentes propiedades químicas y físicas. La isómera cis - trans puede ser observada en el Ácido Oleico, ácido graso constituido por una cadena de 18 átomos de Carbono (C) con un doble enlace en el C-9; es líquido a temperatura ambiente (p. f. 13.4 °C) que al ser tratado con Cobre y Ácido Nítrico concentrado se transforma en su isómero trans, el Ácido Elaídico, que es sólido y de punto de fusión más elevado (p. f. 44-45 °C).

Técnica

En un tubo de ensayo coloque 1 mL de Ácido Oleico, adicione 0.2 mL de Ácido Nítrico concentrado y un pequeño alambre de Cobre en espiral. Tenga **MUCHO CUIDADO YA QUE LA REACCIÓN ES VIOLENTA Y CON DESPRENDIMIENTO DE GASES. EFECTÚE ESTA PRUEBA EN LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN Y ENFRÍELO EN AGUA CON HIELO.** Transcurridos 15 minutos, agregue 3 mL de agua destilada para diluir, pase la fase "oleosa" a otro tubo agréguele 2 mL de Etanol y mezcle. Conserve el tubo en baño de hielo hasta la aparición de cristales de Ácido Elaídico.

Propiedad núm. 5: Permeabilidad de una monocapa lipídica

La permeabilidad selectiva es una propiedad de la membrana plasmática y de otras membranas semipermeables que permiten el paso de solo ciertas partículas a través de ellas. De esta forma, pueden entrar a la célula aquellas partículas que necesite la misma y se evita que ingresen las que no le sean útiles. La membrana juega un papel muy importante en la integridad celular, por lo que es conveniente comprender su composición y como es afectada su permeabilidad al modificar sus constituyentes lipídicos.



Técnica

Prepare una serie de cinco tubos de ensayo, siguiendo las instrucciones del siguiente cuadro, colocando la solución de Butanol-Lípido-Azul de Metileno con mucho cuidado, dejando resbalar por las paredes del tubo, logrando formar las dos capas.

Reactivo	Tubo				
	1	2	3	4	Testigo
Agua destilada (mL)	2	2	2	2	2
Ácido Esteárico (mL)	2	0	0	0	0
Ácido Oleico (mL)	0	2	0	0	0
Fosfolípido (mL)	0	0	2	0	0
Colesterol (mL)	0	0	0	2	0
Azul de Metileno-Butanol (mL)	2	2	2	2	2
Dejar en reposo a temperatura ambiente					
Revisar a las 2 horas					
Revisar a las 24 horas					

Observaciones

Tiempo de reposo	Tubo				
	1	2	3	4	Testigo
2 horas					
24 horas					

Justifique sus resultados en función de la estructura de cada lípido.



DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

1. **Pruebas de solubilidad:** En el caso de los aceites con agua, separar la parte oleosa y desechar el agua en la tarja. Los tubos con Etanol y Éter disponerlos en el contenedor de residuos A (solventes orgánicos), los tubos con Tetracloruro de Carbono en el contenedor B (solventes orgánicos con halógenos).
2. **Emulsificación:** Para los tubos con agua, Sales Biliares, Extrán, Tween 80 y Albúmina al 1%, separar la fase oleosa y deseche el resto a la tarja. Los tubos con Na_2CO_3 disponerlos en el contenedor D (sales inorgánicas), los tubos con Etanol en el contenedor A.
3. **Insaturación:** Disponer el contenido de los tubos en el contenedor B.
4. **Isomería:** Neutralizar el contenido del tubo y verterlo al contenedor D.
5. **Permeabilidad:** Separar la parte butanólica (fase superior) y verterla en el contenedor A, desechar el resto (fase acuosa) en la tarja.

CUESTIONARIO

1. ¿Cómo explica la diferencia en la solubilidad con el alcohol frío y el alcohol caliente?
2. ¿Explique porqué los aceites probados tuvieron diferentes solubilidades en los diferentes disolventes?
3. ¿Cómo se comportan los lípidos en presencia de un detergente, ante una proteína y ante un electrolito?
4. ¿De qué depende el grado de saturación o insaturación de un lípido?
5. ¿Qué es el índice de iodo para los lípidos?

EJERCICIO DE INTEGRACIÓN

Con base en la información sobre lípidos, conteste breve y claramente el siguiente problema, argumentando su respuesta y haciendo referencia a la bibliografía consultada.

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos macromoleculares, compuestos por proteínas (apo-lipoproteínas) y lípidos. La relación



cualitativa y cuantitativa de estos componentes determina el tamaño y la densidad de las lipoproteínas, características empleadas para la clasificación. Desde este punto de vista del transporte plasmático de colesterol las lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL) tienen un rol fundamental. Bajo condiciones normales la concentración plasmática de colesterol unido a estas lipoproteínas guarda un fino equilibrio dependiente entre otros factores del control preciso de la síntesis de colesterol y del número y funcionalidad de los receptores de LDL. Se ha visto que la cantidad de colesterol asociado a la lipoproteína de alta densidad (HDLc) guarda relación inversa con la cifra de arteriopatía coronaria. En cambio, el colesterol unido a LDL (LDLc) aumentado en sangre constituye un importante factor de riesgo para la aterosclerosis coronaria y tiene relación con el grado de lesión arterial, lo que ha sido demostrado a través de diferentes estudios epidemiológicos, experimentales y anatomoclínicos.

El cociente LDLc/HDLc se emplea en la clínica como un índice de riesgo de aterosclerosis. Numerosos estudios, incluyendo el Framingham Heart Study y el Ensayo de Intervención Múltiple sobre Factores de Riesgo, han aportado la base para ensayos clínicos dirigidos a reducir los lípidos y lipoproteínas séricos. La disminución de estos factores de riesgo reduce la incidencia de enfermedad coronaria, accidente cerebro-vascular y otras enfermedades vasculares. El LDLc constituye, entonces, un factor de riesgo causal modificable para la aterosclerosis coronaria. La clasificación de los enfermos con base en las características y tendencias de estos niveles permite identificar las hiperlipoproteinemias y las hipolipoproteinemias.

1. Describa un método analítico empleado en el laboratorio clínico para determinar la concentración plasmática de Colesterol Total y el unido a HDL y LDL; así como la interpretación del cociente HDLc/LDLc.
2. ¿Por qué razón se designa como colesterol bueno y colesterol malo?
3. ¿Qué diferencia existe entre aterosclerosis y arterioesclerosis?
4. Explique el modelo fisiopatológico más aceptado para la aterosclerosis.
5. Realice un esquema que indique los destinos finales del colesterol y la función de cada uno de ellos.



Práctica núm. 2 SEPARACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

INTRODUCCIÓN

Los lípidos no poseen un grupo funcional característico como otros compuestos orgánicos (alcanos, alquenos, aldehídos, cetonas, entre otros) o como otras biomoléculas (carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos). Su única propiedad común es la solubilidad. Todos los lípidos son solubles en disolventes orgánicos no polares como el Éter dietílico, el Cloroformo, el Benceno, e insolubles en agua. Por tanto los lípidos son los compuestos orgánicos que pueden extraerse de las células y de los tejidos de los organismos vivos mediante disolventes orgánicos no polares.

Su solubilidad los diferencia de otros dos grupos principales de compuestos de importancia biológica, los carbohidratos y las proteínas, que son insolubles en solventes orgánicos debido a su carácter fuertemente polar. Las grasas, los aceites vegetales y las ceras son ejemplos de lípidos conocidos ampliamente.

Las estructuras de los compuestos clasificados como lípidos son muy diferentes, pero todas tienen algo en común: la porción principal de su estructura es de naturaleza hidrocarbonada y por esta razón son solubles en disolventes orgánicos. Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas de gran importancia, ya que constituyen la principal reserva energética de los seres vivos, forman parte de las membranas celulares y regulan la actividad de las células y de los tejidos.

Los lípidos se han clasificado de diversas maneras, pero la clasificación más útil se basa en su comportamiento frente a la hidrólisis en medio alcalino, reacción que recibe el nombre de saponificación. Así los lípidos saponificables son los que se hidrolizan en medio alcalino, mientras que los lípidos insaponificables son los que no experimentan esta reacción.



Los lípidos forman un grupo de biomoléculas que con frecuencia se encuentran combinados, covalentemente o mediante enlaces débiles, con miembros de otra clase de biomoléculas, constituyendo moléculas tales como: glicolípidos, los cuales contienen lípidos y glúcidos; lipoproteínas que contienen lípidos y proteínas. En estas biomoléculas las propiedades químicas y físicas características de sus componentes están fusionadas para cumplir funciones biológicas especializadas.

Los lípidos son un grupo de compuestos heterogéneo, que incluye grasas, aceites, esteroides, ceras y compuestos relacionados más por sus propiedades físicas que por sus propiedades químicas. Los ésteres de glicerol son los lípidos de mayor importancia en el aspecto cuantitativo, representados por los triacilgliceroles (“grasa”), un constituyente importante de lipoproteínas y del almacén de lípidos en el tejido adiposo. Los fosfoacilgliceroles son lípidos anfipáticos y tienen funciones importantes: como constituyentes principales de membranas y la capa externa de lipoproteínas, como surfactantes en los pulmones, como precursores de segundos mensajeros y como constituyentes del tejido nervioso.

Los glucolípidos también son constituyentes importantes del tejido nervioso, como el cerebro y la cara externa de la membrana celular, formando parte de la bicapa lipídica de ellas; el glúcido de la molécula está orientado hacia el exterior de la membrana plasmática y es un componente fundamental del glicocalix, donde actúa en el reconocimiento celular y como receptor antigénico.

El colesterol, un lípido antipático, es un componente de las membranas. Es la molécula original a partir de la cual se sintetizan todos los otros esteroides en el cuerpo, incluso hormonas importantes como las hormonas adrenocorticales y sexuales, vitaminas D y ácidos biliares.



PROPÓSITO

Al finalizar la práctica el alumno comprobará que la cromatografía en capa fina es una técnica que se utiliza para la separación de fosfolípidos de la yema del huevo.

TIEMPO DE REALIZACIÓN

Cuatro horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

La cromatografía es un proceso que conduce a la separación de mezclas por desagregación de todos o algunos de sus componentes en zonas concentradas o en fases diferentes de aquellas de las que se encontraban originalmente. Independientemente de la naturaleza de las fuerzas que provocan el paso de dichas sustancias de una fase a otra.

