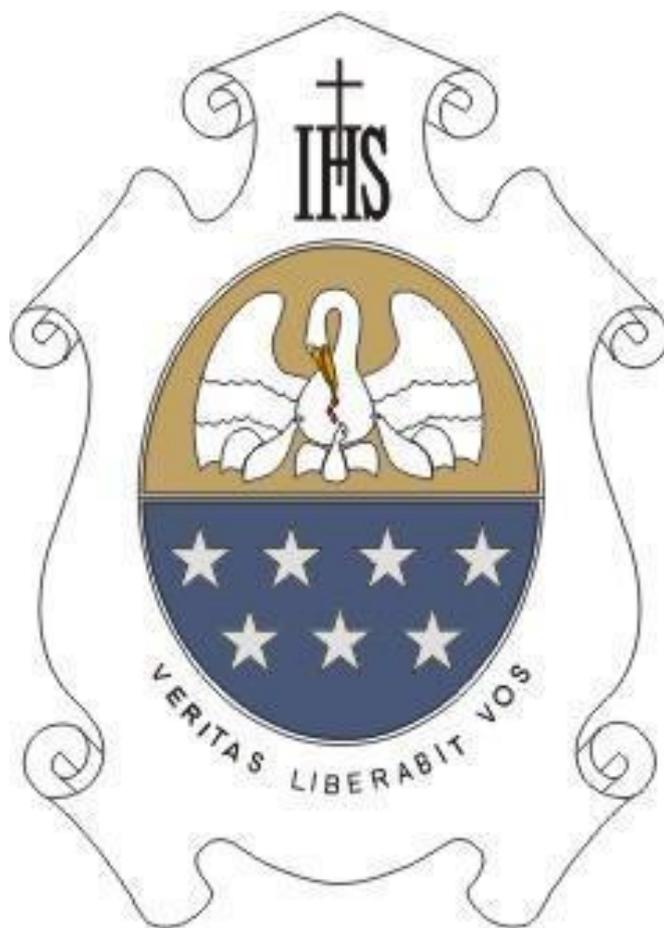


UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CÁTEDRA DE QUÍMICA I



GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

2024

TRABAJO PRÁCTICO N° 1

BIOSEGURIDAD

OBJETIVOS

- Aprender el concepto de bioseguridad y los diferentes riesgos que se pueden encontrar en un laboratorio.
- Incorporar las normas de bioseguridad para el presente trabajo y los próximos prácticos.
- Identificar la peligrosidad de las sustancias químicas a través de pictogramas.

INTRODUCCIÓN

En un laboratorio, hospital o en un lugar de asistencia sanitaria, existen determinados reactivos químicos, sustancias radioactivas y/o muestras biológicas que el operador debe conocer en qué forma manipular para poder desarrollar su tarea eficazmente y sin riesgo. No sólo existen riesgos de contagio de ciertas enfermedades por el contacto con muestras contaminadas, sino que el uso de ciertas sustancias químicas puede acarrear trastornos de salud si el operador no conoce la peligrosidad de las sustancias que está utilizando. Para ello existen un conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud y la seguridad de las personas frente a diferentes riesgos biológicos, químicos y físicos.

Es por ello que podría definirse a la BIOSEGURIDAD como “el conjunto de normas o procedimientos que tienen por objeto, disminuir, minimizar o eliminar los factores de riesgo que puedan llegar a afectar la salud o la vida de las personas o puedan afectar el medioambiente”.

Nuestro objetivo es que el estudiante adquiera conocimientos básicos sobre estas normas de seguridad y tome conciencia del riesgo al que está expuesto en los lugares donde trabajará. De esta manera creará una adecuada conciencia que es necesaria para la seguridad personal, comunitaria y del medio ambiente. El conocimiento de la seguridad y los cuidados a tener en un laboratorio permitirá que los estudiantes trabajen con mayor calidad y eficiencia.

Los *principios de la bioseguridad* se pueden resumir en:

A) Universalidad: Las normas de bioseguridad deben involucrar a todos los y las docentes, pacientes, investigadores, estudiantes, personal de limpieza, etc., de todas las instalaciones. Se deben tomar precauciones de bioseguridad en la manipulación de TODAS las muestras biológicas.

B) Uso de barreras: Evitar la exposición directa a sangre y fluidos orgánicos, sustancias químicas, solventes, etc. mediante la utilización de materiales adecuados que se interpongan al contacto de los mismos (Ej. guantes, barbijo, etc.). El número, tipo y complejidad de las barreras utilizadas dependerá del nivel de bioseguridad en el que se esté trabajando.

C) Medios de eliminación de material contaminado: Comprende el conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados mediante los cuales los materiales contaminados son dispuestos o eliminados sin riesgo.

AGENTES DE RIESGO

Se puede definir a los agentes de riesgo como aquellos elementos que pueden causar un daño en un ámbito específico. En un laboratorio nos podemos encontrar con los siguientes agentes de riesgo:

- Biológicos (ej. microorganismos, muestras humanas o animales, organismos genéticamente modificados).
- Químicos (ej. tóxicos, corrosivos, irritantes, peligrosos para el medio ambiente).
- Físicos (ej. Temperaturas extremas, campos electromagnéticos, descargas eléctricas).

Es posible trabajar con todos estos agentes de riesgo siempre y cuando se utilicen las medidas de seguridad apropiadas. Estas medidas incluirían:

- prácticas apropiadas de laboratorio
- elementos de protección personal
- equipos de protección



MANEJO EFICIENTE DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

El personal que trabaja en laboratorios (profesionales, estudiantes, personal de limpieza), debido a que en su trabajo utilizan sustancias químicas, están expuestos a riesgos relacionados con estas sustancias, que pueden afectar negativamente a su salud y al medio ambiente. La peligrosidad para la salud humana, animal y para el medio ambiente, constituyen la principal razón para establecer en laboratorios un manejo adecuado de sustancias químicas y sus residuos. El manejo eficiente de éstas se refiere al control racional de las diferentes etapas de existencia y utilización de dichas sustancias en el laboratorio. El conocimiento de la peligrosidad de una sustancia química constituye la piedra fundamental sobre la cual se basa un manejo eficiente.

ETAPAS FUNDAMENTALES DEL MANEJO EFICIENTE DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

1. Conocimiento de la peligrosidad de las sustancias químicas.
2. Almacenamiento: En el laboratorio sólo deben conservarse las cantidades de sustancias químicas que sean necesarias para el uso diario. Las cantidades importantes deben guardarse en espacios destinados especialmente a este fin.
3. Buenas prácticas de utilización.
4. Disposición de residuos

Toda sustancia química es potencialmente peligrosa para la salud de quien la manipula. El peligro inherente a una sustancia química, se refiere a la capacidad intrínseca de dicha sustancia para generar un daño. Se define como sustancia química peligrosa, aquella que, por sus propiedades físicas y químicas, al ser manejada, transportada, almacenada o procesada, presenta la posibilidad de riesgos a la salud de las personas expuestas ya sea por contacto, inhalación de sus vapores, ingestión o bien, causar daños a las instalaciones o al medio ambiente (contaminación de aguas, daño a la flora o la fauna).

Podemos clasificar las sustancias peligrosas de acuerdo a su efecto en el organismo:

Asfixiantes: _____

Cancerígenos: _____

Corrosivos: _____

Irritantes: _____

Mutagénicos: _____

Narcóticos: _____

Neumoconióticos: _____

Teratogénicos: _____

Sensibilizantes: _____

CONSIGNA N°1:

Busque y complete el significado de los términos utilizados en la clasificación de sustancias peligrosas.

CONOCIMIENTO DE LA PELIGROSIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS: IDENTIFICACIÓN

Toda sustancia química es potencialmente peligrosa para la salud de quien la manipula. En un laboratorio existen riesgos por el uso de ciertas sustancias químicas que pueden acarrear accidentes y trastornos de salud. Estos trastornos pueden ir desde casos fatales inmediatos, como en la inhalación de vapores de ácido cianhídrico, a problemas a largo plazo, como el contacto frecuente con fenol (hepatotóxico), o-toluidina (cancerígeno), o bromuro de etidio (cancerígeno). Para la manipulación de estas sustancias existen normas básicas de seguridad. El Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS) ofrece un conjunto de criterios armonizados sobre el peligro

de las sustancias químicas. Estos criterios se utilizan en las etiquetas y las fichas de datos de seguridad para informar de los peligros.

De forma general, un pictograma es una imagen o un símbolo que actúa como representación de una idea o palabra. En el caso particular de los pictogramas de seguridad o los símbolos de riesgo químico, estos han sido estandarizados por la Unión Europea. Como su nombre lo indica, el fin de los pictogramas de seguridad es proporcionar información que permite mantener la integridad física de quien manipula un producto o realiza una tarea.

Los pictogramas presentan una combinación particular de formas geométricas, un color y un símbolo. Estas características proporcionan información y su comprensión debería ser universal, buscando que sea de lectura rápida e inequívoca.

		
Bomba Explotando – Explosivo	Llama - Inflamable	Llama sobre círculo - Comburente
Ejemplo:	Ejemplo:	Ejemplo:
		
Corrosión - Corrosivo.	Calavera y Tibias Cruzadas - Toxicidad aguda	Signo de Exclamación - Irritación cutánea
Ejemplo:	Ejemplo:	Ejemplo:
		
Medio Ambiente - Dañino para el ambiente	Botella de Gas	Peligro para la Salud
Ejemplo:	Ejemplo:	Ejemplo:

CONSIGNA N°2:

El estudiante deberá buscar los pictogramas de seguridad de las siguientes sustancias y ubicarlas como ejemplos en el cuadro superior: Metanol, etanol, hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno, bromuro de etidio, dióxido de carbono, cloruro de zinc, permanganato de potasio, nitroglicerina.

Podrá usar la base de datos PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Además de los pictogramas establecidos por la GHS, existe otro sistema de identificación de peligros de las sustancias químicas. La NFPA 704 es la norma estadounidense que explica el "diamante de materiales peligrosos" establecido por la Asociación Nacional de Protección contra el Fuego (*National Fire Protection Association*), utilizado para comunicar los peligros de los materiales peligrosos.

Consiste en un rombo, subdividido en cuatro partes. Las cuatro divisiones tienen colores asociados con un significado. El azul hace referencia a los peligros para la salud, el rojo indica la amenaza de inflamabilidad y el amarillo el peligro por reactividad: es decir, la inestabilidad del compuesto. A estas tres divisiones se les asigna un número de 0 (sin peligro) a 4 (peligro máximo). Por su parte, en la sección blanca puede haber indicaciones especiales para algunos materiales, indicando que son oxidantes, corrosivos, reactivos con agua o radiactivos.



MANIPULACIÓN DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAS

Los laboratorios, sean de enseñanza, investigación, análisis clínicos o de microbiología (clínica, alimentos, etc.), son áreas físicas expuestas permanentemente a riesgos potenciales, lo que hace necesario el cumplimiento de ciertas normas para ofrecer seguridad a quienes trabajan allí y a quienes ingresan a estos lugares. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos han elaborado una clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo de acuerdo a la patogenicidad, vía de transmisión y disponibilidad de medidas preventivas y terapéuticas:

Grupo de riesgo 1 (*riesgo individual y poblacional escaso o nulo*)

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.

Grupo de riesgo 2 (*riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo*)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3 (*riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo*)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Grupo de riesgo 4 (*riesgo individual y poblacional elevado*)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Además, los laboratorios de microbiología se clasifican por distintos niveles de bioseguridad, desde el nivel 1 hasta el 4, acorde al orden creciente de peligrosidad y complejidad del material que se manipula en cada nivel. En cada uno de los 4 tipos de laboratorio, deben aplicarse, tanto normas de bioseguridad generales, como normas particulares, en especial en los niveles 3 y 4. Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, medios de contención, equipamiento, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo.

Laboratorio básico - Nivel de Bioseguridad 1 (NB1)

- Agentes: No se conocen como causa de enfermedad en humanos.
- Prácticas: Métodos microbiológicos estándares (normas básicas)
- Barrera primaria: No requieren.
- Barrera secundaria: Desagüe en cloacas

Laboratorio básico - Nivel de Bioseguridad 2 (NB2)

- Agentes: Asociados a enfermedad humana. Ej.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, Virus de Hepatitis B, Poliovirus, Virus de la rabia, Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etc.
- Prácticas: Normas básicas y normas generales de bioseguridad en pacientes.
- Barrera primaria: Guardapolvos, guantes y protección ocular. Cabinas de Bioseguridad I o II (CBS I o II: Campanas de extracción de aire con filtros HEPA).
- Barrera secundaria: Desagüe en cloacas y autoclave

Laboratorio de contención - Nivel de Bioseguridad 3 (NB3)

- Agentes: Agentes nativos o exóticos con transmisión potencial por aerosoles. Ej.: *Micobacterium tuberculosis*, Coronavirus de Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), Virus de la Influenza aviar altamente patogénica, etc.
- Prácticas: Las del NB2 y acceso controlado, descontaminación de todo desecho previo descarte, descontaminación de la ropa de laboratorio antes de la lavandería.
- Barrera primaria: CBS I o II y ropa de laboratorio de protección, guantes y protección respiratoria si es necesaria.
- Barrera secundaria: NB2 y separación física de los pasillos de acceso, cerrado automático, doble puerta, extracción de aire viciado y presión negativa dentro del laboratorio.

Laboratorio de contención máxima - Nivel de Bioseguridad 4 (NB4)

- Agentes: Agentes peligrosos o exóticos que poseen un alto riesgo de enfermedad mortal, infecciones transmitidas por aerosoles o agentes relacionados con un riesgo desconocido de transmisión. Ej.: *virus Ébola*, *virus Junín*, etc.

- Prácticas: NB3 y cambio de ropa antes de entrar, ducha al salir, todo el material es descontaminado al salir.
- Barrera primaria: CBS III o clase I y II en combinación con traje personal de cuerpo entero, con provisión de aire y presión positiva incluida.
- Barrera secundaria: NB3 y edificio separado o zona aislada, sistema de aire, vacío y descontaminación propia.

Cuadro 2. Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas (Véase la parte IV del presente manual). CSB: cámara de seguridad biológica.

Cuadro 3. Resumen de los requisitos por nivel de bioseguridad

	NIVEL DE BIOSEGURIDAD			
	1	2	3	4
Aislamiento ^a del laboratorio	No	No	Sí	Sí
Sala que pueda precintarse para ser descontaminada	No	No	Sí	Sí
Ventilación:				
— Flujo de aire hacia el interior	No	Conveniente	Sí	Sí
— Sistema de ventilación controlada	No	Conveniente	Sí	Sí
— Salida de aire con HEPA	No	No	Sí/No ^b	Sí
Entrada de doble puerta	No	No	Sí	Sí
Cámara de cierre hermético	No	No	No	Sí
Cámara de cierre hermético con ducha	No	No	No	Sí
Antesala	No	No	Sí	—
Antesala con ducha	No	No	Sí/No ^c	No
Tratamiento de efluentes	No	No	Sí/No ^c	Sí
Autoclave:				
— En el local	No	Conveniente	Sí	Sí
— En la sala de trabajo	No	No	Conveniente	Sí
— De doble puerta	No	No	Conveniente	Sí
CSB	No	Conveniente	Sí	Sí
Capacidad de vigilancia de la seguridad del personal ^d	No	No	Conveniente	Sí

ORGANIZACIÓN Y DISEÑO DEL LABORATORIO

Todo laboratorio necesita una disposición especial del espacio que es necesario conocer, lugares específicos donde se guardaran reactivos e instrumental con el que vamos a trabajar. Mencionaremos algunas áreas básicas:

- 1) **Puerta de ingreso:** En esta se deben indicar los nombres de las personas que trabajan en dicho laboratorio, el nombre del director responsable, como así también el símbolo que identifica con el material con que se trabaja. (Ej.: material radioactivo, biológico, etc.)