Los mecanismos que se llevan a cabo en la cromatografía son fundamentalmente:

- Partición entre solventes (fase móvil o eluyente y fase acuosa estacionaria) o cromatografía de reparto.
- Interacciones superficiales físicas o cromatografía de adsorción.
- Atracción electrostática de iones con carga opuesta sobre superficie polielectrolítica o cromatografía de intercambio iónico.

En la práctica, la mayoría de las veces se trata de una combinación de estos mecanismos. Particularmente, en la cromatografía en capa fina la separación se logra fundamentalmente debido a la adsorción de cada sustancia sobre el gel de sílica, distribuido en una placa de vidrio que forma una capa delgada. Los requerimientos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas.



La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el material que se requiere es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la disociación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.

Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido esté, mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente. Algunos de los adsorbentes más utilizados son celulosa, almidón, azúcares, gel de sílice (sílicagel), óxido de aluminio (alúmina), carbón activado (carbón en polvo), Kieselguhr. Los tres primeros se utilizan para extraer componentes polifuncionales de plantas y animales.

Los productos a examinar deben disolverse, cuando sea posible, en un solvente orgánico no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación. Sin embargo, a menudo se necesitan disolventes polares; la mezcla cloroformo:metanol (1:1) es efectiva. Frecuentemente se emplean diluciones al uno por ciento, de manera que al aplicar 2 μl resulta en la carga 20 μg de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 μg de material; por esto con esta carga puede llegarse a observar un cinco por ciento de impurezas.



El proceso de colocación de la muestra se realiza tocando con la punta del capilar (micropipeta, jeringuilla, etc.) sobre la placa preparada. Dejando una distancia al borde inferior de un centímetro aproximadamente. El punto de aplicación de la muestra se denomina *toque*. Una vez colocado el toque se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar.

La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo. Los principales eluyentes en orden creciente de polaridad son éter de petróleo, éter dietílico, ciclohexano, acetato de etilo, tetracloruro de carbono, piridina, benceno, etanol, cloroformo, metanol, diclorometano, agua, ácido acético.

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente; esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realiza en una cubeta. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse.

Generalmente el eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmósfera. El tiempo de desarrollo, por lo general, no llega a los 30 minutos. El tiempo de una cromatografía cualitativa suele ser de un par de minutos, mientras que el tiempo de una cromatografía preparativa puede llegar a un par de horas.

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. Esto se hace para estandarizar los valores de R_F . Frecuentemente esta distancia es de 10 cm; parece ser la más conveniente para medir valores de R_F .



Después del desarrollo, las placas pueden secarse rápidamente con una corriente de aire caliente.

La mejor posición de desarrollo para un componente es el punto medio entre el origen y el frente del eluyente, ya que permite separar las impurezas que se desplazan con mayor y menor velocidad. El frente del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa. Si la placa se estropea por acción del aire o de la luz, se secará en una cámara que contenga un gas inerte o aislado de la luz.

Si los compuestos separados no son coloridos es necesario revelar la posición de dichos compuestos, para ello existen dos tipos de métodos:

- **Métodos químicos:** Consisten en realizar una reacción química entre un reactivo revelador y los componentes separados, para ello se pulveriza la placa con los reactivos reveladores, ayudándose de un pulverizador de vidrio y una pera de goma, o mediante un dispositivo que proporcione aire comprimido. Es preferible pulverizar con las placas en posición horizontal. Si el reactivo revelador es peligroso o muy corrosivo, la pulverización deberá realizarse en una vitrina de gases bien ventilada. La pulverización se realizará poco a poco. En cromatografía en capa fina no puede realizarse el bañado del cromatograma (en cromatografía en papel sí). Generalmente se utiliza como reactivo revelador yodo, el cual forma complejos coloridos con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrones), pero las manchas desaparecen con el tiempo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas. Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras. El tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado. Además de estos reveladores generales, existen otros específicos: 2,4 - dinitrofenilhidracina (para aldehídos y cetonas), verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos), paradimetil aminobenzaldehído (para aminas), ninhidrina (para Aminoácidos).



- **Métodos físicos:** El más común consiste en añadir al adsorbente un indicador fluorescente. De tal forma que al colocar la placa bajo una lámpara ultravioleta, y dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes, o en otros casos aparece toda la placa fluorescente excepto donde hay componentes. Algunos compuestos poseen cierta fluorescencia (aunque no es normal) con lo que pueden ser detectados directamente en una lámpara de ultravioleta.

La constante R_F (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

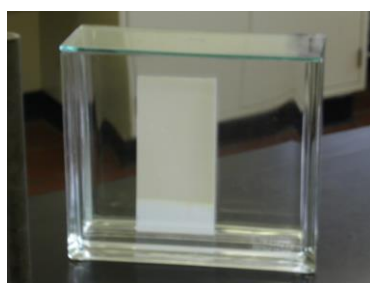
La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los R_F sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de R_F que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_F entre 0.65 y 0.7.

Para averiguar si dos compuestos son iguales, se colocan ambos sobre la misma placa y se desarrolla con varios eluyentes. Una vez desarrollados se calculan los R_F y si son distintos, puede deducirse con toda seguridad que no se trataba del mismo compuesto. Por el contrario si los R_F son iguales los compuestos pueden ser iguales o no serlo. Si se sospecha que dos compuestos son muy parecidos se eluyen sobre la misma placa con el mismo eluyente u otros de menor polaridad, hasta apreciar una separación mínima. En este caso no se pueden usar reveladores químicos, ya que alterarían los compuestos, sino indicador ultravioleta.



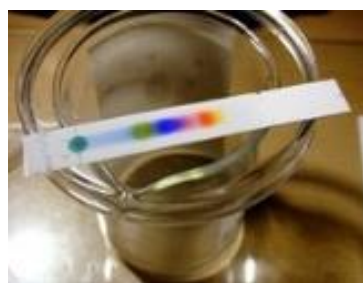
También se puede operar de la manera siguiente: Se selecciona un compuesto (X), que tenga una posición de desarrollo conveniente; todos los demás compuestos sobre la placa se relacionan con éste. De esta manera se tiene el, R_x , ya que:

$$R_x = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto de referencia (X)}} = \frac{Y}{X}$$



Cámara cromatográfica

Fuente: www.uprm.edu, 2010



Cromatografía en capa fina revelada

MATERIAL Y REACTIVOS

Materiales

Equipo para cromatografía
Centrífuga
Tubos capilares
Papel filtro
Embudo de filtración

Material biológico

Yema de huevo

Reactivos

Cloruro de Potasio 0.1M
Solución de Cloroformo-Metanol 2:1 (V:V)
Reactivo de Bismuto
Reactivo de Molibdato
Reactivo de Ninhidrina
Eluyente: solución de Cloroformo-Metanol-
Ácido Acético-Agua 65:25:8:4 en volumen.

PROCEDIMIENTO

Primera parte: Extracción de lípidos

1. Separar la yema del huevo y mezclarla con 30 mL de la solución de cloroformo-metanol 2:1 para extraer fosfolípidos y lípidos neutros.
2. Agitar aproximadamente 20 minutos.



3. Filtrar, agitar el filtrado claro con 20 mL de la solución de cloruro de potasio 0.1M.
4. Centrifugar a 2000 rpm, por 20 minutos.
5. Separar la fase acuosa superior y usar la fase clorofórmica inferior para la cromatografía.

Segunda parte: Cromatografía en capa fina

1. Aplicar tres muestras del extracto de lípidos aproximadamente de 30 microlitros en forma equidistante.
2. Colocar el cromatograma en la cámara saturada con el eluyente.
3. Dejar desarrollar durante 90 minutos o hasta que alcance una altura de 12-15 cm.
4. Sacar la placa de la cámara y dejar secar.

Tercera parte: Revelado de cromatogramas

Revelar cada placa cromatográfica con un revelador distinto con el fin de obtener las manchas características de cada tipo de fosfolípidos.

NOTA: El cromatograma revelado con el reactivo de ninhidrina requiere calentarse a 100°C por 5 minutos.

RESULTADOS

Dibujar un esquema a escala de los cromatogramas revelados, resaltando las manchas que se hayan identificado. Calcular los R_F de cada una de las manchas detectadas e identificar los compuestos correspondientes.

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

1. Colocar en una charola el residuo sólido que queda en el embudo Buchner después de filtrar al vacío y llevarlo a la campana de extracción para que se evapore cualquier remanente de solvente, posteriormente desechar en la basura.
2. La fase acuosa que se separa posterior a la centrifugación (KCl) se dispone en el recipiente D.



CUESTIONARIO

1. Las proteínas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos están agrupados por características estructurales comunes a su clase de biomoléculas. ¿Cuál es la base para agrupar compuestos como los lípidos?
2. Menciona tres propiedades biológicas de los fosfolípidos.
3. Con base en las características de la estructura química de los lípidos, explique cuál es más hidrofílico, el colesterol o los fosfolípidos, argumentando su respuesta.
4. ¿Cuáles son los lípidos que se encuentran en la yema de huevo?
5. La yema de huevo contiene una elevada cantidad de colesterol y también una elevada cantidad de lecitina. Desde el punto de vista dietético y de salud ¿Cómo se complementan estas dos moléculas?

EJERCICIOS DE INTEGRACIÓN

Con base en el fundamento teórico de la cromatografía, conteste breve y claramente las siguientes preguntas, argumentando su respuesta y haciendo referencia a la bibliografía consultada.

1. ¿Por qué se dice que la cromatografía en capa fina es un criterio parcial y no total de identificación?
2. ¿Cuál será el resultado de los siguientes errores en cromatografía en capa fina: a. Aplicación de solución muy concentrada; b. Utilización de un eluyente de alta polaridad; c. Empleo de gran cantidad de eluyente en la cámara de cromatografía?
3. ¿Qué tratamiento es necesario darle al gel de sílice para reutilizarlo?
4. Hay muchas razones por las que la cromatografía en capa fina debería ser el principal método de análisis farmacológico. Enliste cinco razones.



Práctica núm. 3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LÍPIDOS DE LA LECHE

INTRODUCCIÓN

Además de ser una fuente de combustible energético para nuestro organismo (9 calorías por gramo), los lípidos desempeñan otras funciones fundamentales para el buen funcionamiento de nuestro cuerpo: constituyen una reserva muy importante de energía (tejido adiposo o grasa), colaboran en la regulación de la temperatura corporal (grasa subcutánea), envuelven y protegen órganos vitales como el corazón y riñones (grasa perivisceral), son el vehículo de transporte de las vitaminas liposolubles (A, D, E, K) facilitando así su absorción; resulta imprescindible para la formación de determinadas hormonas, suministran ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico) para nuestro organismo e interviene en la buena palatabilidad de los alimentos (sensación agradable que producen los alimentos en la boca). Así mismo impiden que las proteínas sean empleadas como fuente de energía y cumplen una función estructural, estando presente en las membranas celulares (fosfolípidos de membrana y colesterol).