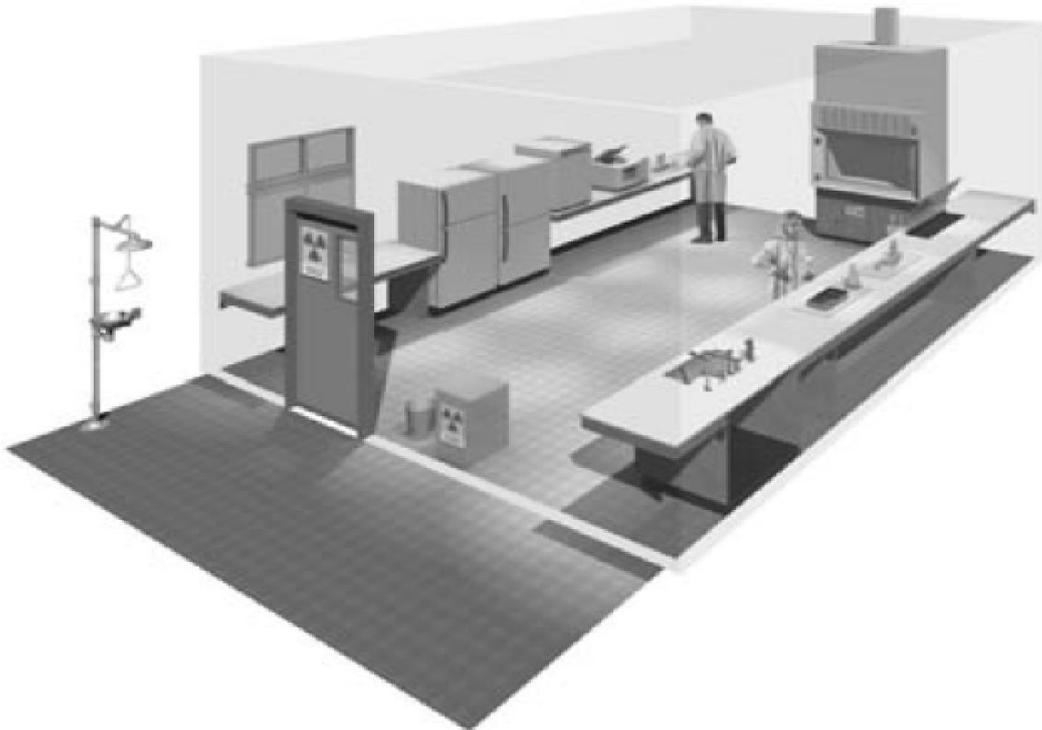
Figura 1. Señal de advertencia de peligro biológico para las puertas del laboratorio

- 2) **Piletas de lavado:** Deben existir piletas para lavado del material utilizado y otra para el lavado de manos, esta última preferentemente cerca de la salida.
- 3) **Mesada de trabajo:** Deben ser de material lavable, resistente e impermeable para que sea fácil de descontaminar y limpiar. En esta mesada debemos colocar sólo material de trabajo, nunca material de lectura para evitar contaminaciones.
- 4) **Mesadas de estudio:** Deben situarse lejos de las áreas de trabajo de laboratorio y sobre esta no se deben colocar materiales ni reactivos.
- 5) **Campanas de trabajo:** serán usadas cuando manipulemos material volátil, tóxico o biológico sin descontaminar.
- 6) **Recipientes para descartar material de desecho:** según el material a descartar las bolsas serán de diferentes colores de tal manera que sean fáciles de identificar:

BOLSAS ROJAS: material patógeno

BOLSAS NEGRAS: material de escritorio y administrativo

BOLSAS AMARILLAS: material radioactivo, desechos de servicios de radioterapia y radiología.



Laboratorio típico del nivel de bioseguridad 2: Las puertas se mantienen cerradas y llevan las debidas señales de riesgo biológico. Los residuos potencialmente contaminados se separan del circuito general de residuos.

NORMAS BÁSICAS DE SEGURIDAD

Protección personal

1. Se usarán en todo momento monos, batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
2. Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto con agentes peligrosos o potencialmente infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos. No se tocarán con los guantes elementos como picaportes, teléfonos, teclados, carpetas, etc.
3. El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales peligrosos y/o infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
5. Estará prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo en cantinas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal y baños.
6. Utilizar el cabello recogido.
7. No se usará calzado sin puntera.
8. En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
9. Estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.

Procedimientos

1. Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
2. Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio.
3. No encender fósforos ni llama en las proximidades de recipientes que contengan sustancias inflamables y/o volátiles.
4. No mezclar reactivos químicos si no lo indica la técnica.
5. Usar los reactivos en las proporciones indicadas.
6. Cuando mezcle un ácido o un álcali con agua, vierta siempre el ácido o el álcali en el agua, nunca al revés, y en pequeñas cantidades a la vez (**nunca dar de beber a un ácido**).
7. Cuando caliente un líquido contenido en un tubo de ensayo, dirija la boca del mismo hacia un sitio donde no se encuentren personas ya que el líquido al entrar en ebullición puede proyectarse. Evitar salpicaduras.
8. Las reacciones químicas que desprendan gases tóxicos o irritantes deben efectuarse bajo campana de gases.
9. El material a utilizar debe estar limpio. Luego de usarlo debe lavarlo con cuidado y finalmente enjuagarlo con agua destilada.
10. Maneje con estricta precaución los elementos corto-punzantes y deséchelos en los recipientes correspondientes ubicados en cada servicio. Evite separar manualmente la aguja de la jeringa.
11. Guardar los reactivos en envases rotulados y cerrados con sus tapas correspondientes.
12. Leer las advertencias indicadas en los rótulos de cada reactivo.
13. No colocar sobre la mesada de trabajo material de lectura y escritura.
14. Mantener la limpieza y el orden en el lugar de trabajo.
15. Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos) antes de eliminarlos por el colector de saneamiento.

16. En caso de ruptura de materiales de vidrio que contenían sangre u otros líquidos biológicos, los vidrios deberán recogerse con escoba, nunca con las manos. Al desecharlos envolverlos en forma tal que no lastime al personal de limpieza.
17. Maneje todo paciente y muestra biológica como potencialmente infectado.

Las normas enumeradas anteriormente no son las únicas a tener en cuenta, existen normas y procedimientos específicos para cada tarea y especialidad, y el conocimiento de las mismas permitirá aumentar la seguridad en el laboratorio y evitar accidentes.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR EN CASO DE ACCIDENTES

Lo más importante frente a situaciones de emergencia es estar preparado. Por ello se deben tener confeccionadas guías para las diferentes situaciones que se puedan plantear en un laboratorio, guardia, consultorio, etc. y ubicarlas en un lugar visible y de rápido acceso.

Si bien es importante la velocidad con la que se actúa en estas situaciones, es más importante aún la **tranquilidad**, necesaria para poder pensar con claridad, por eso es útil conocer qué elementos son necesarios para situaciones relacionadas con cualquier tipo de accidente. En caso de cualquier accidente, comunicar inmediatamente al responsable, solicitar ayuda.

En caso de derrame de fluidos biológicos, siempre contar con:

- Elementos de protección personal.
- Descartadores.
- Cuando se deba recoger todo tipo de material derramado **nunca** hacerlo directamente con las manos.
- Material absorbente, como papel absorbente.
- Soluciones desinfectantes (Ej.: hipoclorito de sodio 0,5%).
- Cubrir el derrame con papel absorbente y verter hipoclorito de sodio al 0,5% (5 g/L) en círculos concéntricos del exterior al interior. Descontaminar durante 30 minutos, retirar todos los materiales y eliminar como residuos patogénicos en bolsas rojas a prueba de filtraciones. Finalizar la limpieza lavando minuciosamente el área afectada con agua.

En caso de derrame de sustancias ácidos, solventes orgánicos, siempre contar con:

- Indumentaria de protección e instrumental igual que con materiales biológicos.
- Protección respiratoria, en caso que se generen gases tóxicos. En estos casos se deberá ventilar inmediatamente el área de trabajo.
- Sustancias neutralizantes, conociendo las sustancias ácidas con las que se trabaja, tratar de tener sustancias neutralizantes para contrarrestar su efecto.
- Utilizar soluciones removedoras varias veces y descartar todo, tratando de no tocar nada con las manos.
- Desechar todo en bolsas plásticas, cerrarlas bien, sellarlas y rotularlas correctamente explicando su contenido.

Injurias personales:

- Si se derrama sobre la piel alguna sustancia química, inmediatamente que ocurre el accidente, lavarse y enjuagarse con abundante agua la zona afectada. Si es necesario ducharse.

- Salpicaduras por ácidos: Neutralizar con una base débil (jabón o detergente) de acuerdo a la quemadura. Lavar inmediatamente con abundante agua la parte afectada.
- Salpicaduras por álcalis: Neutralizar con ácido débil (vinagre o jugo de limón), luego lavar con abundante agua.
- En el caso de una herida punzo-cortante, sacarse el guante, localizar la zona de la herida y lavar profusamente la zona afectada con abundante agua a presión. Apretar (si es posible) la zona cortada, para drenar algo de sangre y evitar infecciones, luego aplicarse una solución desinfectante como povidona yodada.
- Si hay salpicaduras en las conjuntivas, lavarse con agua corriente a presión moderada para limpiar bien la zona durante un periodo de varios minutos. Acudir al médico.
- Siempre luego de una exposición o contacto personal con agentes biológicos será necesaria la evaluación de una profilaxis post-exposición.
- Siempre en todos los casos deben reportarse los accidentes a los superiores, quedando debidamente documentado el accidente.

En caso de incendios:

- En caso de incendio de pequeña escala apagar todas las fuentes de ignición. Alejar todas las sustancias volátiles e inflamables, ej: frascos o tubos con éter, alcohol, gasolina, etc. Privar de oxígeno o de aire a la zona de incendio (Cubriendo con una manta de lana o algodón o utilizando arena o tierra) y hacer uso de extintores adecuados.
- Tipos de extintores según los tipos de fuego:

MATERIALES SÓLIDOS	LIQUIDOS COMBUSTIBLE INFLAMABLE Y GRASAS	MATERIAL ELÉCTRICO Y ELECTRÓNICO	METAL COMBUSTIBLES	GRASAS Y ACEITES VEGETALES
Son los fuegos que surgen en materiales combustibles ordinarios o materiales fibrosos, cuya combustión presenta la formación de brasas como: madera, papel, derivado de celulosa, telas, fibras, hule, gomas y plásticos similares.	Son los fuegos que surgen en materiales combustibles derivados de los hidrocarburos, líquidos y gases inflamables como son: aceites, grasas, gasolina, pinturas, ceras, lacas, alquitrón, butano, propano e hidrogeno, entre otros.	Son fuegos que surgen de equipos eléctricos energizados, como son: interruptores, caja de fusibles, aparatos electrodomésticos, entre otros.	Son los tipos de incendio que se declaran en los metales combustibles tales como magnesio, titanio, zirconio, sodio, potasio, etc. A este tipo de incendio no debe arrojarse agua, ya que provoca explosiones.	Son los tipos de incendio que se declaran en los metales combustibles tales como magnesio, titanio, zirconio, sodio, potasio, etc. A este tipo de incendio no debe arrojarse agua, ya que provoca explosiones.
				

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Manual de Bioseguridad. Facultad de Ciencias Químicas. UNC <http://fcq.unc.edu.ar/site/todo.htm>
- 2) Manipulación sin riesgo de material radioactivo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA (Universidad de Buenos Aires).
- 3) Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. Departamento de

- Salud y Servicios Humanos. Servicio de Salud Pública. CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades. NHI (National Institute of Health) 4ta Ed. 1999.
- 4) Exposure to Blood. What healthcare personnel need to know. Information from the Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infections Disease. The Public Health Foundation. Julio 2003. Department of Health & Human Services. CDC.
 - 5) Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ra Ed. OMS.

MATERIALES E INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

INTRODUCCIÓN

Si bien cada laboratorio dispone de diferente material atendiendo a su área de conocimiento, líneas de investigación y presupuesto, todos ellos disponen de materiales que son comunes.

El principal objetivo perseguido en el desarrollo de esta sección es la adquisición del conocimiento conceptual y práctico del material utilizado y requerido de forma cotidiana en los laboratorios tanto de prácticas como de investigación y asistencia clínica y la habilidad para identificarlos, permitiendo con ello el correcto uso y manejo del mismo.

Material no volumétrico

Es material no apto para medir volúmenes con exactitud, no obstante, sirven para contener líquidos y sólidos durante la preparación de soluciones y mezclas de las mismas, realización de reacciones, etc. Algunos de estos elementos suelen tener una escala de volumen aproximado (habitualmente acompañado de inscripciones tales como: Aprox vol.)

- ***Vasos de precipitado:*** Son recipientes no calibrados cilíndricos, de base ancha y paredes rectas con un pico en el borde, que se utilizan para contener soluciones y reactivos. El volumen de los más usados en el laboratorio oscila entre 25 a 1000 ml. Los de vidrio soportan altas temperaturas.
- ***Erlenmeyer:*** Especie de vasos no calibrados de forma cónica, fondo plano y cuello angosto, usados también como contenedores. Sus volúmenes son como los anteriores. La parte alta del Erlenmeyer actúa como condensador de vapores y retarda la evaporación en un calentamiento prolongado.



Erlenmeyer



Vaso de precipitado (beaker)

- **Placas de Petri:** Son recipientes que se usan para el cultivo de microorganismos. En el mercado existen algunas ya preparadas con el medio de cultivo adecuado a cada caso. Son de plástico o vidrio y pueden ser desechables.



Placas de Petri

- **Tubos:** Son recipientes tubulares de gran variedad en longitud y diámetros. Pueden ser de plástico o de vidrio. Algunos están diseñados para resistir calentamiento y otros, como los cónicos, pueden soportar altas presiones.
- **Embudos:** Utensilio cónico, rematado por un tubo, para trasvasar líquidos de un recipiente a otro. Los llamados de **decantación** son vasijas de vidrio de cuerpo ancho y redondeado, cuello estrecho en cuyo extremo se encuentra una llave que permite abrir o cerrar el paso del fluido. Se utilizan para separar fracciones de mezclas bifásicas. Otros poseen algún tipo de material filtrante (papel de filtro, vidrio poroso, etc.)
- **Balón:** recipiente en forma de bulbo con cuello fino, empleado para el calentamiento con evaporación controlada de soluciones. Suele utilizarse en el dispositivo de destilación.
- **Mortero:** Material de porcelana o de vidrio, que se usa para moler o reducir el tamaño de una masa de sólidos a partículas más pequeñas. Consta de dos partes: el mazo o pilón y el mortero propiamente dicho.
- **Piseta:** es un instrumento de vidrio o plástico que contiene líquidos y la dispensa donde el operador requiera.



Pisetas



Mortero



Embudos

Material volumétrico

Este tipo de material se utiliza para la medición precisa y transferencia de volúmenes de líquidos. Están calibrados para medir volúmenes precisos a una temperatura determinada y suelen tener asociados el error asociado a la escala de medición (ej: 100 ml \pm 2).

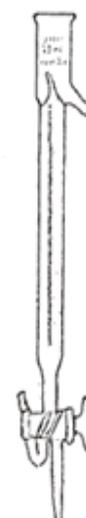
- **Matraces aforados:** Son recipientes de cuerpo redondeado o cónico con cuello largo y estrecho. Los llamados **aforados** están calibrados y contienen, a la temperatura indicada, el volumen señalado. Se utilizan para preparar volúmenes de soluciones con concentración conocida. Los volúmenes más frecuentes son: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml. Deben llenarse hasta la señal, quedando el menisco que produce el líquido tangente en la parte superior.



Matraz



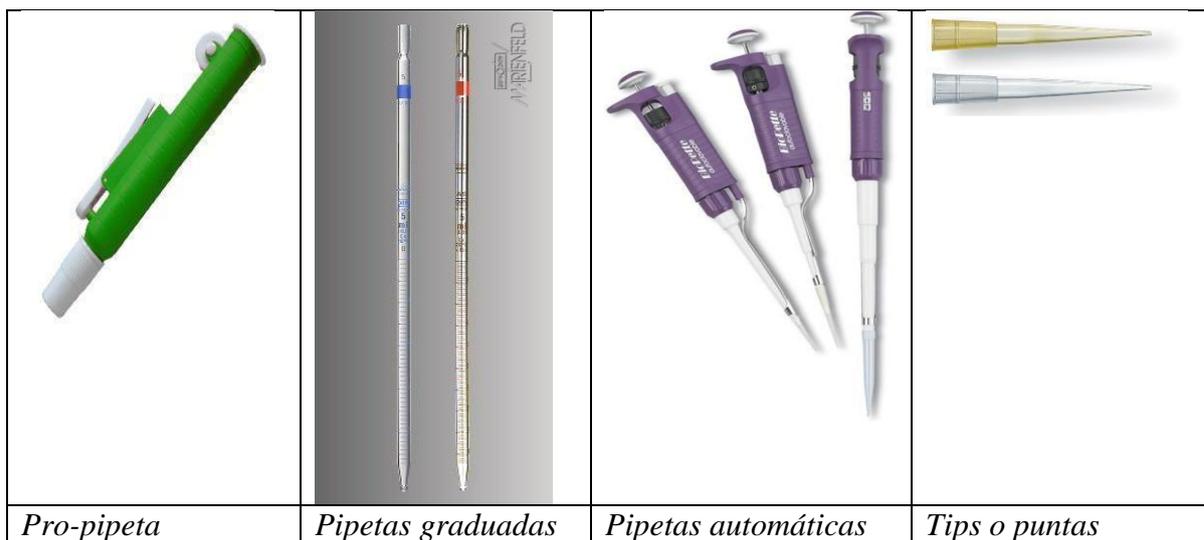
Probeta



Bureta

- **Probetas:** Son recipientes cilíndricos alargados, graduados, con una base de apoyo y que se utilizan para medir volúmenes aunque por su inexactitud se emplea en medidas groseras. Los tamaños más usados oscilan entre 25 y 5000 ml.

- **Buretas:** Semejante a las pipetas. Más anchas y con un dispositivo en forma de llave (robinete) en el extremo inferior, que permite controlar el paso del líquido. Se utiliza para realizar titulaciones.
- **Pipetas:** Se usan para medir volúmenes pequeños, inferiores a 50 ml. Existen dos tipos, las **volumétricas** que dispensan un volumen fijo y las **graduadas** que suministran volúmenes variables. Existen pipetas de doble enraste en las que el volumen se encuentra contenido entre dos marcas en el vidrio o aforos. Se llenan succionando con un dispositivo adecuado (pro-pipeta) hasta el enraste conveniente. No se recomienda succionar el líquido con la boca por razones de seguridad. También existen las pipetas **mecánicas o automáticas**, estas funcionan mediante un pistón que expulsa el aire o aspira el líquido. El líquido está contenido en una punta plástica descartable o tip. Están diseñadas para entregar volúmenes fijos o variables desde 1 μ l hasta 5 ml.