La digestión de las grasas se inicia en la boca. Las partículas de alimento se separan en otras más pequeñas mediante la masticación y actúa una enzima, la lipasa lingual, que comienza la ruptura de los triglicéridos en otras sustancias más sencillas (diglicéridos; molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos).

En el estómago actúa la lipasa gástrica y en él se absorben algunos ácidos grasos de cadena corta y media (con relación al número de carbonos de los ácidos grasos; 4-6 y 8-10 respectivamente). A nivel de duodeno y yeyuno, porciones del intestino delgado, gracias a la colecistoquinina, que hace que la vesícula biliar se contraiga y libere bilis, se produce la emulsión de las grasas facilitada por los movimientos peristálticos. También actúa la enzima lipasa pancreática y se obtienen finalmente monoglicéridos (una



molécula de glicerol unida a un ácido graso) y ácidos grasos, así como glicerol libre y colesterol. Los ácidos grasos de cadena corta y media y el glicerol, se absorben y pasan hacia la sangre y son transportados hacia el hígado. Los ácidos grasos de cadena larga (de más de 12 carbonos) se absorben y se resintetizan en triglicéridos en el enterocito (células del epitelio o revestimiento del intestino delgado), formándose los quilomicrones, que también transportan una parte de fosfolípidos y colesterol. A través del sistema linfático los quilomicrones pasan al torrente sanguíneo. El 97% del total de los lípidos de la dieta son absorbidos y el resto se expulsan junto con las heces. Los lípidos absorbidos serán transportados en sangre en forma de lipoproteínas.

Después de comer, es decir, en situación postprandial, los lípidos se emplean como combustible energético o se almacenan en el tejido adiposo o graso o bien pasan a formar parte de membranas celulares. En situación interdigestiva o de ayuno, se produce la movilización de las grasas desde el tejido adiposo, dando lugar a ácidos grasos, los cuales puede tener distintos destinos metabólicos: ser empleados como fuente de energía en los tejidos en general, en presencia de oxígeno dan lugar a los cuerpos cetónicos (en situación de ayuno y falta de glucosa como sustrato energético) o bien forman parte de membranas de celulares.

PROPÓSITO

Al término de la práctica el alumno habrá adquirido las habilidades en el laboratorio para determinar una hidrólisis enzimática de los lípidos de la leche.

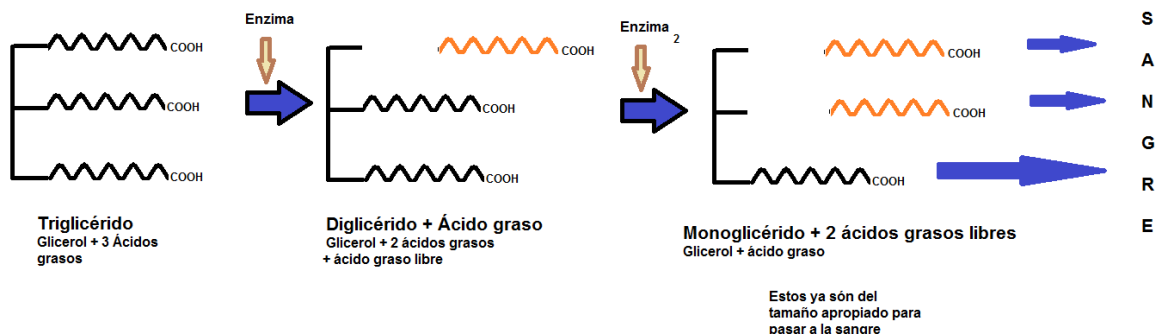
TIEMPO DE REALIZACIÓN

Dos horas



FUNDAMENTO TEÓRICO

Las lipasas y las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster que se encuentran en un gran número de lípidos saponificables. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



ACTUACIÓN DE LAS LIPASAS

Fuente: www.equipodietistas.files.wordpress.com, 2010

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son especialmente importantes en el intestino delgado donde tiene lugar la digestión y la absorción de las grasas, debido a que los triacilgliceroles son insolubles en agua y las enzimas digestivas son solubles en ella. La digestión de los triacilgliceroles transcurre en las interfaces lípido-agua; consecuentemente los agentes emulsificantes tales como las sales biliares producen a menudo una estimulación marcada de la hidrólisis enzimática de los lípidos.

En la leche homogenizada, los glóbulos de grasa se encuentran muy finamente divididos y este material sirve como un sustrato excelente para las lipasas.



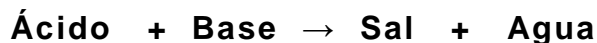
La identificación de la actividad de estas enzimas se realiza a través de una titulación ácido-base, ya que la acción de las lipasas sobre los lípidos saponificables libera ácidos grasos que pueden ser cuantificados por la valoración del grupo funcional ácido carboxílico que los caracteriza.

La titulación es un método para determinar la cantidad de una sustancia presente en solución. Una solución de concentración conocida, llamada solución valorada, se agrega con una bureta a la solución que se analiza. En el caso ideal, la adición se detiene cuando se ha agregado la cantidad de reactivo determinada en función de un cambio de coloración en el caso de utilizar un indicador interno, y especificada por la siguiente ecuación de la titulación:

$$N_A V_A = N_B V_B$$

A este punto se le llama punto de equivalencia. En términos generales la reacción entre cantidades equivalentes de ácidos y bases se llama neutralización o reacción de neutralización, la característica de una reacción de neutralización es siempre la combinación de hidrogeniones que proceden del ácido, con iones hidroxilo procedentes de la base para dar moléculas de agua sin disociar, con liberación de energía calorífica como calor de neutralización y formación de una sal.

Una expresión general como la siguiente, resumen la ecuación de neutralización:



Así pues, la titulación es un proceso en el cual la solución estándar (del patrón primario) se combina con una solución de concentración desconocida para determinar dicha concentración.



MATERIAL Y REACTIVOS

Material

Siete matraces Erlenmeyer de 125 mL
Dos buretas de 25 mL
Pinzas para bureta
Soporte universal
Termómetro
Mechero
Baño María a 37°C
Dos pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL.
Seis pipetas volumétricas de 10 mL.

Reactivos

Etanol al 95 %
Fenolftaleína
Sales biliares al 1%
Hidróxido de Potasio 0.05N
Pancreatina al 1 % en agua

Material biológico

Un litro de leche homogeneizada

PROCEDIMIENTO

1. Identificar los matraces colocándoles los números del uno al cinco y uno con el número tres prima (3').
2. Medir cuidadosamente con una pipeta volumétrica 5 mL de leche homogeneizada y verterlos en cada uno de los seis matraces Erlenmeyer de 125 mL.
3. Adicionar a cada matraz 1.5 mL de extracto neutro de Pancreatina al 1%.
4. Pipetear en el matraz marcado tres prima (3') 1.0 mL de la solución de sales biliares al 1%.
5. Colocar todos los matraces en un baño María a 37°C.
6. Después de 15 minutos, retirar del baño María el matraz identificado con el número 1 y adicionarle 12.5 mL de Etanol titulando enseguida con la solución de KOH 0.05N usando Fenolftaleína como indicador. Agitar el matraz durante la titulación, tan vigorosamente como sea posible ya que la proteína precipitada puede enmascarar los ácidos grasos libres.



Dispositivo para la titulación

7. Titular tan rápido como sea posible debido a que la digestión realizada por la enzima continúa durante la titulación.
8. Repetir el procedimiento anterior, sacando el matraz 2 a los 30 minutos, el 3 y 3' a los 45 min, el 4 a los 60 min y el 5 a los 75 minutos.
9. Preparar un testigo de la siguiente manera: Añadir en un matraz de 125 mL 5 mL de la leche homogenizada y 1.5 mL de la solución de Pancreatina hervida previamente durante tres minutos. Agregar enseguida 12.5 mL de Etanol, la Fenolftaleína y titular inmediatamente con KOH 0.5N restar este valor a los problemas.

RESULTADOS

Construir una gráfica usando tiempo de hidrólisis en el eje de las abscisas y los mililitros de Hidróxido de Potasio (KOH) gastados en el eje de las ordenadas, restando el volumen obtenido en el matraz que contiene el testigo al volumen obtenido en todos los matraces. Concluya de manera fundamentada los resultados obtenidos en la gráfica.

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Verter los residuos neutralizados al recipiente A, ya que contienen Etanol.



CUESTIONARIO

1. Explicar el efecto de la adicción de sales biliares sobre la actividad enzimática suponiendo que la grasa de la leche es Triestearina.
2. Calcular el número de miligramos de Triestearina hidrolizada por la lipasa en una hora, basándose en la cantidad de ácido liberado durante ese intervalo.
3. Escribir las fórmulas de los siguientes compuestos: Lecitina, Glucosilceramida y Fosfatidiletanolamina; indicando el tipo de Lípidos al que pertenece.
4. Describir la composición de la leche.
5. ¿Qué tipos de detergentes biológicos existen en el hombre?

EJERCICIOS DE INTEGRACIÓN

Con base en el fundamento teórico de la Hidrólisis Enzimática de la Lipasa, conteste breve y claramente las siguientes preguntas, argumentando su respuesta y haciendo referencia a la bibliografía consultada.

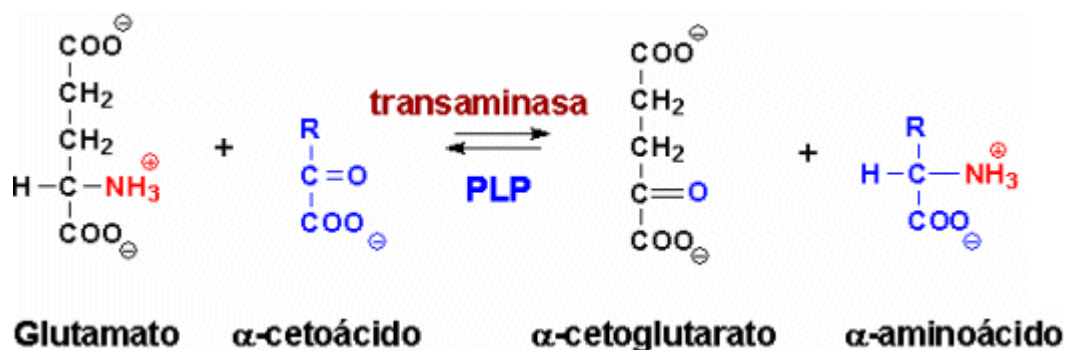
1. Con base en los cálculos de las concentraciones de ácidos grasos liberados por acción de la Lipasa Pancreática, elabore la representación doble recíproca de Lineweaver y Burk y obtenga el K_m y la V_{max} de la cinética enzimática (reporte todos los cálculos realizados).
2. ¿Por qué es útil graficar los datos de velocidad para las reacciones enzimáticas como una línea recta más que como una curva?
3. ¿Bajo qué condiciones se puede asumir que el K_m indica la afinidad de la unión de la enzima con el sustrato?
4. Interprete el valor de K_m y V_{max} obtenidos en la gráfica.



Práctica núm. 4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS TRANSAMINASAS

INTRODUCCIÓN

En el metabolismo de los aminoácidos se incluyen reacciones de Transaminación, en las que hay una transferencia de un grupo amino de un alfa-aminoácido a un alfa-cetoácido con la formación de un nuevo alfa-aminoácido y cetoácido, las enzimas que catalizan esta reacción se llaman Transaminasas o llamadas también Aminotransferasas, las cuales utilizan como coenzima al Fosfato de Piridoxal derivado de la Vitamina B-6



Fuente: Nelson, 2015

En la reacción de Transaminación el Fosfato de Piridoxal actúa como un portador intermediario del grupo amino transferido.

Dentro de las Transaminasas más estudiadas están la Transaminasa Glutámico Pirúvica y a la Transaminasa Glutámico Oxalacética, TGP y TGO respectivamente, su cuantificación es utilizada para conocer el funcionamiento hepático, junto con otras enzimas.

PROPÓSITO

El alumno desarrollará su capacidad para determinar la actividad de la enzima Transaminasa Glutámico Pirúvica en suero humano.



TIEMPO DE REALIZACIÓN

Dos horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

La **Aspartato Aminotransferasa** (AST), inicialmente llamada Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino, aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de la enzima Malato Deshidrogenasa (MDH) y Nicotín Adenin Dinucleótido reducido (NADH):



Fuente: Lehninger, 2007

La velocidad de la disminución de la concentración del NADH en el medio, determinada fotocolorimétricamente, es proporcional a la concentración catalítica de la enzima Aspartato Aminotransferasa (AST) en la muestra ensayada.

Por otra parte, la **Alanina Aminotransferasa** (ALT), inicialmente llamada Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la L-alanina al α -oxoglutarato con formación de L-glutamato y piruvato. El oxalacetato producido es reducido a lactato en presencia de la enzima Lactato Deshidrogenasa y Nicotín Adenin Dinucleótido reducido (NADH):



Fuente: Lehninger, 2007

Este es un método estándar optimizado según las recomendaciones de la IFCC (Internacional Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

MATERIAL Y REACTIVOS

Material	Reactivos
Centrífuga	Kit para determinar GOT(AST), el cual incluye:
Guantes de látex	1. R ₁ : TRIS pH 7.8 (80mmol/L)
Jeringa de 3 mL	2. L- Aspartato (200 mmol/L)
Dos tubos de ensaye	Kit para determinar GPT(ALT), el cual incluye:
Micropipetas de 100 y 1000μL	1. R ₁ : TRIS pH 7.8 (80mmol/L)
Termobañó	Heparina
Espectrofotómetro	Solución de Cloruro de Sodio 0.9%
Celdas	

PROCEDIMIENTO

1. Extraer 2 a 3 ml de sangre venosa y colocarla en un tubo de ensayo sin anticoagulante. Los donantes no requieren estar en ayuno. La sangre se deja reposar en el tubo durante unos minutos; se produce la coagulación de la muestra, obteniéndose dos fracciones: a. El coágulo, constituido principalmente por las células y b. El líquido excluido del coágulo denominado suero. El suero se diferencia del plasma porque carece de fibrinógeno (que ha sido convertido en la fibrina del coágulo), protrombina y otros factores de la coagulación consumidos durante dicho proceso, y por contener además, en baja concentración, sustancias de importancia



- fisiológica liberadas por las plaquetas durante la coagulación, por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).
2. Centrifugar 15 minutos a 2000 rpm con el propósito de obtener el suero de la sangre.
 3. Reconstituir el reactivo del Kit con 2mL de la solución buffer.
 4. Preparar la muestra directamente en la celda:

Plasma	100 μ L
Reactivo	1000 μ L

5. Incubar exactamente un minuto a 30°C
6. Pasado el tiempo de incubación, leer la absorbancia inicial en el espectrofotómetro a 340nm.
7. Al cabo de 1, 2 y 3 minutos leer nuevamente. En este tiempo la celda permanecerá dentro del espectrofotómetro.
8. Observar si la variación de la absorbancia por minuto es menor a 0.16; en caso contrario, diluir 0.1 ml de suero con 0.9 ml de NaCl 0.9% y repetir la prueba.

RESULTADOS

1. Aplicar la siguiente fórmula para calcular la actividad de la ALT:

$$U/L = \Delta A \times 1746$$

(RANDOX)*

En donde ΔA es el promedio de la diferencia de las absorbancias. Usar solo los valores obtenidos durante los 2 primeros minutos.

2. Aplicar la siguiente fórmula para calcular la actividad de la AST:

$$U/L = \Delta A \times 1750$$

(SPINREACT)*

En caso de haber diluido el suero, multiplicar el resultado por 10.



3. La unidad internacional (U) es la cantidad de enzima que convierte $1\mu\text{mol}$ de sustrato por minuto en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L)

4. Reportar

Resultados
Nombre del paciente
Sexo
Valores de Alanina Aminotransferasa (ALT) obtenidos
Valores de Aspartato Aminotransferasa (AST) obtenidos
Referencia de valores normales a 30°C
Nota: La marca del kit puede cambiar, así que es necesario verificar el FACTOR por el que se debe multiplicar ΔA en el inserto del mismo

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Inactivar con Hipoclorito de Sodio y desechar en la tarja.

CUESTIONARIO

1. Escriba la reacción de la Transaminasa Glutámica Pirúvica (TGP)
2. ¿Cuáles son los valores de referencia de la Transaminasa Glutámica Pirúvica (TGP)?
3. ¿Cuál es el fundamento de la reacción?
4. ¿Dónde se encuentran la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) en el organismo humano?
5. ¿Qué significado tiene una elevación en la concentración de la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP)?

Ejercicios de integración

Con base en el fundamento teórico de la Determinación de la Actividad de las Enzimas Transaminasas, conteste breve y claramente las siguientes preguntas, argumentando su respuesta y haciendo referencia a la bibliografía consultada.



1. En la práctica clínica diaria cuál es el propósito de realizar la determinación de la actividad de las enzimas Transaminasas.
2. Haga un diagrama en el que exponga la participación de la Glutamato deshidrogenasa y la Glutamino sintetasa para producir Glutamina a partir de Amoniac y α Cetoglutarato.
3. Enliste los aminoácidos que son esenciales y los no esenciales para los seres humanos. En este sentido indique los aminoácidos esenciales para un adulto fenilcetonúrico y compárelos con los requerimientos de un adulto normal.
4. ¿Cuántos α aminoácidos participan en el Ciclo de la Urea?
5. Con base en la respuesta anterior ¿Cuántos pueden usarse para la síntesis de proteínas?



Práctica núm. 5 DETERMINACIÓN DE UREA

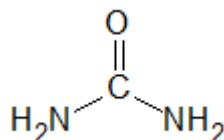
INTRODUCCIÓN

Cuando los aminoácidos de la dieta exceden los requerimientos para la síntesis proteica y otra vía anabólica, el exceso es catabolizado para producir ATP o es convertido a substratos para la síntesis de ácidos grasos.

Es importante tomar en cuenta que sólo los esqueletos de carbono de los aminoácidos y no los grupos amino pueden ser usados en el proceso antes mencionado.

La eliminación del nitrógeno de los aminoácidos es una parte importante en el catabolismo de los mismos, ya que es tóxico para el cerebro en forma de amonio, por lo que el organismo humano lo debe de eliminar en forma de urea, compuesto no tóxico, soluble en agua cuya única función en el metabolismo es la excreción de nitrógeno.

La urea es uno de los constituyentes nitrogenados no proteicos (NNP) más abundantes en el cuerpo; los demás son la creatinina, el ácido úrico, el amonio y los aminoácidos.



Estructura de la Urea
Fuente: Lehninger, 2015

La urea es el principal producto nitrogenado de desecho del metabolismo de las proteínas y sólo se sintetiza en el hígado. Su concentración es igual en todos los líquidos corporales, con excepción de la sangre entera debido a la diferencia de valores que existe entre el suero y los eritrocitos. Por lo tanto, se prefiere el suero o plasma a la sangre entera para analizar el nitrógeno de la urea.



El Ciclo de la Urea es el proceso que consiste en la formación de urea a partir de amoníaco. Esta es llevada a través de la sangre a los riñones, los cuales filtran la urea de la sangre y la depositan en la orina. Un hombre adulto elimina aproximadamente unos 28 g de urea por día.

La urea puede determinarse en el hombre en muestras como: la sangre o la orina, por diferentes métodos, los más usados son los métodos enzimáticos.

PROPÓSITO

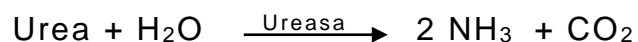
Al término de la práctica el alumno tendrá la capacidad para cuantificar urea en muestras biológicas humanas como la orina o la sangre.

TIEMPO DE REALIZACIÓN

Dos horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

La urea se hidroliza en presencia de agua y ureasa para producir amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco producido en la primera reacción se combina como α -oxoglutarato y NADH en presencia de la enzima Glutamato Deshidrogenasa para producir glutamato y NAD^+ .



La muestra puede ser suero, plasma heparinizado, EDTA plasma u orina (Diluir la orina 1:20 con agua destilada).