Otros materiales de uso común en el laboratorio

- **Gradillas:** Soporte de material y tamaño diversos que se utiliza para colocar tubos.
- **Trípode:** Soporte de metal con tres patas que se emplea para apoyar balones, vasos de precipitación o cristalizadores para su calentamiento.



Trípode



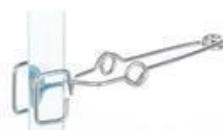
Gradilla

- **Mecheros:** Se los utiliza para proveer calor. Pueden utilizar alcohol o gas (Mechero de Bunsen y de Fisher, respectivamente) como fuente de energía.



Mechero de Bunsen

- **Soporte Universal:** Dispositivo metálico que sirve para sostener buretas, balones, embudos u otros materiales de laboratorio.
- **Pinza para tubos:** Instrumento de madera, que se emplea para tomar los tubos de ensayo para calentamiento, o de metal, que se emplea como soporte de material volumétrico.



- **Espátulas:** Son de diferentes materiales y se las utiliza para retirar pequeñas cantidades de sustancias sólidas y depositarlas en otro recipiente.
- **Balanzas:** Existe gran variedad. Las más utilizadas son las electrónicas. La precisión de estas balanzas alcanza $\pm 0,1$ mg. Deben colocarse en lugar protegido de aire, sol, calor, vapores corrosivos. El soporte debe ser sólido evitando al máximo las vibraciones. Las sustancias químicas deben ser pesadas sobre papel o sobre recipientes adecuados, nunca se debe pesar directamente sobre el plato de la balanza porque esto afecta el buen funcionamiento de la misma.



Balanza mecánica



Balanza digital

- **Baños termostáticos:** Son recipientes que contienen agua cuya temperatura puede ajustarse. Por lo común, alcanzan hasta 100° C. Suelen tener un sistema de agitación para mantener la temperatura por igual en todo el recipiente.



TRABAJO PRÁCTICO N° 2

SOLUCIONES

OBJETIVOS

- Repasar los conceptos y propiedades de las soluciones.
- Trabajar con diferentes unidades de concentraciones y la interconversión de las mismas.
- Familiarizarse con la preparación de soluciones acuosas.

DEFINICIÓN

En química una **solución** se refiere a una mezcla de dos o más sustancias, cuya característica indispensable es la uniformidad, por lo cual constituyen sistemas homogéneos. Las sustancias que las componen pueden encontrarse en igual o distinto estado de agregación.

Las mezclas tienen propiedades físicas diferentes a aquellas de las sustancias que las constituyen y son totalmente dependientes de las cantidades relativas de cada componente.

Las soluciones están formadas como mínimo por dos componentes, el **solvente** y el **soluto**. Se denomina solvente al componente de la solución que se encuentra en mayor proporción y solutos a aquellos componentes que se encuentran en menor proporción.

La **solubilidad** es una medida de la capacidad de una determinada sustancia para disolverse en otra. Ésta depende de la naturaleza del disolvente y del soluto, así como de la temperatura y la presión del sistema. El carácter polar o apolar de las sustancias tiene mucha relevancia en su solubilidad. Por regla general los solutos polares son disueltos por solventes polares y los solutos apolares son disueltos en solventes apolares. El solvente más importante de los fluidos biológicos es el agua.

Tipos de Soluciones:

De acuerdo al estado físico de los componentes las podemos clasificar como:

Soluto	Solvente	Ejemplos
Sólido	Sólido	Aleaciones
Sólido	Líquido	Soluciones salinas
Líquido	Líquido	Etanol y agua
Líquido	Sólido	Amalgama Hg y Ag
Gas	Sólido	Roca
Gas	Líquido	CO ₂ en Agua (soda)
Gas	Gas	Aire

De acuerdo con las propiedades físico-químicas:

1. **Soluciones Moleculares:** Las partículas de soluto son moléculas. Las interacciones entre las moléculas de soluto y de agua son dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno. Ejemplo: glucosa en agua, etanol en agua, etc.
2. **Soluciones electrolíticas:** Los solutos están constituidos por sustancias ionizables, que al ser disueltas en el solvente se descomponen en partículas pequeñas cargadas eléctricamente denominadas iones. Este proceso se denomina solvatación. Ejemplo: cloruro de sodio en agua, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etc.
3. **Soluciones atómicas:** Cada partícula dispersa es un átomo. Comprenden las aleaciones de metales al estado elemental. Ejemplo: Cu y Sn, Ag y Au, etc.

CONCEPTO DE SOLUBILIDAD

A medida que el soluto se disuelve en el solvente la cantidad de partículas dispersas en la solución aumentan, esto produce que se incremente el número de colisiones entre sí y con las paredes del recipiente que las contiene generando la posibilidad que dos o más partículas se adhieran y formen cristales, proceso denominado cristalización. Cuando el proceso de cristalización y el de disolución ocurren con la misma velocidad el sistema se encuentra en equilibrio, entonces la solución se denomina solución saturada.

La solubilidad es la cantidad de soluto necesaria para formar una solución saturada en una determinada cantidad de solvente.



De acuerdo a la cantidad de soluto que contengan, las soluciones se pueden clasificar en:

1. **Solución Saturada:** Cuando la cantidad de soluto se encuentra en el límite de la capacidad de disolución del solvente, sistema en equilibrio.
2. **Solución Insaturada:** Cuando la cantidad de soluto disuelto se encuentra por debajo de la capacidad de disolución del solvente.
3. **Solución Sobresaturada:** Cuando la cantidad de soluto excede la capacidad de disolución del solvente sin llegar a cristalizar. Generalmente las soluciones de este tipo se generan sometiendo al sistema a cambios en la temperatura y/o la presión (sistema inestable).

FACTORES QUE AFECTAN LA SOLUBILIDAD

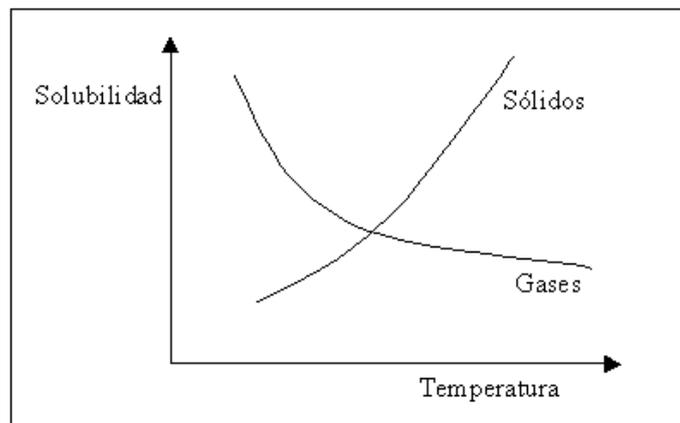
- **Naturaleza química del soluto y del solvente:** Los solutos polares son disueltos por solventes polares, los solutos apolares son disueltos por solventes apolares. Esto se debe al tipo de interacción existente entre el soluto y el solvente. Cuando se unen dos sustancias de distinta naturaleza se forma una mezcla inmiscible, en cambio cuando se unen dos sustancias que poseen la misma naturaleza química se forma una mezcla homogénea (miscible).



- *Presión:* El aumento de la presión del sistema produce el incremento de la solubilidad de los gases en el disolvente. La solubilidad de los sólidos y líquidos no se ve alterada notablemente por los cambios de presión.



- *Temperatura:* El aumento de la temperatura del sistema genera disminución de la solubilidad de los gases en agua y aumento de la solubilidad de los sólidos en agua.



PROPIEDADES COLIGATIVAS

Las propiedades físicas de las soluciones difieren con respecto a las propiedades físicas de los solventes puros. Esto genera características propias de las soluciones denominadas propiedades coligativas. En química se llaman propiedades coligativas a aquellas propiedades de las soluciones y sus componentes que dependen únicamente del número de partículas de soluto en relación al número de moléculas de solvente y no de su naturaleza. Estas son:

- *Disminución de la presión de vapor:* La presión de vapor de un solvente desciende con respecto a la presión de vapor del solvente puro cuando se le añade un soluto no volátil. Este efecto es el resultado de dos factores: la disminución del número de moléculas del disolvente en la superficie libre y la aparición de fuerzas atractivas entre las moléculas del soluto y las moléculas del disolvente, dificultando su paso a vapor.
- *Descenso crioscópico:* El soluto disuelto en el solvente no permite que se genere el ordenamiento de las partículas necesario para producir la solidificación de la solución, por lo tanto, las soluciones acuosas solidifican a temperaturas menores que el agua pura. Cuantitativamente se cumple que: $\Delta T_c = K_c \cdot m$, siendo T_c el descenso crioscópico, m la concentración molal del soluto y K_c la constante crioscópica del disolvente. Para el agua, este valor es $1,86 \text{ }^\circ\text{C/mol/Kg}$. Esto significa que las disoluciones molales ($m=1$) de cualquier soluto en agua congelan a $-1,86 \text{ }^\circ\text{C}$.
- *Ascenso ebulloscópico:* La temperatura de ebullición de un líquido es aquella a la cual su presión de vapor iguala a la presión atmosférica. Cualquier disminución en la presión de vapor, como por ejemplo el agregado de un soluto, producirá un aumento en la temperatura de ebullición. Este aumento en la temperatura de ebullición (ΔT_e) es proporcional a la concentración molal del soluto: $\Delta T_e = K_e \cdot m$. La constante ebulloscópica (K_e) es característica de cada disolvente, y para el agua su valor es $0,52 \text{ }^\circ\text{C/mol/Kg}$. Esto significa que una disolución molal de cualquier soluto no volátil en agua manifiesta una elevación ebulloscópica de $0,52 \text{ }^\circ\text{C}$.
- *Aumento de la presión osmótica:* Mientras mayor concentración de partículas se encuentren disueltas en solución mayor será la presión osmótica de la misma.

UNIDADES DE CONCENTRACIÓN

La relación entre la cantidad de soluto y la cantidad de solución o solvente se designa como **concentración**. Las unidades de concentración más comúnmente empleadas son:

Molaridad: **M** = moles de soluto contenidos en un litro de solución (**moles/litro**)

Molalidad: **m** = moles de soluto contenidos en un kilogramo de solvente (**moles/Kg**)

Fracción molar: **X** = relación entre los moles de soluto y los moles totales en la solución. (**moles soluto/moles totales**)

Porcentaje peso en peso: **% P/P** = peso de soluto por cada 100 unidades de peso de la solución. (**gramos de soluto/100 gramos de solución**)

Porcentaje peso en volumen: $\%P/V = \text{gramos de soluto por cada 100 ml de solución}$ (**gramos de soluto/100 ml de solución**)

Partes por millón: **ppm** = unidades de soluto por millón de unidades de solución (**mg soluto/Kg solución**)

EJERCICIOS

Los estudiantes deberán resolverlos antes de asistir a la clase práctica.

1) La solución fisiológica o solución salina normal es una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9 % (P/V) en agua, isotónica respecto a la sangre y que tiene múltiples usos en medicina. Expresar la concentración en molaridad (NaCl PM 58,5 g/mol).

2) La deficiencia de vitamina D puede dar lugar a raquitismo en niños o reblandecimiento de los huesos en adultos. La suplementación oral de vitamina D favorece la absorción y utilización del calcio y del fosfato, para la normal calcificación ósea. La presentación del medicamento es en ampollas de 2 ml que contienen 2,5 mg de colecalciferol (PM 384,6 g/mol). Calcular su concentración molar.

3) El hierro es un componente esencial de la hemoglobina. La anemia ferropénica por deficiencia de hierro afecta a millones de personas en todo el mundo, y está asociada con un deterioro del desarrollo neurológico en lactantes y niños. El sulfato ferroso es el preparado de hierro oral más comúnmente prescrito. ¿Cuál es el % P/P de una solución de FeSO_4 (PM 151,9 g/mol) formada por 25 g de soluto y 200 g de solvente? ¿Cuál será su concentración expresada en ppm?

4) Se preparó una solución de Na_2CO_3 (PM: 106 g/mol) utilizando 2 ml de una solución madre de la misma droga de concentración 1,5 M que fueron colocados en un matraz de 250 ml, el cual se enrasó con agua destilada. ¿Cuál es la concentración final de la solución expresada en molaridad?

5) Calcular cual será la temperatura de ebullición de una solución acuosa de NaCl 0,6 m.

6) Calcular la temperatura a la cual solidificaría una solución acuosa de CaCl_2 (PM: 111 g/mol) preparada diluyendo 8 g de soluto en 400 g de solvente.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°1

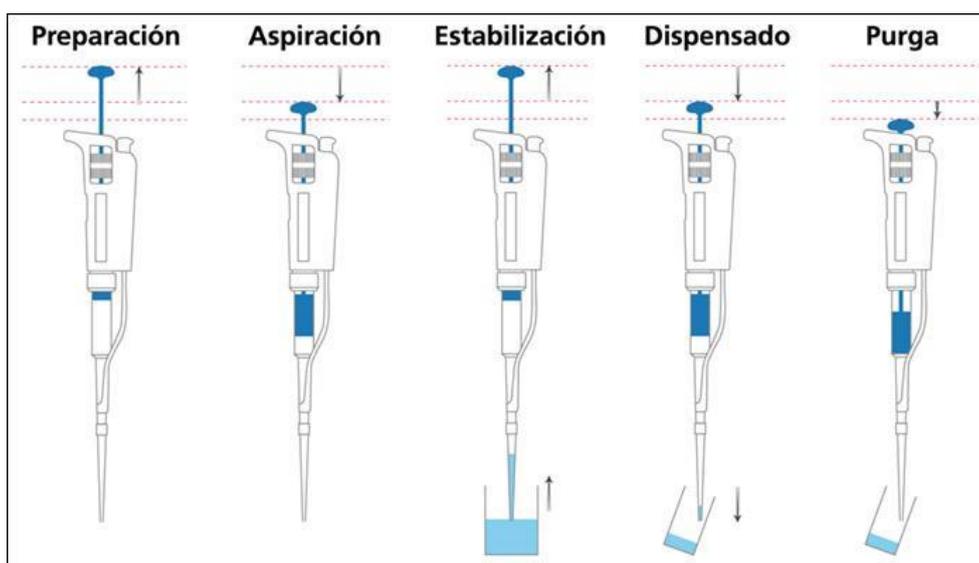
El objetivo de la actividad práctica es que el estudiante se familiarice con los materiales de laboratorio que se utilizarán durante el curso de la materia y que adquiera práctica en la técnica de enrasar y pipetear.

1. Use pipetas graduadas para dispensar 2, 5 y 10 mL de agua en un vaso de precipitados.
2. Uso de las micropipetas automáticas: Lo primero a verificar es que la punta está bien colocada y encaje perfectamente antes de establecer el volumen. Al configurar el volumen de trabajo, el giro debe ser suave y no debe pasarse de los límites superior

o inferior. Se debe sostener el cuerpo de la micropipeta en una mano y usar la otra mano para girar la rueda. En la tabla que figura a continuación se detallan los volúmenes mínimos y máximos permitidos por defecto para cada micropipeta, a excepción de que en la misma esté indicado expresamente otro volumen.

Fases de pipeteo

- Preparación: Sostenga el instrumento en una posición casi vertical. Presione el émbolo suavemente hasta la posición más alta primero.
- Aspiración: Sumerja unos milímetros la punta de la pipeta en el líquido. Suelte con suavidad el émbolo para que se mueva hacia arriba a la posición de reposo.
- Dispensado: Coloque la punta de la pipeta en ángulo contra la pared interior del recipiente receptor. Presione el émbolo suavemente hasta la primera posición.
- Purga: Presione el émbolo a la posición de la segunda parada. Este golpe elimina cualquier resto de la muestra de la punta.
- Se desecha la punta en el recipiente correspondiente después de terminar.



<i>Pipeta</i>	<i>Volumen mínimo</i>	<i>Volumen máximo</i>
P20	2 μL	20 μL
P200	20 μL	200 μL
P1000	100 μL	1000 μL

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°2

Objetivos: Familiarizarse con la preparación y manejo de soluciones acuosas, remarcando los conceptos de dilución, concentración y propiedades coligativas. Se realizará la resolución de problemas para fijar y reforzar los conceptos aprendidos.

Preparación de una solución:

Para preparar las diversas soluciones que se utilizarán en el transcurso de la asignatura se deben seguir los siguientes pasos:

- Calcular los gramos de soluto que se necesitan.
- Prender la balanza.

- Colocar sobre la balanza un recipiente donde se llevará a cabo el pesaje de la sustancia.
- Llevar el marcador de la balanza a cero con el botón de “tara”.
- Agregar la cantidad de droga necesaria empleando una espátula.
- Trasvasar la sustancia pesada a un vaso de precipitados.
- Agregar aproximadamente el 80 % del volumen de solvente necesario.
- Remover hasta lograr que el soluto esté completamente disuelto.
- Trasvasar la solución con un embudo a un matraz, probeta u otro material volumétrico.
- Enjuagar el vaso de precipitados y volcar ese líquido en el embudo.
- Enrasar hasta el volumen indicado.
- Tapar el recipiente e invertirlo para homogeneizar la solución.

1) Preparación de una solución acuosa concentrada y su posterior dilución:

- a. Preparar una solución madre de CuSO_4 (PM 249,69 g/mol) de concentración 0,1 M y con un volumen final de 25 ml.
- b. Tomar 2 ml de la solución madre y preparar una nueva solución de volumen final 100 ml.

¿Qué materiales del laboratorio son necesarios para preparar estas soluciones?
 ¿Cuál es la concentración de la segunda solución preparada? ¿Esta última, es más o menos concentrada que la solución madre?
 Expresé la concentración de la solución madre en % P/V.

Resultados:

2) Preparación de una solución acuosa sobresaturada de acetato de sodio:

- a. Preparar una solución de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ PM 82 g/mol) pesando 30 g del mismo y llevando a volumen final de 25 ml.
- b. A esta última solución colocarla en un recipiente resistente al fuego y calentar hasta disolver completamente el sedimento.
- c. Posteriormente dejar enfriar cuidadosamente hasta que la solución se encuentre a temperatura ambiente.
- d. Luego colocamos un generador de cristales en el interior de la solución y dejamos reposar (solubilidad de acetato de sodio en agua 47 g/100 ml).

¿Cuál es la concentración Molar?
 ¿Porque la solución sobresaturada contiene una cantidad de soluto disuelto mayor a la solubilidad del mismo en el solvente utilizado?
 ¿Una vez cristalizado el soluto el sistema sigue siendo una solución? Justificar.

Resultados:

3) Evaluación de la variación de pH en soluciones de HCl.

- Los docentes prepararán una solución 1 M de HCl de volumen final 100 ml.
 - Realizar diluciones de la misma para obtener soluciones de concentración 10 mM, 0,1 mM y 1 μ M de HCl en un volumen final de 10 ml. El docente explicará el concepto y la técnica de las diluciones seriadas.
 - Medir el pH de cada solución con tiras reactivas y anotar los resultados.
 - Calcular el pH teórico de las soluciones y comparar con el valor experimental obtenido.
- ¿Según el valor obtenido las soluciones preparadas son ácidas, básicas o neutras? Justificar la respuesta. ¿Existe diferencia entre los valores de pH de las tres soluciones? ¿A qué se debe esa variación?

Resultados:

4) Evaluación del ascenso ebulloscópico (propiedades coligativas).

- Colocar en un recipiente resistente al fuego 150 ml de agua.
 - Colocar el recipiente sobre un mechero hasta que alcance la ebullición y registrar la temperatura de ebullición.
 - Preparar 150 ml de una solución de NaCl 3M (PM 58,5 g/mol).
 - Colocar el recipiente sobre un mechero hasta que alcance la ebullición y registrar la temperatura de ebullición.
- ¿Las temperaturas medidas para cada muestra son iguales? ¿Cómo explica los valores obtenidos?
Si en vez de medir la temperatura hubiera medido el tiempo que demoraron las soluciones en hervir, ¿la medición hubiera sido igual, más o menos exacta? ¿Por qué?

Resultados:

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Química La ciencia central; Brown TL, Lemay HE y Bursten BE; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 1993.
- 2) Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
- 3) Principles of Biochemistry, Lehninger A, Nelson DL, Cox M. Worth Publishers, 2^o edition, 1997.
- 4) Química, R. Chang, 7^a Edición, McGraw-Hill, 2002.
- 5) Química: Curso universitario, B. H. Mahan, R. J. Myers, 4^a Edición, Addison-Wesley, 1990.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

ESPECTROFOTOMETRÍA

OBJETIVOS

- Comprender la interacción entre la luz y la materia y las leyes que gobiernan esa interacción.
- Introducir al estudiante a la espectrofotometría: definición, principios, equipamiento.
- Aprender el concepto y la elaboración de un espectro de absorción y una curva de calibración.

INTRODUCCIÓN

El estudio a nivel bioquímico de cualquier biomolécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica. La espectrofotometría y la fotocolorimetría son técnicas analíticas que permiten determinar la concentración de un compuesto en solución, siendo de gran utilidad en el laboratorio clínico o bien de investigación. Definimos la **espectrofotometría** como el conjunto de métodos cuantitativos de análisis que *utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas*.

El fundamento de la espectrometría es la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones. Las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

FUNDAMENTO

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Cuando la luz es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E_1 , a un estado de mayor energía o excitado, E_2 . Las moléculas sólo pueden absorber las radiaciones que le provean la energía exacta que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto. Como consecuencia, la absorción que presenta una molécula a distintas longitudes de onda constituye su espectro de absorción, y resulta en una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental.

$$E_2 - E_1 = h\nu$$

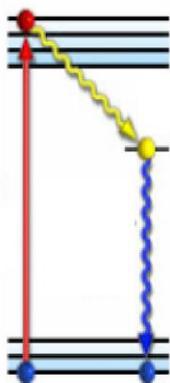


Figura 1. Diagrama de niveles de energía en una molécula. La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado fundamental (E_1) a otro excitado (E_2). Posteriormente la molécula relaja su energía mediante distintos mecanismos (vibración, rotación, etc.)

RADIACIONES Y ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

La luz es un tipo de radiación electromagnética. Las diversas ondas electromagnéticas conocidas por el hombre están incluidas en el **espectro electromagnético**, que abarca radiaciones de alta energía como los rayos gama, hasta las de menor energía conocida, como las ondas de radio. Las radiaciones se pueden caracterizar por su energía, la cual está inversamente relacionada a su longitud de onda (λ), por lo tanto, los rayos gama son las de menor longitud de onda y las ondas de radio, las de mayor longitud de onda.

En espectroscopía el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas ultravioleta (UV) e infrarroja (IR), que son invisibles para el ojo humano. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del espectro del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm).

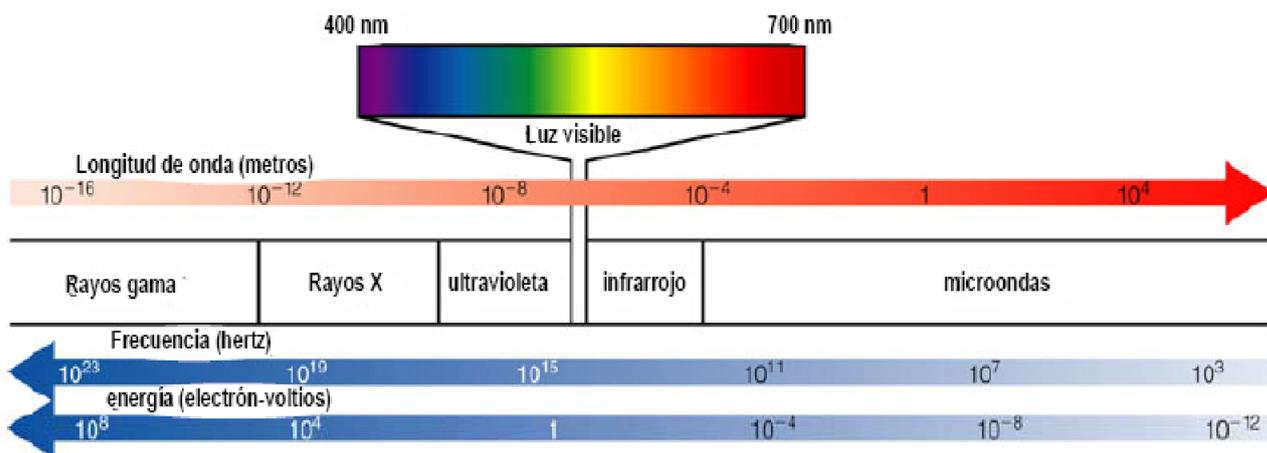


Figura 2. Espectro electromagnético

La **región UV** se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm del espectro. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano y quemaduras en la piel. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlace peptídico, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente, que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV.

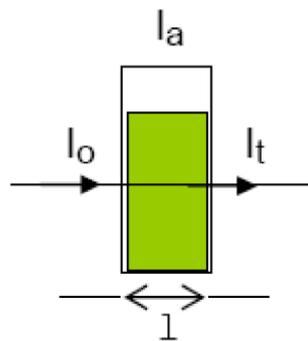
En la **región visible** encontramos las radiaciones de 400 a 780 nm. Es la interacción de la materia con este tipo de ondas lo que nos permite apreciar el color visible de los objetos, el cual corresponde a la luz de longitudes de onda que el objeto transmite o refleja, y no las que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. En este sentido, la clorofila que es verde absorbe luz roja.

Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada.

longitud de onda aproximada	color de luz que se absorbe	color de luz que se refleja o ve
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650 - 780	Rojo	Verde azulado

LEYES DE LA ABSORCIÓN

Transmitancia y Absorbancia: Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o **chromóforo**, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple: $I_0 = I_a + I_t$



La proporción de luz transmitida se denomina Transmitancia (T) y se calcula de la siguiente manera:

$$T = I_t / I_0$$

Donde I_t = la intensidad de luz transmitida por la muestra

I_0 = la intensidad de luz incidente

La transmitancia toma valores entre 0 – 1. También se expresa como porcentaje si se multiplica por 100 y sus valores están en el rango de 0-100 %:

$$\%T = (I_t/I_0) \times 100$$

La relación (I_t/I_0) , también puede ser expresada como luz absorbida en vez de luz transmitida. En ese caso nos referimos a la Absorbancia (A) de una muestra. La Absorbancia es adimensional, varía en el rango de 0 - ∞ y se define como:

$$A = \log 1/T = \log_{10} (I_0/I_t)$$

Por sustitución se comprueba que la absorbancia y el porcentaje de transmitancia están relacionados mediante la siguiente expresión: (aclaración: cuando se sustituye en la ecuación el *porcentaje* de transmitancia, la absorbancia toma valores entre 0 - 2)

$$A = \log (100 / \%T)$$

$$A = 2 - \log (\%T)$$

LEY DE LAMBERT Y BEER

La Ley de Lambert y Beer enuncia que: *“La cantidad de luz absorbida por una sustancia es proporcional a la intensidad de la luz incidente, a la longitud del trayecto óptico (recorrido del haz de luz) y a la concentración en que se encuentra la sustancia”*.

De esta ley se desprende la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A: absorbancia, es adimensional.

c: concentración de la sustancia, suele expresarse en moles por litro (M).

b: longitud del trayecto óptico (recorrido del haz de luz), se expresa comúnmente en centímetros. Para colocar la sustancia coloreada en un instrumento se emplea una celda o tubo que tiene forma y tamaño invariable y en consecuencia el valor de **b** permanece constante.

ϵ : absorptividad molar (anteriormente, denominada coeficiente de extinción) es la unidad de absorbancia por unidad de concentración por unidad de longitud de la trayectoria de la luz y sus unidades son $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ (puesto que el producto $\epsilon \cdot b \cdot c$ debe ser adimensional). La absorptividad molar es una constante característica de cada sustancia que depende de:

1. *La longitud de onda de la luz incidente,*
2. *La identidad de la sustancia analizada*
3. *Del medio en que ésta se encuentre (pH, solvente e interacción con otras sustancias)*

También la **A** depende de la longitud de onda de la luz incidente. La variable ϵ es un coeficiente de proporcionalidad entre la absorbancia y el producto de **b . c**. Como ϵ varía de acuerdo a la longitud de onda, cuando esta aumenta también se obtiene una mayor **A**.

En base a lo dicho anteriormente se puede resumir la expresión de **A**:

$$A = K \cdot c$$

K es una constante igual a $\epsilon \cdot b$

En estas condiciones, la absorción de la luz por una solución dependerá directamente de la concentración de la solución; sin embargo, es necesario que se cumplan las siguientes condiciones:

- 1) Que se utilice luz monocromática.
- 2) Que el medio sea homogéneo.
- 3) Que no se produzca interacción entre el solvente y el soluto o entre las partículas del soluto.

Limitaciones de la ley de Lambert-Beer: Esta ley permite establecer una relación lineal entre absorbancia y concentraciones de una especie absorbente a una temperatura dada. La representación de absorbancia frente a concentración es una recta que pasa por el origen. Sin embargo, se encuentran frecuentes desviaciones con relación a la proporcionalidad directa entre absorbancia y concentraciones que limitan la aplicación de la ley. Las principales causas son:

La **concentración**. Sólo es aplicable a disoluciones diluidas ($<10^{-2}$ M); en disoluciones concentradas la distancia entre partículas absorbentes es tan pequeña que se produce una modificación en la distribución de cargas de las mismas, lo que se traduce en una alteración en la capacidad de absorción a una longitud de onda determinada. Este efecto se puede eliminar mediante dilución.

La **interacción entre el soluto y la radiación** debida a mecanismos diferentes a la absorción pero que producen alteraciones en la intensidad de la luz, tales como la dispersión, reflexión, la fluorescencia, etc.

Utilización de radiación no monocromática, puesto que la ley está definida para radiaciones con una sola longitud de onda. Sin embargo, si la calidad del equipo no es buena, se obtienen bandas de radiaciones con un estrecho intervalo de longitudes de onda.

Falta de uniformidad de la muestra o especie absorbente, o presencia de impurezas.

Desviaciones químicas, debidas a reacciones del absorbente con el disolvente, como en el caso del dicromato en disoluciones no amortiguadas.



Para cualquier longitud de onda la absorptividad molar del ión dicromato y del cromato son diferentes.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SOLUTO EN UNA DISOLUCIÓN

Supongamos que se tiene una solución de una sustancia cuya concentración es desconocida (c_x) y que ella origina una absorbancia A_1 .

De acuerdo a lo anterior:

$$A_1 = K \cdot c_x$$

Si disponemos de una solución cuya concentración se conoce (c_2), denominada solución testigo, podemos determinar la absorbancia de la misma en iguales condiciones que para el problema. En este caso la absorbancia A_2 estará dada por la relación:

$$A_2 = K \cdot c_2$$

Dividiendo $A_1 = K \cdot c_x$ por $A_2 = K \cdot c_2$ se tiene:

$$A_1 / A_2 = c_x / c_2$$

Despejando el valor de c_x :

$$c_x = A_1 / A_2 \cdot c_2$$

Esto nos permite calcular la concentración de un problema si se dispone de un testigo o patrón de la sustancia y se determina su absorbancia.

En el caso de no poseer un testigo o patrón de referencia se debe realizar la curva de calibración en el cual se aplica la Ley de Lambert y Beer. La realización de esta curva se encuentra explicada en el punto 2 de la parte experimental.

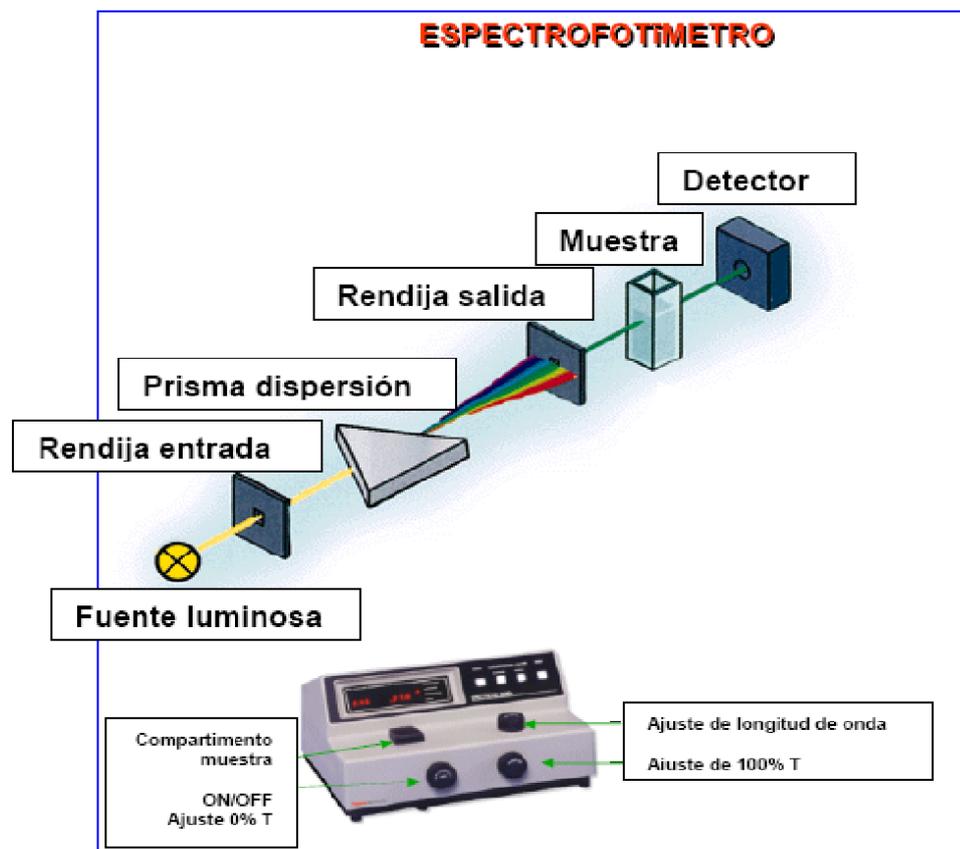
INSTRUMENTACIÓN PARA LA MEDICIÓN DE ABSORBANCIAS: ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra, pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos.

Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas).

Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ($I_0=I_t$), y por tanto la absorbancia es cero. A continuación se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee la absorbancia de ésta.