Valores normales:

Suero	1.7 - 8.3 mmol/l	10 – 50 mg/dl
Orina	333 – 583 mmol/24 hrs	20 – 35 g/24 hrs

MATERIAL Y REACTIVOS

Material	Reactivos
Centrífuga	Kit para determinación de Urea:
Jeringa de 3 mL	• Solución Tampón 150 mmol/L, pH 7.6
Dos tubos de ensayo	• Enzima Ureasa, GLDH, NADH, ADP, α -Oxoglutarato
Micropipetas 10 y 1000 μ L	• Solución patrón (referencia) 13.3 mmol/L (80mg/dL)
Espectrofotómetro	
Dos celdas para el Espectrofotómetro	
Guantes de látex	

PROCEDIMIENTO

1. Reconstituir un vial de reactivo Enzima 2 con 15 mL de solución Tampón 1 (estable durante 4 semanas entre 2 y 8°C ó 2 días entre 15 y 25°C).
2. Siguiendo las instrucciones de la tabla, preparar un tubo de ensayo para el blanco y calibrar el Espectrofotómetro a 340 nm. Posteriormente preparar en otro tubo de ensayo la solución patrón (referencia) y terminadas las dos lecturas, preparar la muestra:

	Reactivo blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	10 μ L	0	0
Patrón	0	10 μ L	0
Muestra	0	0	10 μ L
Reactivo	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Mezclar perfectamente			
Incubar exactamente 30 segundos a 37°C			
Calibrar con el blanco			
Leer la absorbancia de Patrón y Muestra a 340 nm. Leer de nuevo al cabo de 1 minuto			



RESULTADOS

Determine la concentración de urea en la muestra problema, aplicando la siguiente relación:

$$\text{Concentración de Urea} = \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{patrón}}} \times \text{Concentración del patrón}$$

En caso de haber usado orina diluida 1:20, multiplicar el resultado por 21.

El método es lineal hasta 50 mmol/L (300 mg/dL) suero o plasma, y 1050 mmol/L (6300 mg/dL) en orina. Para concentraciones superiores diluir la muestra 1 + 1 con una solución de NaCl al 0.9% y repetir la prueba, multiplicar el resultado por 2.

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

1. Inactivar el plasma o suero, así como el paquete globular con Hipoclorito de Sodio y desechar en la tarja.
2. Disponer el contenido de las celdas (blanco, patrón y muestra) en recipiente F.

CUESTIONARIO

1. ¿Explique que indica valores elevados de urea?
2. ¿Explique que indica los valores bajos de urea?
3. ¿Qué papel juega el Fenol en la determinación de la urea?
4. Proponga otro método de cuantificación de la urea.
5. Escriba el Ciclo de la Urea.

EJERCICIOS DE INTEGRACIÓN

Con base en el fundamento teórico de la Determinación de Urea, conteste breve y claramente las siguientes preguntas, argumentando su respuesta y haciendo referencia a la bibliografía consultada.



1. En la práctica clínica diaria cuál es la finalidad de realizar la Determinación de Urea.
2. Escriba una ecuación para la reacción neta del Ciclo de la Urea y demuestre cómo este ciclo se relaciona con el Ciclo de Krebs.
3. ¿Cuántos ATP se requieren para una vuelta del Ciclo de la Urea?
4. ¿En donde se utilizan estos ATP?
5. ¿En qué condiciones los aminoácidos son catabolizados, cuáles son los productos finales de las cadenas de carbono de los aminoácidos glucogénicos? ¿Y para los aminoácidos cetogénicos?



Práctica núm. 6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO DE CHÍCHAROS

INTRODUCCIÓN

El Ácido Desoxirribonucleico (ADN) es el material genético de todos los sistemas vivos y de casi todos los virus. El ADN lleva la información necesaria para dirigir la síntesis de proteínas y la duplicación de la misma molécula. Esta biomolécula fue detectada en el núcleo celular por el investigador F. Miesher en 1869 y desde los años cuarenta O. Avery y sus colaboradores descubrieron que el material genético está formado de Ácido Desoxirribonucleico.

El Ácido Desoxirribonucleico (ADN) es llamada también la molécula de la vida, está formada por nucleótidos del tipo desoxirribonucleico, que contienen las bases nitrogenadas de Adenina, Guanina, Citosina y Timina. En el ADN la secuencia de nucleótidos se conserva en este alfabeto de cuatro letras; la información para la síntesis de una proteína constituye el gen de esta. De hecho, ningún gen es traducido directamente en proteína. Antes debe ser transcrito en Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm), que es específico y complementario del gen. Este ARNm es traducido después en proteína gracias a un diccionario bilingüe, "el código genético" a un grupo de tres nucleótidos en el ARN y por consiguiente en el gen, correspondiendo a un aminoácido determinado.

Para estudiar el ADN es imprescindible aislarlo e identificarlo. Existen diferentes métodos de aislamiento, dependiendo del tipo de estudio o investigación que se quiera realizar. Sin embargo, todos los métodos comparten el hecho de que es una molécula situada al interior de estructuras membranosas y está asociada con proteínas, entonces se requiere usar sustancias adecuadas para obtener al ADN de la forma más purificada posible.



PROPÓSITO

Al terminar la práctica el alumno habrá desarrollado las habilidades de extracción y aislamiento del Ácido Desoxirribonucleico de chícharos.

TIEMPO DE REALIZACIÓN

Cuatro horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

La Biología Molecular es una de las herramientas más útiles que emplea hoy en día la ciencia y la medicina moderna. La obtención de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de los análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades de ADN es posible amplificar genes específicos *in vitro* a través de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction). Esta revolucionaria técnica le valió a su inventor, Kary B. Mullis, el premio Nobel de Química en 1993.

En algunas circunstancias, cuando no es posible obtener muestras de sangre, el ADN obtenido a partir de cabellos o bulbos capilares puede ser utilizado para análisis genéticos. Tomar una muestra de cabello es sencillo, permite el muestreo de un gran número de sujetos en menor tiempo, con un mínimo de aflicción causada. Sin embargo, extraer un cabello (junto con el bulbo capilar) puede ser doloroso en algunas situaciones e imposible en animales de laboratorio carentes de pelaje.

La extracción de ADN de diversas fuentes celulares requiere una serie de etapas básicas: En primer lugar tiene que romperse la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación debe romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN. Los jabones utilizados como lavavajillas emulsionan los lípidos de las membranas celulares y las rompen. La sal evita la unión de las proteínas al



ADN. Para aislar el ADN hay que hacer que precipite en alcohol. El ADN es soluble en agua, pero cuando se encuentra en alcohol se desenrolla y precipita en la interfase entre el alcohol y el agua. Además de permitirnos ver el ADN, el alcohol separa el ADN de otros componentes celulares, los cuales son dejados en la solución acuosa.

La técnica utilizada en esta actividad experimental se basa, por un lado, en el principio de que el componente fundamental de las membranas plasmática y nuclear son los lípidos, en consecuencia, se utiliza un detergente (surfactante) para romper estas estructuras y permitir la salida del ADN. Por otro lado, el ADN de vegetales y animales se encuentra asociado a proteínas de tipo histona, por lo tanto, al agregarle alcohol, se precipitan las proteínas y de esta forma se obtiene el ADN como una estructura más pura. Finalmente, como el ADN es una molécula de carácter ácido es posible identificarlo con colorantes específicos como el anaranjado de acridina.

MATERIAL Y REACTIVOS

Material

3 vasos de precipitado de 100 ml (en su caso uno de 100 ml y dos de 50 ml)
1 varilla de vidrio
1 caja de Petri
1 pipeta Pasteur
1 mortero
1 mortero
1 Microscopio de Contraste de Fases
1 portaobjetos
1 cubreobjetos

Reactivos

- 10 ml. de agua desionizada o destilada
- 20 ml. de Desoxicolato de Sodio (1 g de Desoxicolato de Sodio en 60 ml de agua destilada o desionizada).
Nota: Se puede sustituir el Desoxicolato de Sodio por detergente Roma
- 20 ml de Etanol absoluto o al 95% FRIO (el alcohol debe estar a 4°C por lo menos 1 hora antes de iniciar la actividad y permanecer en hielo durante todo el experimento)
- Colorante Anaranjado de Acridina

Material biológico

10 g de chícharos

Recomendación: Lavar el material de vidrio perfectamente si se utilizará más de una vez para evitar contaminación en el proceso de extracción y aislamiento.



PROCEDIMIENTO

1. Sacar los chícharos de su vaina.
2. Pesar en una caja de Petri 10 g de chícharos.
3. Triturar los chícharos en un mortero con 10 ml de agua desionizada o destilada hasta que quede una masa homogénea y semilíquida.
4. Filtrar el sobrenadante obtenido en cada trituración en el vaso de precipitados con ayuda de una coladera o a través de una gasa.
5. Verter el líquido en otro vaso de precipitados, añadir 20 ml. de desoxicolato de sodio y agitar SUAVEMENTE con la varilla de vidrio. Anotar lo que sucede.
6. Incorporar LENTAMENTE 20 ml de etanol, resbalando por las paredes de la probeta y esperar por lo menos dos minutos para observar unos filamentos blanquecinos de "ADN" extraído por esta técnica (Ver Figura A y B), algunos de estos filamentos quedan adheridos a la varilla de vidrio. SOLO SI ES NECESARIO, AGITAR LENTAMENTE EN FORMA ROTATORIA Y EN LA MISMA DIRECCIÓN.
7. Tomar una muestra de los filamentos blanquecinos con la varilla de vidrio o una pipeta Pasteur y colocarlos sobre el portaobjetos.
8. Añadir una gota de colorante anaranjado de acridina y colocar el cubreobjetos.
9. Reportar los filamentos observados al microscopio con los objetivos 10x y 20x

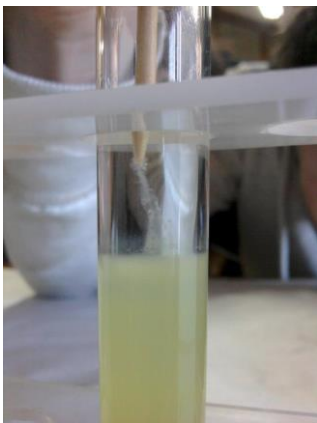


Figura 1a



Figura 1b

Extracción y aislamiento de ADN
Fuente: WordPress, 2017



10. Obtenido el precipitado se saca con un agitador de vidrio con movimientos circulares.
11. Disolver el DNA en 5 ml de agua y determinar la absorbancia a 260 y 280 nm.