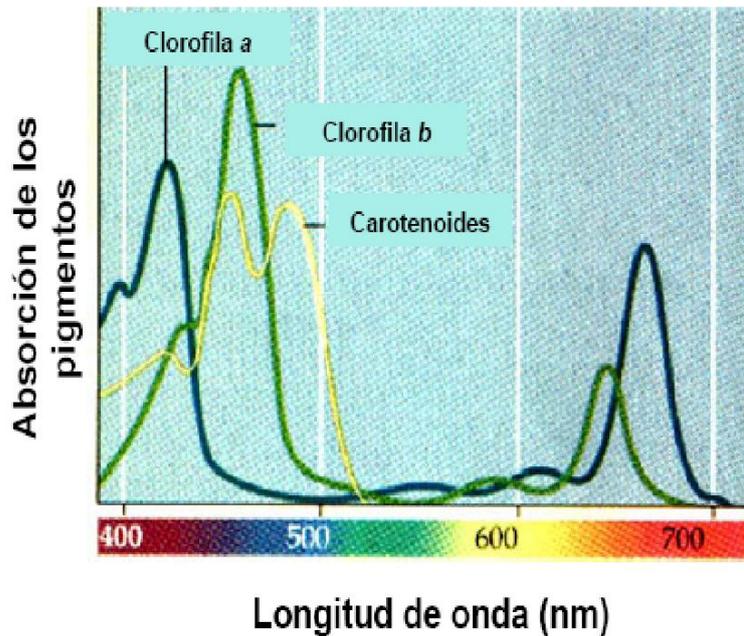
ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Para conocer la longitud de onda más adecuada, en el cual una sustancia presenta la máxima absorbancia o mínima transmitancia, se puede construir una gráfica en la que se representa la absorbancia sobre el eje de ordenadas en función de la longitud de onda de la luz empleada (sobre el eje de abscisas). La curva obtenida se designa **curva de absorción espectral** o **espectro de absorción** y es característica para cada sustancia.

Entonces, podemos definir el espectro de absorción como una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida a diferentes valores de λ .

¿Cómo se construye un espectro de absorción?

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se medirá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia (λ_{max}). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.



Espectros de absorción de tres pigmentos fotosintéticos cloroplastídicos.

Observar que un compuesto puede tener más de un pico de absorción (λ_{\max}).

El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula. No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de λ_{\max} y ϵ , entre los que se incluye el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de los cromóforos vecinos; y cada uno afecta de forma particular. Por ejemplo, variaciones originadas por cambios de pH son debidas al efecto de éste sobre la ionización del compuesto.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Para obtener una curva de calibración de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a λ_{\max} . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de ordenadas (eje y) y los de concentración en el eje de abscisas (eje x). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables.

La representación de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta.

APLICACIONES ANALÍTICAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

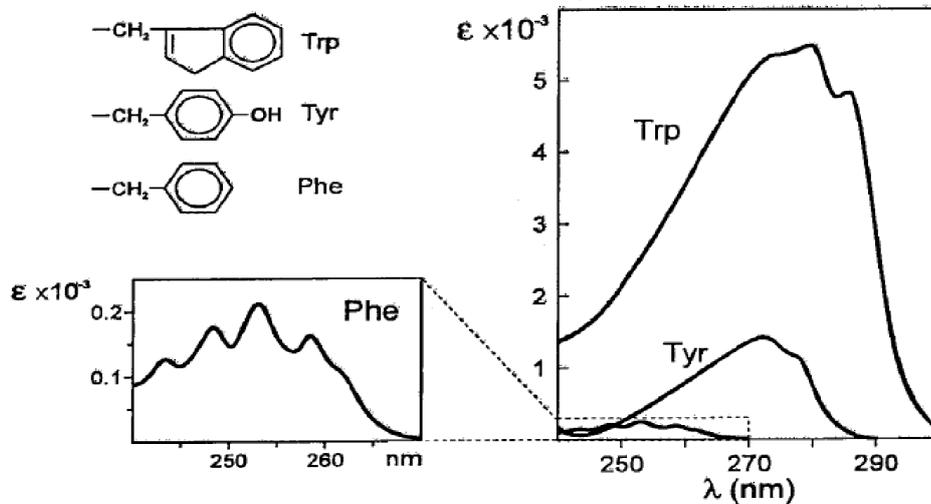
Caracterización de moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos

- Proteínas

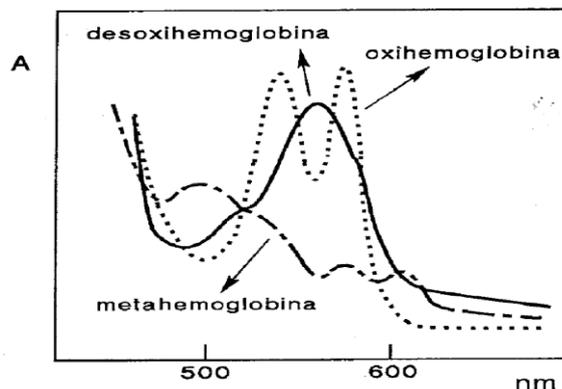
Los cromóforos que usualmente encontramos en las proteínas son:

- Enlaces peptídicos (absorben radiación a ~200 nm)
- Aminoácidos aromáticos (absorben radiación a 250-300nm)
- Grupos prostéticos: hemo, centros metálicos, (absorben en la región visible), NAD⁺ / NADH (absorben en la región ultravioleta)

Aplicaciones: Determinación de concentraciones, estudios estructurales (desnaturalización, cambios conformacionales), unión de ligandos, reacciones enzimáticas.



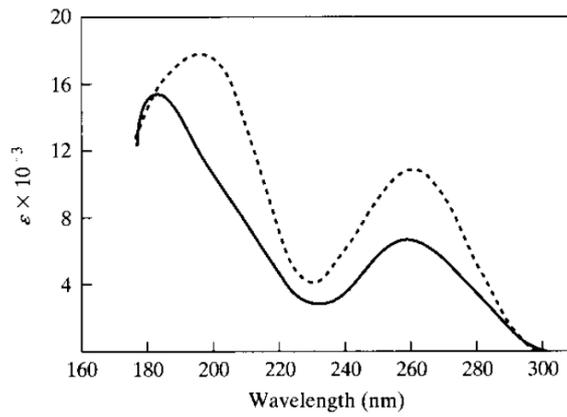
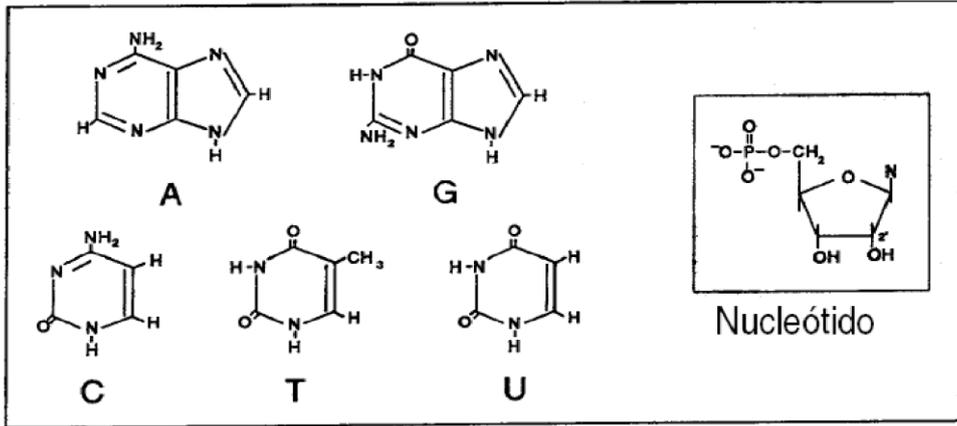
Espectro de absorción de aminoácidos aromáticos



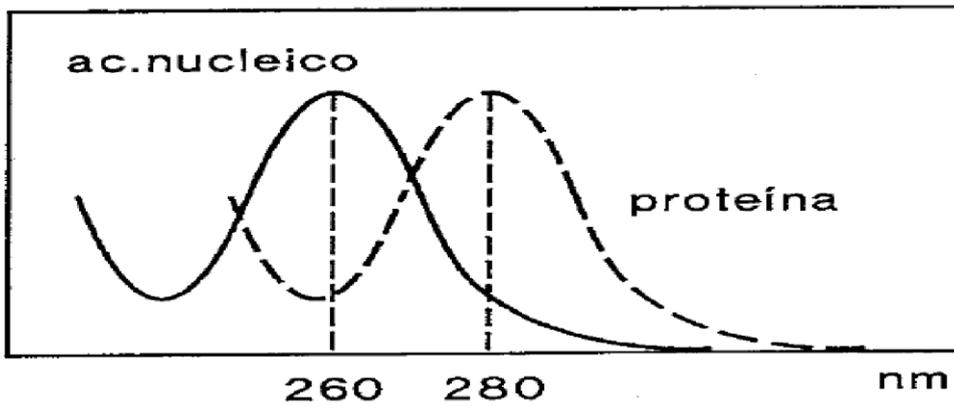
Espectros de absorción de hemoproteínas (proteínas con grupos prostéticos)

- Ácidos nucleicos

Los cromóforos que usualmente encontramos en los ácidos nucleicos son las bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina, timina y uracilo).



Espectro de absorción del ADN nativo de *E. coli* (—) y el espectro promedio para los cuatro desoxinucleótidos en solución acuosa (-----)



BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; 10ma Ed. Editorial El Ateneo; 2016.
2. Principles of Biochemistry, Lehninger A, Nelson DL, Cox M. 2da Ed. Worth Publishers, 1997.
3. Química, R. Chang, 7ma Ed. McGraw-Hill, 2002.
4. Guía de trabajos prácticos de la Facultad de Cs. Medicas de la UNC.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

ESPECTROFOTOMETRÍA: ACTIVIDADES PRÁCTICAS

OBJETIVOS

En el siguiente práctico realizaremos las siguientes determinaciones:

- Determinación de una curva espectral: Relación entre absorbancia y longitud de onda.
- Determinación de una curva de calibración: Aplicación de la Ley de Lambert y Beer.
- Determinación de la concentración de una solución problema

INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría es la medición de energía radiante para determinar la concentración de un compuesto en solución, se aprovecha la absorción de la radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro (400nm y 700nm es detectada por el ojo humano y percibida como luz visible). La muestra absorbe parte de la radiación incidente en ese espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. (Fig 1 a-b).

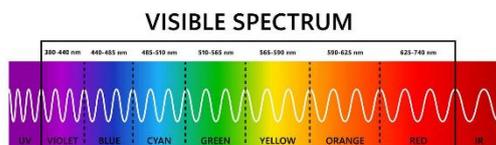


Figura 1a: Espectro UV-Visible



Figura1b: Circulo cromatico

La espectroscopia visible es una de las técnicas más ampliamente y más frecuentemente empleadas en el análisis químico. Para que una sustancia sea activa en el espectro de radiación visible debe tener color: el que una sustancia tenga color, es debido a que absorbe ciertas frecuencias o longitudes de onda del espectro visible y transmite otras más. Por ejemplo: una solución es amarilla debido a que dentro de la región visible absorbe radiación en el rango de 435 a 480 nm. En este rango de longitud de onda se encuentra el color azul del visible, por lo que este compuesto absorbe el color azul y transmite los colores complementarios que dan origen al color amarillo de la solución mencionada. Para medir se utiliza un espectrofotómetro que es un instrumento que cuantifica la cantidad de energía absorbida que se transmite por una solución que contiene algún soluto.

El compuesto orgánico Fenolsulfonftaleina también llamado Rojo de fenol, es un indicador coloreado adecuado para medios ácido y básico según sea el pH al que se esté

trabajando; tiene una masa molar de 354.376 g/mol y su fórmula química es la que se muestra en la figura 2.

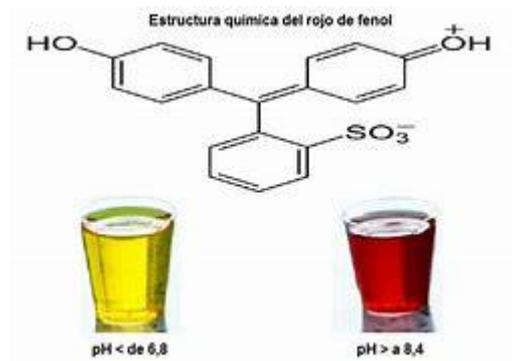


Figura 2: Fórmula química del Rojo Fenol y coloración dependiente del pH

En este práctico aprenderemos a utilizar un espectrofotómetro, determinaremos el espectro de absorción para el rojo fenol en pH básico y construiremos una curva de calibración la cual será empleada para determinar la concentración de una solución problema.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Materiales:

- Espectrofotómetro
- Gradilla
- Cubetas
- Tubos tipo eppendorf de 2 ml
- Pipetas automáticas 200-1000 μ l

Reactivos:

- Rojo Fenol
- Buffer Tris pH 8.6 (el tris es un compuesto con capacidad buffer, es decir, de amortiguar y mantener un pH determinado)

Procedimiento:

A partir de una solución de Rojo de Fenol al 0.1 mg/ml prepare disoluciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubo	Sol. Rojo Fenol (0.1 mg/ml) (ml)	Buffer Tris pH 8.6 (ml)	Concentración (mg/ml)	Absorbancia (nm)
Blanco	-	1		
1	0.4	0.6		
2	0.2	0.8		
3	0.1	0.9		
4	0.05	0.95		
5	0.025	0.975		

Estas disoluciones serán utilizadas para realizar los pasos siguientes pasos:

**ACTIVIDAD PRÁCTICA N°1: Determinación de la curva espectral:
Relación entre absorbancia y longitud de onda.**

Este procedimiento permitirá seleccionar la longitud de onda a la cual el compuesto presenta mayor absorbancia. La misma será utilizada como longitud de onda de trabajo en los puntos 2 y 3.

Tome la disolución preparada en el tubo 3 y mida en el espectrofotómetro la absorbancia de la misma a distintas longitudes de onda en el rango de 400 a 700 nm (variando cada 25 nm) registrando los datos obtenidos.

Grafique los resultados en un sistema de coordenadas, representando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y los de longitud de onda en el eje de las abscisas. Esta gráfica corresponde a la *curva de absorción espectral de la sustancia*. La longitud de onda a la que se registra la mayor absorbancia, *será la longitud de onda de trabajo*.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°2: Determinación de la curva de calibración: Aplicación de la Ley de Lambert y Beer.

Una vez seleccionada la longitud de onda de trabajo se construirá la curva de calibración. Esta es muy utilizada en química analítica para determinar la concentración de una sustancia (analito) en una muestra desconocida. El método se basa en la relación proporcional entre la concentración y una determinada señal analítica (absorbancia). La relación concentración – señal se suele representar en una gráfica a la que se le conoce como curva de calibración o curva de calibrado. Cabe mencionar que en la práctica es muy importante efectuar la medida del “blanco” que es una disolución que contienen todos los reactivos y disolventes usados en el análisis, pero sin el analito. Los blancos miden la respuesta del procedimiento analítico a las impurezas o especies interferentes.

Para obtener la curva de calibración de Rojo Fenol:

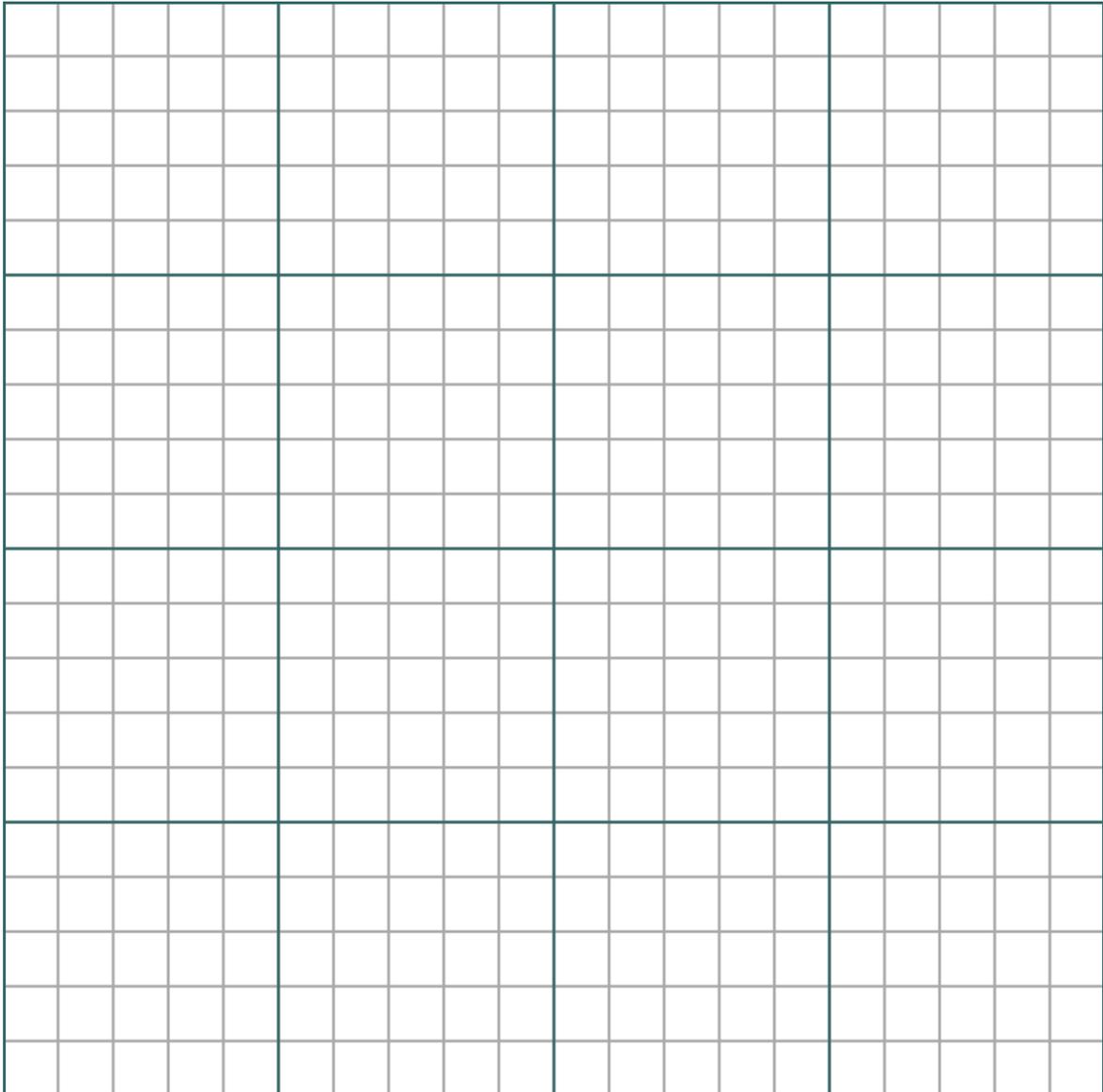
- Mida la absorbancia de cada disolución preparada (tubos 1 al 5) y anote los datos obtenidos.

- Luego grafique los puntos sobre la cuadrícula: al eje de las ordenadas se le asigna el valor de la absorbancia y al eje de las abscisas la concentración del patrón. De esta forma podemos señalar puntos en la gráfica según las coordenadas (concentración (x), absorbancia (y)).

- Finalmente, tome una regla transparente y grafique una recta que pase lo más cerca posible de todos los puntos, así obtendrá la curva de calibración.

Alternativamente, a los puntos les podemos aplicar una regresión lineal, generalmente mediante el ajuste por mínimos cuadrados, para obtener la recta que los relaciona y su función.

Compruebe si se cumple la Ley de Lambert y Beer, de acuerdo a lo expuesto anteriormente. Recordemos: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$. ¿Utilizaría todos los puntos medidos? Justifique.



-

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°3: Determinación de la concentración de una solución problema.

Transfiera 1 ml de una solución de concentración desconocida que Ud. encontrará como “solución problema” a un tubo rotulado como 6, registre su absorbancia y, calcule la concentración en gramos por litro utilizando la curva de calibración graficada o la función lineal obtenida de la regresión lineal.

¿Podría utilizarse esta misma curva espectral y de calibración para la determinación de una solución de concentración desconocida de rojo fenol en pH ácido? Justifique.

Resultados:

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Resuelva los siguientes ejercicios:

1. La concentración sanguínea de hemoglobina es un parámetro empleado para el diagnóstico de anemias. En un laboratorio clínico se llevaron a cabo las siguientes mediciones empleando soluciones de hemoglobina:

Concentración (g/dL)	Absorbancia
0	0
2	0,086
4	0,175
8	0,352
16	0,690
32	1,714

- a) ¿Cómo se llama el gráfico que se puede construir con esos datos?
 - b) ¿Cuáles datos son los que pertenecen al eje de las abscisas? ¿Cuáles datos pertenecen al eje de las ordenadas?
 - c) ¿Cuál es la utilidad de ese gráfico?
2. Los valores normales de hemoglobina para un hombre adulto son 13.8 a 17.2 gramos por decilitro (g/dL). La regresión lineal de los datos obtenidos en el punto anterior arrojó esta ecuación:
$$\text{Abs} = 0,053 x - 0,046$$

Si la absorbancia de una muestra de sangre del paciente Jorge fue de 0,512. ¿El paciente presenta anemia?
 3. ¿Por qué la exposición a la radiación ultravioleta causa daños en la piel?
 4. ¿Cuál es el componente del cabello que lo hace coloreado? ¿Y el de la piel? ¿Qué pasaría si no tuviéramos esos componentes?

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; 10º Edición; Editorial El Ateneo; 2016.
2. “Principles of Biochemistry”, Lehninger A, Nelson DL, Cox M. Worth Publishers, 2º edition, 1997.
3. Química, R. Chang, 7ª Edición, McGraw-Hill, 2002.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5

BIOINFORMÁTICA DE PROTEÍNAS

OBJETIVOS

- Proveer una introducción a la bioinformática, proporcionando una familiarización con las bases de datos, formato de las secuencias, etc.
- Utilizar herramientas web online y programas de descarga gratuita para analizar las relaciones entre las estructuras primarias secundarias y terciarias de las proteínas y su función.
- Explorar las funcionalidades de la base de datos Uniprot.

INTRODUCCIÓN

La bioinformática es la aplicación de tecnología de computadores a la gestión y análisis de datos biológicos. Los términos bioinformática, biología computacional y biocomputación, son utilizados en muchas ocasiones como sinónimos. Hacen referencia a campos de estudios interdisciplinarios muy vinculados que requieren el uso o el desarrollo de diferentes técnicas que permitan analizar datos, o simular sistemas o mecanismos, todos ellos de índole biológica. Los principales esfuerzos de investigación en estos campos incluyen el alineamiento de secuencias, la predicción de genes, montaje del genoma, alineamiento estructural de proteínas, predicción de estructura de proteínas, predicción de la expresión génica, interacciones proteína-proteína, y modelado de la evolución.

Tradicionalmente, la investigación en las ciencias biológicas se ha realizado en el laboratorio experimental, pero la inmensa cantidad de datos generados en los últimos años requiere el desarrollo de herramientas computacionales que permitan extraer toda la información contenida en esos datos para generar nuevo conocimiento. Por eso, hoy en día es difícil entender la investigación en estas áreas sin la bioinformática. Según la definición del Centro Nacional para la Información Biotecnológica *National Center for Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés): “la Bioinformática es un campo de la ciencia en el que confluyen varias disciplinas: la biología, la computación y las tecnologías de la información. Su fin es facilitar el descubrimiento de nuevos conocimientos y el desarrollo de perspectivas globales a partir de las cuales puedan discernirse principios unificadores en el campo de la biología. La bioinformática, por tanto, se ocupa de la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de información biológica, mediante la aplicación de técnicas y herramientas procedentes de las matemáticas, la biología y la informática, con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos”.

Los nuevos avances han generado que varias disciplinas de la investigación se interrelacionen, como la medicina, la genética, la biología, la bioquímica, la biotecnología y la computación, entre otras. Los grandes centros cuentan con grupos multidisciplinarios, que cooperan armónicamente y retroalimentándose constantemente, para brindar una comprensión de un fenómeno fisiológico de manera integral. Es por ello que en la actualidad es de vital importancia conocer el manejo de las herramientas bioinformáticas, con la finalidad de analizar y correlacionar la información que se obtenga en el laboratorio.

BASES DE DATOS DE SECUENCIAS BIOLÓGICAS

Una base de datos biológica es una biblioteca de información sobre ciencias de la vida, recogida de experimentos científicos, literatura publicada, tecnología de experimentación de alto rendimiento y análisis computacional. Contiene información de áreas de investigación incluyendo genómica, proteómica, metabolómica, expresión génica mediante microarrays, filogenética, etc. La información contenida en bases de datos biológicas incluye funciones, estructura y localización (tanto celular como cromosómica) de genes, efectos clínicos de mutaciones, así como similitudes de secuencias y estructuras biológicas. Estas son de libre acceso (acceso gratuito, sin restricciones), se actualizan periódicamente (ya que constantemente se están generando nuevos datos), son estructuradas (la información está ordenada de una manera específica) y poseen referencias cruzadas (que vinculan diversas bases de datos).

Estas bases de datos tienen un sistema por el cual se le asigna un *Accession Number* (número de acceso) a cada secuencia **única** y a través de este número es posible identificar de manera inequívoca una secuencia dada. Una típica “entrada” (hoja de datos) de cualquiera de estas bases de datos consta de un número de acceso, el nombre de la secuencia con información relacionada, la secuencia propiamente dicha, y un número de “*features*” (características) o “*anotaciones*” que pueden ser útiles al lector.

Las principales bases de datos de secuencias biológicas de **nucleótidos** son:

- GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- EMBL ([The European Molecular Biology Laboratory](#))
- DDBJ (DNA DataBank of Japan).

Estas bases de datos de secuencias nucleotídicas contienen más de 1 billón (un millón de millones) de bases. Hasta febrero de 2023 se habían depositado 1.731.302.248.418 de nucleótidos contenidos en 241.830.635 secuencias en GenBank, ¿asombroso, no? Si bien son mantenidas por distintos organismos en distintos países, existe una coordinación entre las distintas bases. Una secuencia enviada a cualquiera de las bases se verá reflejada en las otras dos, la frecuencia de actualización entre las distintas bases genéticas es diaria.

GenBank and WGS Statistics



Número de bases (izquierda) y de secuencias (derecha) depositadas en GenBank a través del tiempo

Para acceder a la información de estas bases de datos, las dos herramientas principales son SRS y Entrez, dos portales web que nos permiten hacer búsquedas en estas bases de datos y encontrar secuencias que sean de interés. SRS es el buscador de EMBL y Entrez corresponde a Genbank. Otra manera de buscar en estas bases de datos es por medio de programas que permiten buscar secuencias similares a una secuencia “*Query*” (consulta) que nosotros suministramos al programa.

GenBank Overview

What is GenBank?

GenBank[®] is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences ([Nucleic Acids Research, 2013 Jan;41\(D1\):D36-42](#)). GenBank is part of the [International Nucleotide Sequence Database Collaboration](#), which comprises the DNA DataBank of Japan (DDBJ), the European Nucleotide Archive (ENA), and GenBank at NCBI. These three organizations exchange data on a daily basis.

A GenBank release occurs every two months and is available from the [ftp site](#). The [release notes](#) for the current version of GenBank provide detailed information about the release and notifications of upcoming changes to GenBank. Release notes for [previous GenBank releases](#) are also available. GenBank growth [statistics](#) for both the traditional GenBank divisions and the WGS division are available from each release.

An [annotated sample GenBank record](#) for a *Saccharomyces cerevisiae* gene demonstrates many of the features of the GenBank flat file format.

Access to GenBank

There are several ways to search and retrieve data from GenBank.

- Search GenBank for sequence identifiers and annotations with [Entrez Nucleotide](#).

GenBank Resources

- [GenBank Home](#)
- [Submission Types](#)
- [Submission Tools](#)
- [Search GenBank](#)
- [Update GenBank Records](#)

De manera similar, las principales bases de datos de secuencias **proteicas** son tres:

- TrEMBL: por *Translation of EMBL Nucleotide Sequence Database* incluye la traducción de todas las secuencias codificantes derivadas del (EMBL-BANK) y que todavía no han podido ser anotadas en Swiss-Prot.
- PIR: por *Protein Information Resource* está dividida en cuatro sub-bases que tienen un nivel de anotación decreciente.
- SwissProt: contiene secuencias anotadas o comentadas, es decir, cada secuencia ha sido revisada, documentada y enlazada a otras bases de datos.

Las tres se combinan para formar **UniProt**, la cual es una base de datos central de proteínas a nivel mundial y contiene información “curada” manualmente (revisada y corregida de manera manual luego de una predicción bioinformática automatizada).

Las bases de datos proteicas suelen contener más información y predicciones bioinformáticas que las bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos. También contienen gran cantidad de referencias cruzadas con otras bases de datos proteicas y clasificaciones de las proteínas en familias, así como referencias cruzadas con bases de datos especializadas.

Por último, un tipo de base de datos cuyo crecimiento es cada vez más acelerado e importante es la de estructuras tridimensionales de proteínas, resueltas por cristalografía de rayos X o por resonancia magnética nuclear. Estas bases de datos son principalmente tres: [RCSB PDB](#) (USA), [MSD-EBI](#) (Europa) y [PDBj](#) (Japón). Estas tres bases de datos están fusionadas en la llamada Worldwide Protein Data Bank (wwPDB).

FORMATOS DE SECUENCIAS

Los principales formatos de secuencias “*flat*” o “*plain text*” (solo texto) que son necesarios conocer son el **formato FASTA** y el **formato NCBI**. El formato FASTA es uno de los formatos más útiles en los cuales podemos guardar una secuencia ya que la gran mayoría de los programas bioinformáticos pueden cargar archivos guardados en este formato. El formato FASTA consta de una primera línea donde se observa el carácter “>” que indica el comienzo de una “entrada”, luego en esa misma primera línea por lo general se detallan el accession number y el nombre de la secuencia. A partir de la segunda línea

solo se observa secuencia. Ejemplos de una secuencia nucleotídica y de una secuencia proteica en formato FASTA:

```
>embl|J00703|J00703 Rattus norvegicus pancreatic amylase mRNA, complete cds.
acaactcaaagcaaataagagttcgttctgctgctttccctcattgggttctgctgggctcaatatgaccacacactg
cggatgggaggactgctattgtccacctgttcgagtgccgctgggctgatattgccaaggaatgtgagcgggtactta
gcacctaagggattggaggggtg
```

```
>AAA40725.2
MKFVLLLSLIGFCWAQYDPHTADGRTAIVHLFEWRWADIAKECERYLAPKGFEGG
VQVSPNENIINNPSPRPWWERYQPISYKICSRSGNENEFKDMVTRCENNVGRIY
VDAVINHMC GSGNSAGTHSTCGSYFNPNNREFSAVPYSAWYFNDNKNGEINN
YNDANQVRN
```

Recuerden que en las secuencias proteicas cada aminoácido está representado por una letra de la siguiente manera:

A - Alanina (Ala)	M - Metionina (Met)
C - Cisteína (Cys)	N - Asparragina (Asn)
D - Acido Aspártico (Asp)	P - Prolina (Pro)
E - Acido Glutámico (Glu)	Q - Glutamina (Gln)
F - Fenilalanina (Phe)	R - Arginina (Arg)
G - Glicina (Gly)	S - Serina (Ser)
H - Histidina (His)	T - Treonina (Thr)
I - Isoleucina (Ile)	V - Valina (Val)
K - Lisina (Lys)	W - Triptofano (Trp)
L - Leucina (Leu)	Y - Tirosina (Tyr)

El formato NCBI es muy parecido al formato FASTA con la excepción de que al principio de cada línea se observa la posición que ocupa el primer aminoácido/nucleótido de esa línea con respecto al comienzo de la secuencia. La otra diferencia es que los nucleótidos/aminoácidos se encuentran agrupados en columnas de a diez. Aunque este formato puede ser más fácil de visualizar para el ojo humano, la mayoría de los programas bioinformáticos no puede utilizar secuencias en este formato.

E6 [Human papillomavirus]

NCBI Reference Sequence: YP_009163891.1

```
1 matehprtle eyclqfddtf fnlhiscifc srllnyqdl sfsllkhlslv frdsqyyacc
61 rncrvsarf efenhyqcsv qsvnietvae kalnclivrc yncltlllda ekydivcsgg
121 lfhlvrsqwr glcrectpr
```

MODELADO PREDICTIVO DE ESTRUCTURAS PROTEICAS

Las proteínas existentes en la naturaleza representan el estado actual de larguísimos procesos de evolución durante los cuales se fueron seleccionando, a lo largo de millones de años, aquellas formas con mayor capacidad de persistencia y propagación en ambientes cambiantes. En otras palabras, aquellas cuya función resultó más favorable a la adaptación

de los organismos a diferentes contextos ambientales. El rápido crecimiento de las herramientas biotecnológicas ha hecho posible el diseño de nuevas proteínas o la modificación artificial de aquellas ya conocidas, con el fin de optimizar sus funciones según diversas necesidades. Estas capacidades son muy aprovechadas, por ejemplo, en el área de las ciencias médicas para el diseño de nuevas drogas (como antivirales) o en biotecnología para la producción de enzimas que catalizan de manera optimizada diferentes reacciones de interés. Sin embargo, para dominar las funciones biológicas de las proteínas y el descubrimiento de fármacos es necesaria la comprensión precisa de la **estructura tridimensional** (3D) de las mismas. Experimentalmente esta información se obtiene por cristalografía, resonancia magnética nuclear o microscopía electrónica, pero constituyen métodos difíciles y laboriosos. Con el progreso de las tecnologías de secuenciación de ADN, la brecha entre el número de estructuras 3D de proteínas identificadas y las secuencias de proteínas obtenidas se amplía continuamente. Recordemos que la información básica para la constitución de estructuras proteicas se encuentra contenida en la secuencia de aminoácidos que las codifican, es decir, en su **estructura primaria**. Entonces, utilizando a los aminoácidos como unidades discretas, podemos “leer y escribir” en código la secuencia específica con la que queremos expresar una macromolécula tridimensional de funcionamiento adecuado. Es decir, si diseñamos secuencias primarias apuntaremos a que las interacciones entre los aminoácidos elegidos generen, de manera jerárquica, plegamientos e interacciones determinantes de estructuras cada vez más complejas (secundaria, terciaria, cuaternaria). Como si se tratara de una escultura molecular, debemos ser capaces de predecir qué secuencia específica se manifestará en la forma funcional que necesitamos. La **predicción y modelado** de la estructura de la proteína es un proceso de inferencia que predice las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas en función de la estructura primaria.