Resultados

Longitud de Onda	Absorbancia
260 nm	
280 nm	

La cuantificación del ADN total extraído se realiza por la medida de la absorbancia a 260 nm, dado que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 ng/μl. La medida de la pureza se realiza midiendo la absorbancia a 280 nm, siendo el coeficiente de absorbancias 260/280 el que indica la pureza de la solución. Un cociente de 1.8 indica que la solución es de ADN es puro, valores inferiores indican una contaminación por proteínas o polifenoles mientras que si la relación es de 2.0 se trata de ARN puro ¿De acuerdo a las lecturas a 260 y 280 nm diga usted si el DNA obtenido es puro?

CUESTIONARIO

1. Explique qué sucede en cada uno de los pasos de esta técnica
2. ¿Por qué las lecturas en el espectrofotómetro para determinar la pureza del ADN se realizan a 260 y 280 nm?
3. ¿Cuál es la razón para emplear anaranjado de acridina para observar los filamentos de ADN en el microscopio?
4. ¿Cuál es la función del ADN en los sistemas vivos?
5. Explica en qué consiste la replicación del ADN



DISPOSICION DE RESIDUOS

1. Los residuos de la trituración de los chícharos se deben colocar en un recipiente para desechar los materiales orgánicos.
2. Los sobrenadantes obtenidos que contiene Etanol se inactivan con Hipoclorito de Sodio y se colocan en el recipiente A.

EJERCICIOS DE INTEGRACIÓN

Con base en el fundamento teórico del Aislamiento y Purificación del Ácido Desoxirribonucleico, conteste breve y claramente las siguientes preguntas, argumentando su respuesta y haciendo referencia a la bibliografía consultada:

1. En la práctica clínica diaria cuál es la finalidad de identificar el ADN en pruebas genéticas.
2. ¿Por qué se emplean muestras de ADN mitocondrial para las pruebas genéticas?
3. ¿Por qué razón no se emplea el Ácido Ribonucleico para las pruebas genéticas?
4. Desde el punto de vista biológico ¿Tiene ventajas que el ADN sea estable? Argumente porqué sí o porqué no.
5. ¿Por qué aumenta la absorbancia cuando se desenrolla la molécula de ADN?



Práctica núm. 7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO DE LEVADURA DE PANIFICACIÓN

INTRODUCCIÓN

Los Ácidos Desoxirribonucleico (ADN) y Ribonucleico (ARN) son polímeros de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos (Desoxirribosa en el ADN y ribosa en el ARN), una base nitrogenada (que puede ser Adenina, Timina, Citosina, Guanina o Uracilo) y una molécula de fosfato. El ADN es la macromolécula que contiene la información genética de las células procariontes, eucariontes y de los adenovirus. El ARN está involucrado en la síntesis de proteínas y constituye el material genético de los retrovirus (Madigan *et al.*, 2000).

La expresión de los genes es la base del metabolismo celular y por ésta se entiende que el ADN se transcribe en ARN, que a su vez se traduce en proteínas. Esta secuencia ADN-ARN-proteínas constituye el “Dogma Central de la Biología Molecular”. Hay tres tipos de ARN:

- El ARN mensajero (ARNm), que se sintetiza durante la transcripción gracias a la ARN polimerasa; está conformado por codones, que son secuencias de tres pares de bases que codifican un aminoácido.
- El ARN de transferencia (ARNt) permite el vínculo entre el ARNt y los aminoácidos, ya que en un extremo cuenta con un aminoácido y en el otro, con una secuencia de tres pares de bases llamada anticodón, a la que se une el codón del ARNm.
- El ARN ribosomal (ARNr), que constituye la mayor parte del ARN en las células, integra junto con las proteínas a los ribosomas, facilitando el acoplamiento específico entre el ARNm y los ARNt para la traducción; los ribosomas están compuestos por tres subunidades de ARNr de diferentes tamaños en los eucariontes (23S, 18S y 5S) y procariontes (23S, 16S y 5S).



PROPÓSITO

Al finalizar la práctica el alumno habrá desarrollado la habilidad para extraer y purificar ARN de levadura de panificación.

TIEMPO DE REALIZACIÓN

Cuatro horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los ácidos nucleicos, debido a su interrelación con otras moléculas, resultan bastante difíciles de separar; por ejemplo, cuando los ácidos nucleicos se encuentran unidos a las proteínas o a los polisacáridos se deben emplear métodos suaves, ya que los tratamientos drásticos alteran profundamente su estructura y característica, por lo que a menudo se encuentra un considerable grado de impurezas en las preparaciones no analíticas.

El ARN no tiene la estructura altamente regular que posee el ADN, ni presenta la relación constante entre las bases que son características del ADN. También es más difícil estudiarlo debido a que se presenta en varias formas diferentes en una misma célula. La mayor variabilidad en la estructura del ARN se debe, en parte, a la naturaleza misma de los nucleótidos que lo constituyen. Los nucleótidos de ribosa tienen dos grupos hidroxilos en el azúcar en estado libre, mientras que los nucleótidos de desoxirribosa presentan solo uno. Otro factor que contribuye a la variabilidad en la estructura del RNA es la mayor frecuencia de bases poco comunes tales como Metilcitosina y Metilguanina.

Los métodos de aislamiento, dependen del tipo o condiciones en que se requiere el ARN, los más usados son:

1. Extracción con Ácido Tricloroacético-Cloruro de Sodio: Consiste en la precipitación con Ácido Tricloroacético de moléculas cargadas, lavando con acetona, para eliminar lípidos y la extracción final del ARN con



Cloruro de Sodio (NaCl) al 10% y posteriormente precipitar con alcohol. El ARN así obtenido está poco degradado y contiene trazas de ADN.

2. Extracción con fenol: Consiste en la extracción con soluciones fenólicas concentradas, desnaturalizando proteínas, rompimiento de la emulsión Fenol-Agua por centrifugación, conteniendo en la fase inferior (fenólica) el ADN y en la superior (acuosa) ARN y carbohidratos con proteínas desnaturalizadas en ambas fases. Eliminación por centrifugación de proteínas y precipitando con alcohol el ARN. El producto está contaminado con polisacáridos, principalmente Glucógeno, pero libre de ADN.

MATERIAL Y REACTIVOS

Material	Reactivos
Vasos de precipitado de 150 ml	Fenol al 90%(v/v)
Probeta de 25 ml	Agua destilada a 37°C
Agitador de vidrio	Etanol absoluto frío
Pipeta Pasteur	Solución de Acetato de Potasio al 20%
Baño María	pH 5
Vidrio de reloj	Éter etílico
Caja Petri desechable	Solución de Etanol-Agua (3:1)
Pipetas de 10 ml	

PROCEDIMIENTO

1. Pesar 5 g de levadura de panificación.
2. Suspender la levadura en 20 mL de agua destilada a 37°C. Deje reposar 15 minutos a esta temperatura.
3. Agregar 25 mL de la solución de Fenol 90%. **CAUIDADO EL FENOL PRODUCE QUEMADURAS.**
4. Agite mecánicamente la suspensión durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos (de preferencia a 5°C) para romper la emulsión.



6. Con la pipeta Pasteur remueva cuidadosamente la capa superior acuosa.
7. Colocar la fracción acuosa superior y capa intermedia en un tubo y centrifugar a 3000 rpm (de preferencia a 5°C), durante 15 minutos para separar la proteína desnaturalizada.
8. Decantar y medir el volumen de sobrenadante obtenido. Añadir 1 mL de Acetato de Potasio al 20% pH 5.0 por cada 10 ml de sobrenadante.
9. Enfriar en baño de hielo por espacio de una hora el sobrenadante y precipitar el ARN añadiendo 2 volúmenes de Etanol absoluto frío.
10. Centrifugar a 2000 rpm. durante 5 minutos.
11. Suspender el precipitado en aproximadamente 5 mL de Etanol-Agua (3:1) a temperatura ambiente y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.
12. Repetir el paso número 12 con Etanol absoluto y después con Éter.
13. Secar al aire y pesar. (Nota: El contenido de ARN en levaduras es alrededor del 4% de su peso seco)

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

1. La fase fenólica posterior a la centrifugación disponerla en recipiente F.
2. Las fases etanólica y etérea obtenidas después de la centrifugación disponerlas en contenedor A.

CUESTIONARIO

1. Calcular el rendimiento de la extracción de ARN
2. ¿Explicar cuál es la función de los siguientes reactivos en la práctica Fenol, Etanol absoluto y Éter?
3. ¿De qué otras fuentes sería posible obtener ARN y que modificaciones haría en la técnica de identificación y aislamiento?



EJERCICIOS DE INTEGRACIÓN

1. Con base en el concepto de niveles de estructura (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) como se definen para las proteínas. ¿Qué nivel muestra el ADN de doble cadena, el ARNm y el ARNt?
2. ¿Por qué el ARN es más vulnerable a la hidrólisis alcalina que el ADN?



Práctica núm. 8 DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN ACIDO RIBONUCLEICO

INTRODUCCIÓN

El ADN y ARN se caracterizan por la posesión de un elevado número de grupos fosfato, que pueden ser liberados por hidrólisis y determinados mediante la interacción con el Azul de Molibdeno. Esta es una aproximación a la determinación de los niveles de los ácidos nucleicos que sólo se puede emplear en disoluciones purificadas, otras pruebas más específicas son la de Difenilalanina y del Orcinol, utilizables para la desoxirribosa y sus derivados y la ribosa y sus derivados, respectivamente. Aquí se utilizan reacciones de sus componentes para la determinación cuantitativa de los ácidos nucleicos, con posibilidades, además, de diferenciarlos con facilidad ya que el DNA y derivados no reaccionan con el Orcinol y el RNA y sus derivados no reaccionan con la Difenilalanina.

Por ejemplo, la heterogeneidad del RNA total obtenido de hígado de rata, se puede poner de manifiesto por su resolución mediante una columna, situación en la que se obtienen números picos distintos dependiendo de sus pesos moleculares y bajo condiciones muy controladas de extracción podrían servir para aislamiento parcialmente purificado de algunas clases de RNA de bajo peso molecular.

Existen algunas pruebas coloridas específicas de las purinas, nucleósidos y nucleótidos que sirven fundamentalmente para reconocer a la ribosa y a la desoxirribosa en muy pequeñas cantidades o en desarrollo cromatográfico, así también se puede identificar elementos presentes; como por ejemplo el fósforo, la mayoría de los métodos para el análisis del fósforo se basan en la ruptura del ortofosfato, dando lugar a una forma insoluble que puede determinarse después por métodos gravimétricos, nefelométricos o polarográficos.