La estructura espacial de las proteínas proporciona abundante información para hipótesis y análisis de funciones biológicas. Como ya hemos visto, la estructura secundaria es aquella que adquieren las proteínas naturalmente en solución y se sostiene mediante una red dinámica de puentes de hidrógeno que conectan a nivel local diferentes regiones del polipéptido, formando hélices α , láminas β y regiones de orden más irregular (desordenadas o “al azar”). Básicamente, el problema de diseño sería “¿cuál es la estructura secundaria de una secuencia proteica?”. A esta pregunta los bioinformáticos la responden usando algoritmos que buscan y reconocen en dicha secuencia los segmentos con mayor probabilidad de formar hélices, láminas y otras estructuras que caracterizan su topología secundaria. Por un lado, dadas las coordenadas atómicas de una proteína pueden predecirse los ángulos que habrá entre los residuos en una conformación más o menos estable. Por otro lado, pueden encontrarse patrones de puentes hidrógeno entre grupos $-\text{CO}$ y $-\text{NH}$ del esqueleto peptídico, los cuales permitirán inferir, al menos en parte, las tensiones de fuerzas y sus estructuras secundarias resultantes. Muchos de estos predictores extraen información evolutiva de otras secuencias similares u homólogas disponibles en bases de datos públicas de secuencias. Un predictor de estructuras secundarias muy utilizado es [PSIPRED \(PSIPRED Workbench \(ucl.ac.uk\)\)](http://www.ebi.ac.uk/PSIPRED/) en el que, a modo de prueba, podemos cargar esta secuencia correspondiente a hemoglobina...

MKHTFSLRTEWTGDRSGTSGVGDYDRSVVIQDAAVGEIQASARPFRGDDSKWNPETLLLGLALAECHVL

SYLHVAATSGVVVTGMTGVEGELEVDGDGAGRFAITLRPEVTLQDEADRERAEALHAEHRLCFIANS

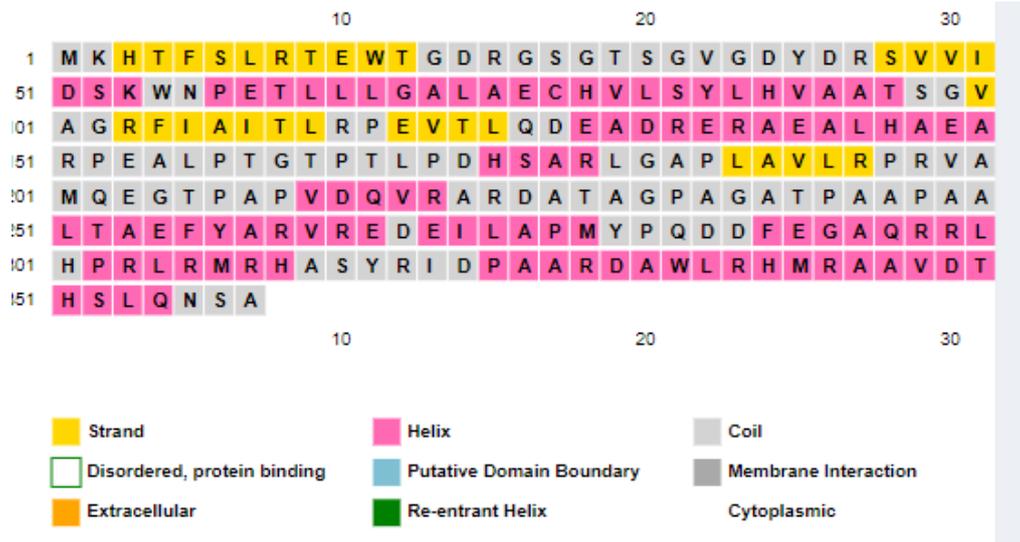
LSAPVTVEPVRPEALPTGTPTLPDHSARLGAPLAVLRPRVAKGPSRVVTGLAERPTEVEPVMQEGTPAPVD

QVRARDATAGPAGATPAAPAAPGQATSFYDAVGGRRPTFDRLTAEFYARVREDEILAPMYPQDDFEGAQRR
LLMFLEQYWGGPRTYSEERGHPRLRMRHASRYRIDPAARDAWLRHMRAAVDTLELSPLHEAELWDYLERA
HSLQNSA

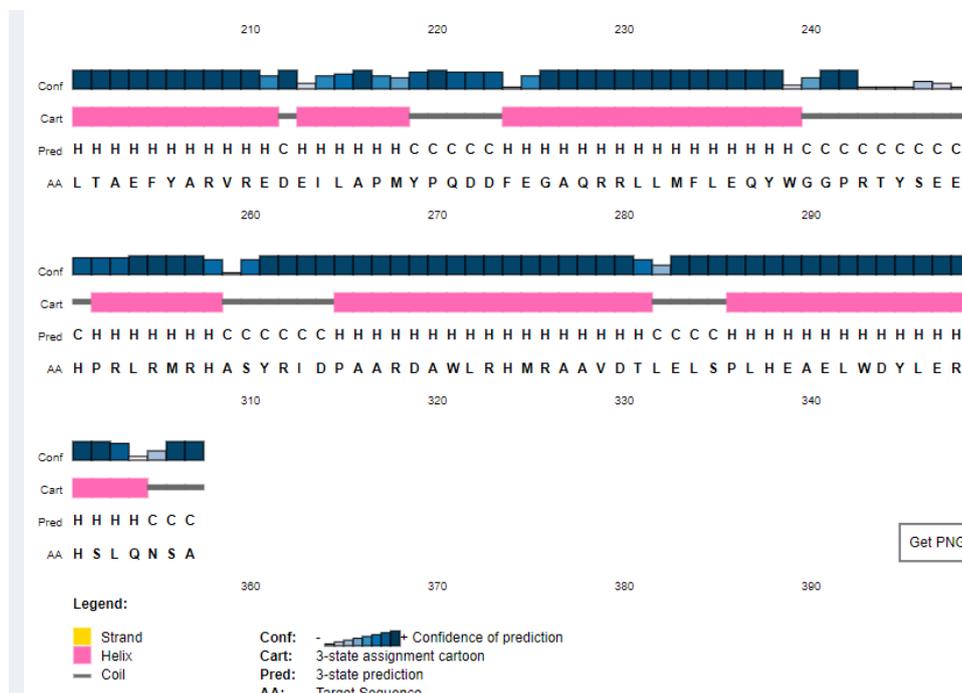
Luego, ajustando dos parámetros básicos (datos de secuencia y búsqueda de estructura secundaria) y cargando nuestra dirección de correo electrónico al final, ponemos a correr el algoritmo y el *software* enviará el resultado de predicción una vez que lo obtenga (puede demorar un buen rato).

The screenshot shows a web interface for protein structure prediction. The 'Data Input' section has a 'Select input data type' dropdown with 'Sequence Data' selected (circled in red) and 'PDB Structure Data' as an alternative. Below this is a 'Choose prediction methods (hover for short description)' section. Under 'Popular Analyses', 'PSIPRED 4.0 (Predict Secondary Structure)' is checked (circled in red), while 'DISOPRED3 (Disopred Prediction)', 'MEMSAT-SVM (Membrane Helix Prediction)', and 'pGenTHREADER (Profile Based Fold Recognition)' are unchecked. Under 'Contact Analysis', 'DeepMetaPSICOV 1.0 (Structural Contact Prediction)' and 'MEMPACK (TM Topology and Helix Packing)' are unchecked. The 'Fold Recoanition' section is partially visible at the bottom.

A continuación se muestran capturas parciales del resultado de esta predicción, donde se marcan en amarillo las regiones con altas probabilidades de constituir hebras conformantes de láminas, en rosa las hélices y en gris claro los estados “superenrollados”. Esta identificación se realiza tanto sobre la secuencia primaria de aminoácidos.



como en un esquema más gráfico (*cartoon*). Aquí las barras azules representan el nivel de confianza de la predicción (de menor a mayor en gradiente de tonalidad)



ACTIVIDAD SUGERIDA: Con tiempo y desde sus computadoras, pueden realizar una prueba de modelado en PSIPRED utilizando la secuencia de aminoácidos de un fragmento parcial de la proteína de envoltura del virus Dengue, que se encuentra a continuación en formato FASTA:

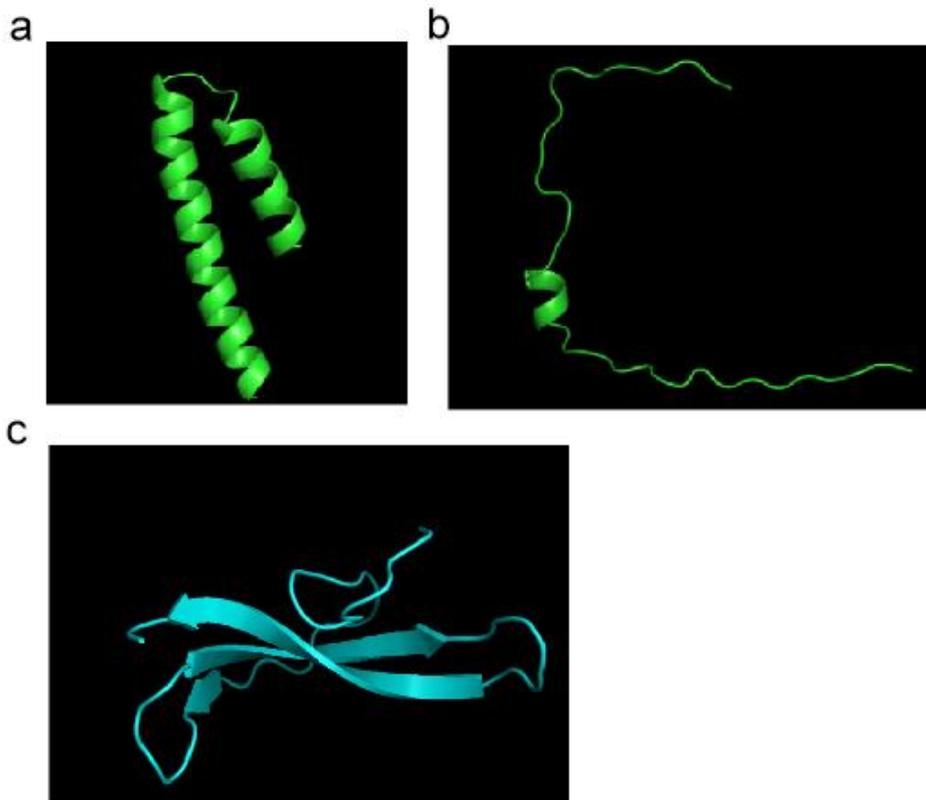
```
>AFZ40103.1 envelope, partial [Dengue virus 3]
```

```
MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLCIEGKITNITT
```

```
DSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWNGCGLFGKGSVLTCAKFQCLEPIEGKVQYENLKYTVI
```

ITVHTGDQHVGNETQGVTAETTPQASTTEAILPEYGTGLGLECSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQW
 FFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTISIFAGH
 LKCRLEKMDKLELKGMSYAMCTNTFVLKKEVSETQHGHTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQKAHNGRLI
 TANPVVTKKEEPVNIEAEPFPGESNIVIGIGDNALKINWYKKGSSIGKMFPEATARGARRMAILGDTAWDF
 GSVGGVLNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGIITLYLGAV
 VQA

A continuación se muestra el modelado virtual de una secuencia de aminoácidos de una hélice alfa (**a**), luego la misma secuencia pero con aminoácidos cambiados por prolinas (**b**), cuyo nitrógeno de su enlace peptídico no tiene hidrógenos disponibles para formar puentes de hidrógeno, por lo que la hélice se desestabiliza; en **c**) se observa el modelado de una lámina beta. Estos esquemas se obtuvieron utilizando el software [PyMol](#), un sistema gráfico programado en lenguaje “[Python](#)” para la generación y visualización en tiempo real de esquemas moleculares y animaciones de alta resolución.



Las secuencias aminoacídicas correspondientes a cada estructura graficada son las siguientes:

a) Sección de hélice α de interleucina 6 (IL6); posiciones (48-68) + (133-160)

TSQVGGGLITHVLWEIVEMRKEDNKKDKARVLQRDTETLIHIFNQEVKDL

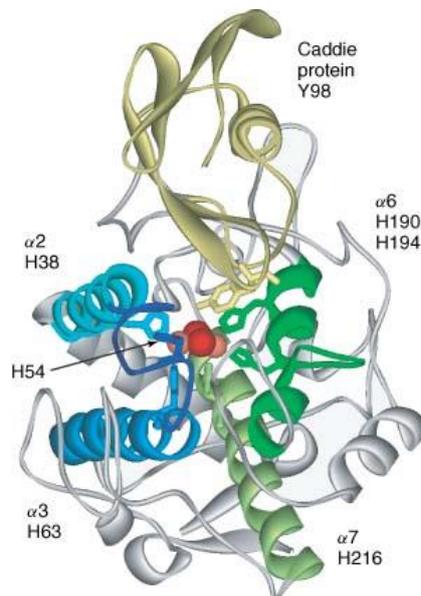
b) Misma sección de hélice modificada con prolinas (en rojo)

TSQVGGGLITHVLPEPVEMPPPDNKKPKARPLQDPETPIHIFPQEPPDL

- c) Sección de láminas β de enzima beta secretasa; posiciones (86-93) + (99-102) + (122-132) + (135-147) + (149-152) + (155-168)

FAVGRDLRKGVYVPYGKWEGLGTDLVSPHGPTVRANIAAITESDK

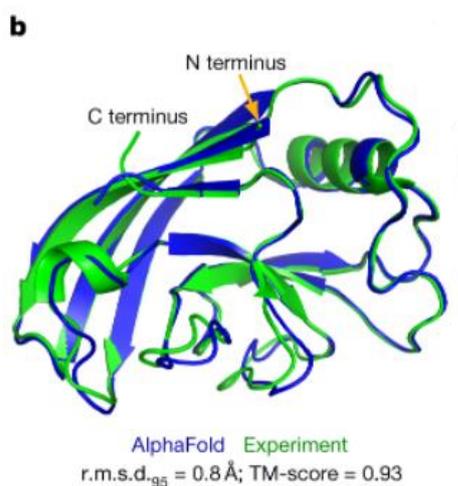
Pasando a otro nivel de análisis, es sabido que los proyectos de secuenciación genómica a gran escala generan cantidades inmensurables de secuencias proteicas. Para poder comprender y manipular estas macromoléculas y sus funciones, es necesario contar con capacidades que permitan conocer sus estructuras a niveles superiores que el primario y secundario. De manera experimental, para obtener evidencias sobre niveles más complejos de estructuras, como las terciarias, es necesaria la aplicación de técnicas caras y muy laboriosas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN). Para predecir estas estructuras por vías bioinformáticas (*in silico*), debemos recorrer todas las posibles conformaciones tridimensionales que puede adquirir una cadena peptídica, lo cual resulta en un altísimo costo computacional. Este tipo de modelado *de novo* se basa en principios físicos y procedimientos que encuentran las conformaciones energéticamente óptimas o más estables. Las limitaciones computacionales de estos métodos hacen que sean utilizados para predecir estructuras terciarias de proteínas pequeñas. Una forma de achicar este espacio de búsqueda consiste en asumir que la proteína analizada adoptará una estructura similar a la de otra proteína homóloga, cuya conformación ya ha sido demostrada de manera experimental por alguna de las técnicas biofísicas mencionadas anteriormente. Es decir que ahora el problema es “en cuánto se parecen las estructuras de dos proteínas A y B?”. La solución bioinformática consiste en buscar subestructuras del máximo tamaño posible sub-A y sub-B que minimicen la distancia entre átomos equivalentes de las dos proteínas.



Estructura de la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (tomada de [Trepper et al. 2011](#))

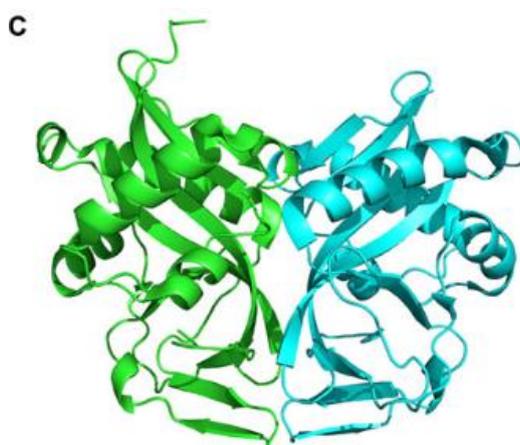
Los algoritmos basados en inteligencia artificial incrementan de manera muy notable las potencias de búsqueda de estructuras conformacionales. Por ejemplo, el programa AlphaFold ([Jumper et al., 2021](#)) utiliza un algoritmo de redes neuronales para realizar

predicciones de muy alta confiabilidad, las cuales alcanzan niveles de precisión que se aproximan mucho a las estructuras demostradas de manera experimental. A continuación se muestra una imagen tomada de la publicación citada en la que se superpone la estructura predicha (azul) sobre la observada (verde).



En los dominios de la estructura cuaternaria, unas moléculas interaccionan con otras para llevar a cabo funciones importantes en el contexto celular. Su estado habitual es en complejo con otras moléculas, formando interfaces muy importantes como las de reconocimiento de ligandos por parte de sus receptores, por ejemplo en el caso de las inmunoglobulinas en el reconocimiento de antígenos. En general podemos decir que proteínas con secuencias parecidas suelen tener interfaces similares cuando forman complejos. En base a esta norma, se pueden usar métodos de predicción de acoplamiento proteína-proteína (*docking*) para estimar la estructura del complejo que conforman. Estos diseños son muy utilizados actualmente para el diseño de nuevas drogas con potencial farmacológico, como por ejemplo, moléculas sintéticas diseñadas para acoplarse a proteínas virales con el fin de neutralizar la capacidad infectiva de estas partículas.

A continuación se muestra un modelado del acoplamiento simétrico entre proteínas de micobacterias [AAC(2’)] que confieren resistencia a antibióticos aminoglucósidos (tomada de [Christoffer et al., 2021](#)).



UNIPROT

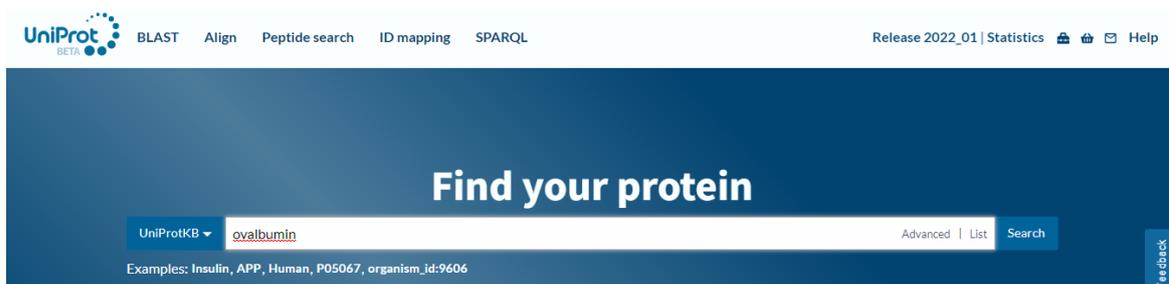
Uniprot es un consorcio que comprende el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Recurso de Información de Proteínas (PIR). La misión de UniProt es proporcionar a la comunidad científica un recurso integral, de alta calidad y de libre acceso de secuencias de proteínas e información funcional sobre ellas.

UniProt Knowledgebase (<https://www.uniprot.org/uniprot/>) es una base de datos de proteínas radicada en Uniprot, utilizada para acceder a información funcional sobre estas biomoléculas. Cada entrada de UniProtKB contiene la secuencia de aminoácidos, el nombre o la descripción de la proteína, los datos taxonómicos e información sobre la bibliografía. Además se agregan tantas anotaciones como sea posible, incluyendo ontologías biológicas ampliamente aceptadas, clasificaciones y referencias cruzadas, e indicaciones de la calidad de la anotación en forma de atribución de evidencia de datos experimentales y computacionales. Esta base de datos consta de dos secciones:

- **UniProtKB/Swiss-Prot** contiene registros de secuencias de proteínas no redundantes y anotados manualmente de alta calidad. La anotación manual consiste en el análisis, la comparación y la fusión de todas las secuencias disponibles para una proteína determinada, así como una revisión crítica de los datos experimentales y predichos asociados. Los curadores de UniProt extraen información biológica de la literatura y realizan numerosos análisis computacionales. UniProtKB/ Swiss-Prot tiene como objetivo proporcionar toda la información relevante conocida sobre una proteína en particular.
- **UniProtKB/TrEMBL** contiene registros analizados computacionalmente que esperan una anotación manual completa. Las secuencias de proteínas derivan de la traducción de secuencias depositadas en bases de datos de ácidos nucleicos.

ACTIVIDAD: EXPLORACIÓN DE LOS RECURSOS DE UNIPROTKB

Cada entrada de Swiss-Prot contiene información sobre una o más secuencias de proteínas derivadas de un gen en una especie. Diferentes secciones de la entrada reportan información biológica específica. Exploraremos las principales secciones que se pueden encontrar en una entrada de UniProtKB y durante la clase teórico-práctica estas serán explicadas empleando una proteína de ejemplo. El primer paso es la búsqueda de la secuencia de interés empleando el nombre de la proteína, su organismo, etc o si se lo conoce, el número de identificación. Para ello se usa la barra de búsqueda en la parte superior de la página (<https://beta.uniprot.org/>). La búsqueda se debe efectuar en idioma inglés.



The screenshot shows the UniProt search interface. At the top left is the UniProt logo with 'BETA' below it. Navigation links include 'BLAST', 'Align', 'Peptide search', 'ID mapping', and 'SPARQL'. On the right, it says 'Release 2022_01 | Statistics' followed by icons for a home page, a list, and help. The main heading is 'Find your protein'. Below this is a search bar with a dropdown menu set to 'UniProtKB' and the search term 'ovalbumin'. To the right of the search bar are the options 'Advanced | List' and a 'Search' button. Below the search bar, it shows 'Examples: Insulin, APP, Human, P05067, organism_id:9606'. On the far right, there is a vertical 'Feedback' button.

Luego de que el motor de búsqueda arroje los resultados obtenidos, se puede seleccionar la entrada deseada. A la izquierda se pueden aplicar filtros para restringir los resultados, tales como el organismo de origen de la proteína de interés, o el estado de la secuencia, si es curada (estrella amarilla, SwissProt) o no (estrella gris, TrEMBL).

The screenshot shows the UniProt search interface. At the top, there's a search bar with 'hemoglobin' entered. Below the search bar, the status indicates 'UniProtKB 62,158 results'. On the left, there are filters for 'Model organisms' (Human, Mouse, Zebrafish, Rat, Bovine) and 'Taxonomy'. The main content area shows two protein entries:

- P68871 · HBB_HUMAN**: Hemoglobin subunit beta · Homo sapiens (Human) · Gene: HBB · 147 amino acids · Evidence at protein level · Annotation score: 5/5. It lists various keywords like #Hypotensive agent, #Vasoactive, #Oxygen transport, #Transport, #Congenital dyserythropeitic anemia, #Disease variant, and #Hereditary hemolytic anemia. It also shows 11 PTMs, 261 reviewed variants, 4 interactions, 4 diseases, 290 3D structures, and 153 reviewed publications.
- P02100 · HBE_HUMAN**: Hemoglobin subunit epsilon · Homo sapiens (Human) · Gene: HBE1 (HBE) · 147 amino acids · Evidence at protein level · Annotation score: 5/5. It lists #Oxygen transport and #Transport. It shows 2 PTMs, 3 interactions, 1 3D structure, and 8 reviewed publications.

Al acceder a la secuencia de interés, podremos encontrar información sobre la misma. Emplearemos la proteína hemoglobina como ejemplo. A la izquierda de la página, se disponen las principales secciones de la entrada, como por ejemplo: función, nombre y taxonomía, etc, las exploraremos a continuación. El nombre de cada sección incluye una letra “i”, la cual provee información sobre el contenido de esa sección.

- 1) **Entry information:** Cada entrada está asociada con un identificador estable único y citable: el número de entrada principal. En este ejemplo el número de acceso es “P68871”. El nombre de la entrada es único, pero no estable. Se proporciona información adicional sobre el historial de entradas.
- 2) **Function:** Esta sección proporciona cualquier información útil sobre la proteína, principalmente conocimiento biológico. La información se archiva en diferentes subapartados, como función, actividad catalítica, cofactor, etc. En este ejemplo observamos que la hemoglobina tiene un sitio de unión a metales, específicamente los aminoácidos 64 y 93 que unen hierro.

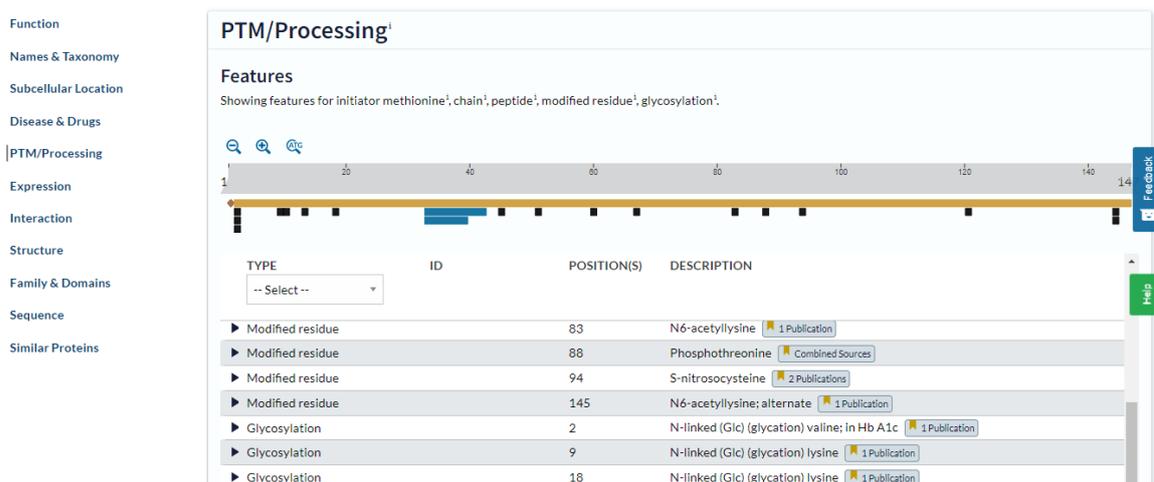
The screenshot shows the UniProt entry page for P68871 (HBB_HUMAN). The left sidebar has a navigation menu with 'Function' selected. The main content area shows the following information:

- Function:** Involved in oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues. (1 Publication)
- LVV-hemorphin-7 potentiates the activity of bradykinin, causing a decrease in blood pressure.
- Spinorphin:** Functions as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes such as DPP3, and as a selective antagonist of the P2RX3 receptor which is involved in pain signaling, these properties implicate it as a regulator of pain and inflammation.
- Miscellaneous:** One molecule of 2,3-bisphosphoglycerate can bind to two beta chains per hemoglobin tetramer.

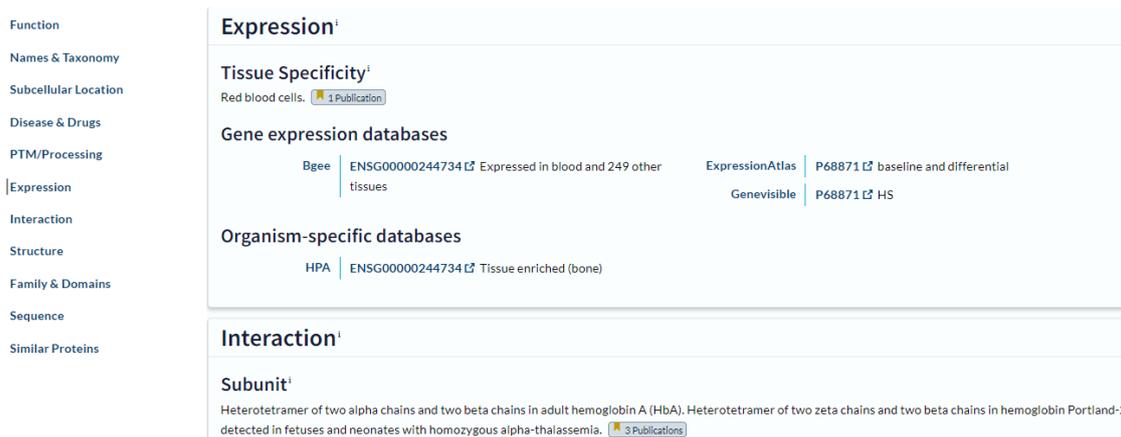
- 3) **Nombres y taxonomía:** Esta sección proporciona información sobre los nombres y sinónimos de la proteína y el gen y sobre el organismo que es la fuente de la

secuencia de la proteína. Un nombre alternativo es globina beta y el organismo de donde proviene es *Homo sapiens*, nombre científico del humano.

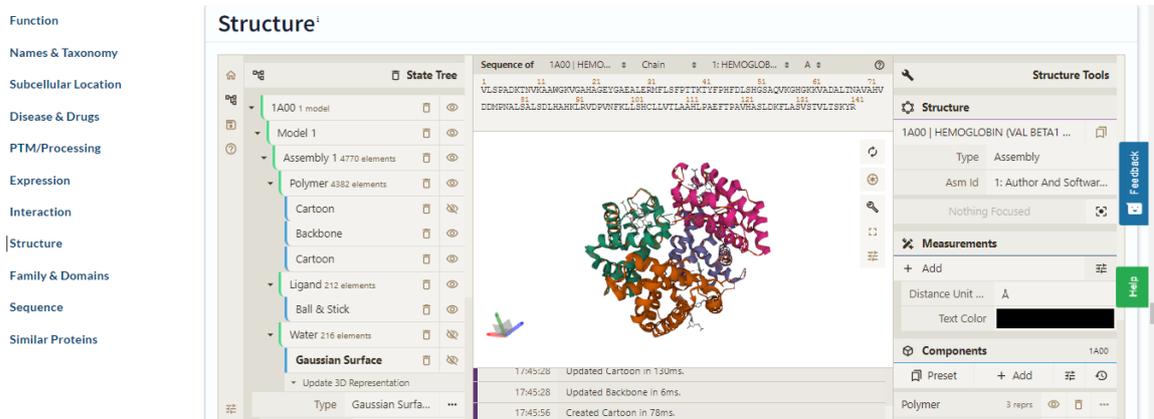
- 4) **Ubicación subcelular:** Esta sección proporciona información sobre la ubicación y la topología de la proteína madura en la célula.
- 5) **Enfermedad y medicamentos:** Esta sección proporciona información sobre la(s) enfermedad(es) y el(los) fenotipo(s) asociado(s) con una proteína. Se puede apreciar que la hemoglobina presenta una asociación a la anemia por cuerpos de Heinz y un gran número de variantes, algunas relacionadas a enfermedades.
- 6) **Modificaciones post-traduccionales y procesamientos:** Esta sección incluye información sobre las modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones, formación de puentes disulfuro, clivajes, etc. La hemoglobina es glicosilada en 6 residuos de lisina y no presenta puentes disulfuro.



- 7) **Expresión:** Esta sección proporciona información sobre la expresión de un gen a nivel de mRNA o proteína en células o en tejidos de organismos multicelulares. La expresión de hemoglobina es específica de glóbulos rojos.
- 8) **Interacción:** Esta sección proporciona información sobre la estructura cuaternaria de una proteína y sobre la(s) interacción(es) con otras proteínas o complejos proteicos. Como ya lo hemos estudiado, la hemoglobina es un heterotetrámero.



- 9) **Estructura:** Esta sección proporciona información sobre la estructura terciaria y secundaria de una proteína. Generalmente se presenta la representación tridimensional de la proteína obtenida a través de estudios de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. La estructura es animada y permite rotarla, individualizar cada aminoácido, etc, y al acceder a la herramienta panel de control con forma de llave inglesa se presentan múltiples funcionalidades adicionales.



- 10) **Familia y dominios:** Esta sección proporciona información sobre las similitudes de secuencia con otras proteínas y los dominios presentes en una proteína.
- 11) **Secuencia:** Esta sección muestra por defecto la secuencia canónica de la proteína y, previa solicitud, todas las isoformas descritas en la entrada. También incluye información pertinente a la secuencia, incluida la longitud y el peso molecular.
- 12) **Proteínas similares:** Esta sección proporciona enlaces a proteínas que son similares a la secuencia de la proteína descrita en la entrada en diferentes niveles de similitud (100 %, 90 % y 50 %).

ACTIVIDAD: ELABORACIÓN DE UNA MONOGRAFÍA SOBRE UNA PROTEÍNA VIRAL

Un virus es un agente infeccioso acelular que sólo puede replicarse dentro de las células de otros organismos. Están constituidos por genes contenidos en ácidos nucleicos, ADN o ARN, rodeados de proteínas. Al infectar una célula, estos genes emplean la maquinaria de la célula anfitriona para sintetizar sus ácidos nucleicos y proteínas para sintetizar nuevos virus. Las enfermedades virales son aquellas causadas por la infección con un virus, pueden ser leves, como el resfriado común, o graves, como las fiebres hemorrágicas.

Como método de evaluación de este trabajo práctico se deberán conformar grupos de 5-6 integrantes para elaborar una monografía de 5 páginas como máximo, en la cual se lleve a cabo una investigación sobre alguna proteína viral de un virus que cause enfermedad humana. El reporte deberá contener una introducción sobre la enfermedad (epidemiología, síntomas, etc), sobre el agente viral, y una sección detallada sobre una de las proteínas virales empleando la base de datos UniProtKB. Proponemos algunos ejemplos, pero se podrán elegir otras proteínas si así lo desean:

- Hemaglutinina de influenza P03452

- Neuraminidasa de influenza P03468
- Espiga de SARS-CoV-2 P0DTC2
- Glicoproteína de envoltura 160 de HIV P04578
- Proteína E6 del papilomavirus humano tipo 16 P03126
- Proteína de fusión del virus sincitial respiratorio P03420
- Proteína de matriz VP40 del virus del ébola Q05128
- Proteína de la envoltura del virus del ébola Q05320

REFERENCIAS

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- <https://beta.uniprot.org/>
- <https://www.uniprot.org/>
- <https://pymol.org/2/>
- <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>
- Tepper A y col. Structure, Spectroscopy, and Function of Tyrosinase; Comparison with Hemocyanin and Catechol Oxidase. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry. 2011.
- Jumper J y col. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596: 583–589. 2021.
- Christoffer C y col. LZerD Protein-Protein Docking Webserver Enhanced With de novo Structure Prediction. Front Mol Biosci 8:724947. 2021.
- <https://viralzone.expasy.org/>

TRABAJO PRÁCTICO N° 6

DETERMINACIÓN Y ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS

OBJETIVOS

- Realizar actividades experimentales en las que se demuestre el efecto de diversos agentes en la desnaturalización de proteínas.