PROPÓSITO

Al finalizar la práctica el alumno habrá cuantificado el fósforo presente en la muestra obtenida de levadura de panificación.

TIEMPO DE REALIZACIÓN

Cuatro horas

FUNDAMENTO TEÓRICO

El ión fósforo es un elemento ampliamente distribuido en el cuerpo humano, constituye el principal anión encontrado dentro de las células y se encuentra fisiológicamente relacionado con diversas funciones metabólicas importantes. Está involucrado en el metabolismo de los carbohidratos como intermediario fundamental y sirve como donante de fosfatos de alta energía (ATP) durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Esta fuente de energía mantiene muchas funciones fisiológicas como contractilidad muscular, funciones neurológicas y transporte de electrolitos.

El fósforo, además es un componente estructural de otras sustancias fisiológicamente importantes: ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos (NADP, NADPH), los cuales son importantes en sistemas enzimáticos. El fósforo constituye un elemento esencial en la membrana celular fosfolípida, en las fosfoproteínas, contribuye a mantener la concentración crítica intracelular y proporciona sustrato para la mineralización de los huesos.

La determinación del fósforo inorgánico se efectúa con el empleo de diferentes métodos como son la titulación acidimétrica, procedimientos enzimáticos, la determinación fotométrica del compuesto no reducido a 340 nm, la determinación fotométrica en el espectro visible de la reacción del fósforo con diferentes compuestos cromogénicos entre ellos el Ácido Molibdivanadofosfórico, el compuesto formado con verde de malaquita, entre otros.

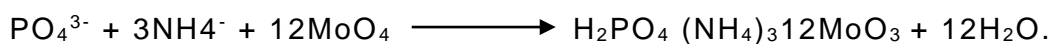


De los métodos mencionados, el Método Ultravioleta (UV) presenta mayor aceptación. Este método se basa en las modificaciones hechas al método propuesto por Daly y Ertingshausen en 1972, el cual establece que la mayoría de los métodos para la determinación del Fósforo inorgánico se basan en la reducción de un complejo de Fosfomolibdato con un agente reductor, dando por resultado la posterior formación de azul de molibdeno. Este método posee varias ventajas entre las que se incluyen mayor sensibilidad, estabilidad, simplicidad y rapidez.

El fundamento de la técnica se basa en la reacción de los molibdatos con los fosfatos para formar compuestos como el Fosfomolibdato Amónico $((\text{NH}_4)_3[\text{P}(\text{MO}_3\text{O}_{10})_4])$ que presentan un máximo de absorción en la zona del espectro ultravioleta, a una longitud de onda de 340 nm.

El fósforo inorgánico reacciona con el Molibdato de Amonio en presencia de Ácido Sulfúrico para producir un complejo de Fosfomolibdato no reducido. El incremento en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de fósforo inorgánico en la muestra:

Fósforo inorgánico + Molibdato de Amonio \longrightarrow Complejo de Fosfomolibdato no reducido (compuesto amarillo)





Estructura del Ácido Ribonucleico de Transferencia



Fuente: Nelson, 2015

MATERIAL Y REACTIVOS

Material

Diez tubos de ensayo
Tres pipetas de 1.5 y 10 mL
Tres matraces de digestión
Dos matraces aforados de 10 mL
Digestor
Baño María a 37°C
Fotocolorímetro
Termómetro

Reactivos

Ácido Sulfúrico 2.5M
Ácido Sulfúrico 0.25M
Cloruro de Sodio 0.15M
Molibdato de Amonio al 5%
Ácido Amino-Naftol-Sulfónico
Sulfito de Sodio
Bisulfito de Sodio
Solución tipo de Fósforo (30 mg/ mL)
Solución de ARN obtenido de la levadura de panificación.

PROCEDIMIENTO

Primera Fase Digestión

1. Reconstituir la muestra de ARN obtenida en la práctica anterior con dos mililitros de solución isotónica de Cloruro de Sodio y etiquetar como "problema"
2. Etiquete los dos matraces de digestión: uno como "testigo" y otro como problema.
3. En el matraz "testigo" coloque los siguientes reactivos: 1 mL de Ácido Sulfúrico 2.5M y 0.2 mL de NaCl 0.15M; en el matraz



- "problema" coloque 1 mL de Ácido Sulfúrico 2.5M y 0.2 mL de solución de ARN de levadura de panificación.
4. Digerir las muestras durante 10 minutos, contando el tiempo al iniciarse el desprendimiento de vapores blancos (hacerlo en campana y digestor).
 5. Terminada la digestión, enfriar los matraces y pasar su contenido cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL, haciendo lavados repetidos al matraz de digestión con alícuotas de 1 mL de agua destilada, pero sin llegar al volumen de aforo (aproximadamente 3 mL menos).
 6. Adicionar a cada matraz, testigo y problema, 0.4 mL de molibdato de amonio y 0.4 mL de solución reductora.
 7. Aforar los matraces con agua destilada y calentar a 37°C en baño María, durante 50 minutos
 8. Leer en el fotocolorímetro con filtro rojo a 660 nm ajustando el aparato con el blanco de la curva patrón.

Segunda Fase Curva tipo de calibración

Preparar 7 tubos de ensayo debidamente etiquetados como lo indica la siguiente tabla:

Tubo	Solución patrón de Fósforo (mL)	Acido Sulfúrico 0.25 M (mL)	Molibdato de Amonio al 5 % (mL)	Solución reductora (mL)
Blanco	0.0	9.2	0.4	0.4
1	0.1	9.1	0.4	0.4
2	0.2	9.0	0.4	0.4
3	0.4	8.8	0.4	0.4
4	0.8	8.4	0.4	0.4
5	1.2	8.0	0.4	0.4
6	1.5	7.7	0.4	0.4



Incubar la serie de 7 tubos a 37°C en baño María durante 50 minutos enfriar y leer en el fotocolorímetro con filtro rojo (660 nm). Calibrar el equipo con el tubo etiquetado como BLANCO.

RESULTADOS

1. A partir de la solución patrón de Fósforo realice los cálculos de la concentración de Fósforo correspondiente en cada tubo de la curva de calibración y registre sus resultados en la siguiente tabla:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Absorbancia						
Concentración de Fósforo						

2. Utilice los resultados de la tabla anterior para elaborar la gráfica correspondiente a Absorbancia contra Concentración de Fósforo.
3. Calcule la concentración de Fósforo de la solución problema interpolando la absorbancia obtenida en la misma. Restar al problema el valor de absorbancia del testigo.

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Verificar el pH del contenido de los tubos y neutralizar. Disponer en el contenedor D.

CUESTIONARIO

1. Calcular el porcentaje de Fósforo en el problema.
2. Calcular el porcentaje de Fósforo respecto al peso inicial del hígado.
3. Mencione algunas pruebas específicas para los otros compuestos que contienen Ácidos Nucleicos.
4. En caso del que el RNA estuviera contaminado con carbohidratos ¿Cuál sería su influencia en los resultados?



EJERCICIOS DE INTEGRACIÓN

1. Haga un esquema de una estructura típica en forma de trébol del ARN de transferencia. Destaque cualquier similitud entre la forma de trébol y la estructura propuesta para el ARN ribosomal.
2. ¿Con base en el diagrama anterior, cuál considera de las dos estructuras (ARNt o ARNr) presenta mayor cantidad de puentes de Hidrógeno y por qué?
3. ¿Explique por qué el ARNm y el ARNr se degradan con mayor rapidez en la célula?



BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson L., D., Cox, M. M. (2015). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. México: Omega.
2. Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R., Anthony-Cahill, S.J. (2013). *Bioquímica*. México: Pearson.
3. Stryer, L. (2013). *Bioquímica*. México: Reverte.
4. Voet, D., Voet, J. G., Pratt, Ch. (2016). *Fundamentos de Bioquímica*. España: Medica Panamericana.
5. Orten, J. M., Neuhaus, Otto W., Wasserman, A. V. (2003). *Bioquímica Humana*. México: Panamericana.
6. Mendiola, R. G. 1999. Aislamiento del ADN en Células Animales y Vegetales. Colegio de Ciencias y Humanidades. Plantel Naucalpan. UNAM.
7. Murray R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J. Rodwell, V. W., Weil, P. A. (2013). *Bioquímica de Harper Ilustrada*. México: McGraw Hill Lange.
8. Mckee T, Mckee, B. J., (2014). *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. México: McGraw-Hill.
9. Piña, G. E., Laguna, J. (2013). *Bioquímica de Laguna*. México. El Manual Moderno.
10. Diaz, C., Juárez, M. (2007). *Bioquímica*. México. McGraw-Hill interamericana
11. Campbell, M. K, Farrell, S. O. (2016). *Bioquímica*. México: Cengage Learning.
12. Velasco, S. J. y Merchán, M. 1998. *Biología y Ecología*. España: Editex.



ANEXOS



ANEXO núm. 1

Preparación de reactivos especiales para

Bioquímica Metabólica



Preparación de reactivos especiales para Bioquímica Metabólica

1. **Reactivo de Molibdato:** Pesar 68 g de Molibdato de Sodio y 0.4 de Sulfato de Hidracina, disolver en 100 mL de agua. Añadir 100 mL de Ácido Sulfúrico concentrado. Enfriar y aforar a un litro con agua.
2. **Reactivo de Ninhidrina:** Disolver 0.5 g de Ninhidrina en 100mL de n-Butanol.
3. **Reactivo de Bismuto:**
4. **Solución A:** Disolver 1.7 g de Nitrato de Bismuto en 100 mL de Ácido Acético al 20% en agua (v/v).
5. **Solución B:** Disolver 40 g de Yoduro de Potasio en 100 mL de agua destilada.
6. Cuando se va a utilizar se mezclan 4 mL de solución A con 20 mL de Ácido Acético al 20% y 1 mL de solución B.
7. **Solución Reductora** (para cuantificar fósforo): Mezclar 0.5 g de Ácido 1-amino-2-Naftolsulfónico con 195 mL de Bisulfito de Sodio al 15% y adicionar 5 mL de Sulfito de Sodio al 20%. Calentar ligeramente. Conservar en frasco ámbar, cerrado herméticamente.



ANEXO núm. 2

Lineamientos del Laboratorio



Lineamientos de Laboratorios

Facultad de Química
Subdirección Administrativa
Coordinación de Laboratorios

Versión Vigente No.	01	Fecha:	30/06/2016
---------------------	----	--------	------------

1. Propósito

Establecer los lineamientos para salvaguardar la vida, salud e integridad de la comunidad así como el cuidado de las instalaciones, dentro de los laboratorios de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

2. Alcance

El presente lineamiento es aplicable a los laboratorios de la Facultad de Química, en sus tres unidades: Colón, Cerrillo y Rosedal, donde se realice trabajo experimental, sea de docencia, servicios o de investigación. Estos sitios, para efectos del presente documento, serán denominados “laboratorios” y su observancia es obligatoria para personal académico (docentes, investigadores y jefes de departamento), administrativos, alumnos y visitantes.

3. Normas de disciplina y organización

- Durante la estancia en el laboratorio, independiente de la actividad que se realice y por seguridad de la comunidad de la Facultad de Química, TODA PERSONA debe de utilizar: bata de manga larga (preferentemente de algodón y abrochada), cabello recogido y zapato cerrado.
- Queda prohibido: introducir y/o consumir alimentos y/o bebidas, fumar, mascar chicle, usar lentes de contacto, perforaciones faciales (pearcings), zapatos altos de tacón, sandalias o zapato abierto, utilizar audífonos, gorra, correr, empujar y jugar dentro del laboratorio.
- Al escuchar la sirena de alarma de la Facultad o voz de emergencia, inmediatamente cerrar las llaves de gas, aire, agua, vacío, apagar todo equipo eléctrico, atender las instrucciones de los brigadistas y de manera ordenada y rápida salir del laboratorio (no correr, no gritar y no empujar), siguiendo los señalamientos de ruta de evacuación para dirigirse al punto de reunión.
- Nunca deberá estar una persona sola trabajando en los laboratorios, mínimo deberán de estar dos personas; una de ellas deberá ser el docente responsable.
- En periodos vacacionales se deberá solicitar vía oficio la autorización para el ingreso a los laboratorios; especificando el día y el horario con el Visto Bueno del docente responsable. Es importante mencionar que el profesor responsable deberá estar presente en la fecha y horario indicados en el oficio.



4. Con aplicación especial en las prácticas de docencia

- Los reactivos con los que se cuenten en los laboratorios de docencia son para uso exclusivo de las prácticas, no deberán ser utilizados para proyectos de posgrado o de investigación.
- El documento Manual de prácticas de laboratorio de la asignatura deberá ser entregado con una anticipación de 30 días a la coordinación de laboratorios (en forma física o electrónica) para poder hacer uso de las instalaciones.
- Es obligación del docente la actualización del documento Manual de prácticas de Laboratorio de su asignatura.
- En las situaciones de las prácticas dirigidas a “Proyectos” se deberá establecer una lista de los reactivos a los cuales los estudiantes tendrán acceso para su experimentación, la cual no se podrá modificar durante el semestre y se tendrán que adaptar los proyectos a esta.
- El desarrollo de prácticas de laboratorio debe realizarse en presencia del docente titular de la práctica. Quedando prohibido que los estudiantes permanezcan sin supervisión durante esta.
- Para utilizar los reactivos, el personal académico deberá solicitarlo al personal técnico de laboratorio, entregando una identificación actualizada (Credencial de elector o de la Facultad).



ANEXO núm. 3

REGLAMENTO INTERNO DE

LABORATORIOS



Reglamento Interno de Laboratorios

Facultad de Química
Subdirección Administrativa
Coordinación de Laboratorios

Versión Vigente No.	01	Fecha:	18/04/2016
---------------------	----	--------	------------

1. Propósito

Establecer la reglamentación para salvaguardar la vida, salud e integridad de la comunidad así como el cuidado de las instalaciones, dentro de los laboratorios de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

2. Alcance

El presente reglamento es aplicable a los laboratorios de la Facultad de Química, en sus tres unidades: Colón, Cerrillo y Rosedal, donde se realice trabajo experimental, sea de docencia, servicios o de investigación. Estos sitios, para efectos del presente documento, serán denominados “laboratorios” y su observancia es obligatoria para personal académico (docentes, investigadores y jefes de departamento), administrativos, alumnos y visitantes.

3. Normas de disciplina y organización

- Durante la estancia en el laboratorio, independiente de la actividad que se realice y por seguridad de la comunidad de la Facultad de Química, se debe de usar: bata de manga larga (preferentemente de algodón y abrochada), cabello recogido y zapato cerrado. En forma adicional, el personal académico define el uso de: lentes de seguridad, careta y demás Equipo de Protección Personal (E.P.P.).
- Queda prohibido: introducir y/o consumir alimentos y/o bebidas, fumar, mascar chicle, usar lentes de contacto, perforaciones faciales (pearcings), zapatos altos de tacón, sandalias o zapato abierto, utilizar audífonos, gorras, correr, empujar y jugar dentro del laboratorio.
- Los reactivos, indicadores y medios de cultivos, deben ser manejados y almacenados según el documento: Procedimiento específico de seguridad para el riesgo y almacenamiento de reactivos, indicadores y medios de cultivo, que se encuentra en los cubículos de los laboratorios.
- Cuando se presente un derrame de un producto químico es importante avisar de inmediato al personal académico y al técnico(a) del laboratorio, para que en conjunto se proceda a su neutralización, recolección, registro y disposición, utilizando los materiales de contención apropiados, por ejemplo: material para contención de derrames, cal y/o arena.



- Se prohíbe regresar a los envases originales los remanentes de los reactivos utilizados y se debe tener la precaución de utilizar pipetas o espátulas limpias y secas para su manejo.
- Se prohíbe utilizar reactivos sin identificación, inhalar directamente los reactivos químicos, pipetear con la boca cualquier sustancia (se deberán utilizar perillas) y mover los reactivos del lugar que le fue asignado.
- Se debe de utilizar papel para pesaje o vidrio de reloj para pesar sustancias en la(s) balanza(s) analítica (s) o granataria(s).
- Se prohíbe tirar reactivos, Residuos Peligrosos (RP) químicos o Biológico-Infecciosos (RPBI) en los lavabos, tarjas o al bote de basura.
- En la preparación de soluciones ácidas, se recomienda verter el ácido al agua y no a la inversa.
- Deberá usarse la campana de extracción cuando se empleen sustancias que desprendan humos o vapores tóxicos o irritantes.
- Para la disposición de residuos químicos peligrosos y/o biológicos infecciosos, el personal académico indicará su sistema de tratamiento, registrando al término de cada práctica en la Bitácora de residuos los datos requeridos y únicamente serán depositados en los recipientes adecuados según la Tabla de Clasificación de Contenedores para Residuos Químicos. Para su posterior envío al almacén general de residuos químicos y finalmente a disposición final.
- Al escuchar la sirena de alarma de la Facultad o voz de emergencia, inmediatamente cerrar las llaves de gas, aire, agua, vacío, apagar todo equipo eléctrico, atender las instrucciones de los brigadistas y de manera ordenada y rápida salir del laboratorio (no correr, no gritar y no empujar), siguiendo los señalamientos de ruta de evacuación para dirigirse al punto de reunión.
- En caso de existir un accidente dentro del laboratorio, informar inmediatamente al personal docente y al técnico(a) de laboratorio. Específicamente en caso de incendio y/o quemadura, utilizar los sistemas de seguridad con los que cuentan los laboratorios como: extintores, regaderas, lavaojos, material para contención de derrames y mantas apaga-fuegos.
- Nunca deberá estar una persona sola trabajando en los laboratorios, mínimo deberán de estar dos personas; una de ellas deberá ser el profesor responsable.
- Al terminar la actividad en el laboratorio, antes de retirarse, deberá dejar limpia la mesa de trabajo y se deben cerrar las llaves de agua, aire, vacío y gas.
- En periodos vacacionales se deberá solicitar vía oficio la autorización para el ingreso a los laboratorios; especificando el día y el horario con el Visto Bueno del docente responsable. Es importante mencionar que el profesor responsable deberá estar presente en la fecha y horario indicados en el oficio.
- En cualquier situación no especificada en el presente Reglamento consultar el documento, Lineamientos de Laboratorios de Facultad de Química y hablarlo con las autoridades correspondientes.

4. Con aplicación especial en las prácticas de docencia

- Las prácticas de docencia se llevarán a cabo conforme a lo establecido en los documentos: Manual de prácticas de laboratorio de la asignatura, al horario de



actividades y a los espacios asignados a tal propósito. Salvo casos previamente concertados con las autoridades correspondientes.

- La entrada al laboratorio correspondiente se deberá hacer en el horario asignado con una tolerancia de 10 minutos máximo, y la salida deberá ser 5 minutos antes de la hora programada, comprometiéndose a dejar las instalaciones limpias y para su óptimo uso posteriormente.
- Durante las prácticas de laboratorio, el personal académico es responsable de aplicar lo establecido en el presente documento. El desarrollo de prácticas de laboratorio debe realizarse en presencia del docente titular de la práctica.
- Para pedir los reactivos, el personal académico deberá solicitarlo al personal técnico de laboratorio, entregando una identificación actualizada (Credencial de elector o de la Facultad).
- Para solicitar material de apoyo como: material de vidrio, equipo (ejemplo: parrillas) para realizar la práctica de laboratorio, se debe pedir al personal técnico de laboratorio, entregando una identificación actualizada (Credencial de elector o de la Facultad).
- Al terminar la práctica, el usuario se compromete en regresar al personal técnico el material, equipo y reactivos en óptimas condiciones y limpios, a la entrega correspondiente se le devolverá su identificación.
- En caso de deterioro de material y equipo el usuario deberá reparar el daño físico o adquirir uno nuevo por su cuenta para recuperar su identificación, a la brevedad posible.



Anexo núm. 4

Formato del Reporte de Laboratorio



Laboratorio de Bioquímica Metabólica

Práctica núm. **ESCRIBIR NÚMERO Y
NOMBRE DE LA PRÁCTICA**

Grupo

Núm. de Equipo **ESCRIBIR NÚMERO**

**Integrantes
ESCRIBIR NOMBRES**

Toluca de Lerdo México, Estado de México; a **FECHA DE REALIZACIÓN DE LA
PRÁCTICA**



Práctica núm. ANOTAR NÚMERO Y NOMBRE

OBJETIVO

HIPÓTESIS

MARCO TEÓRICO (FUNDAMENTO DE LA PRÁCTICA. MÁXIMO UNA CUARTILLA)



DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO



RESULTADOS Y OBSERVACIONES

CONCLUSIONES



CUESTIONARIO

EJERCICIOS DE INTEGRACION



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS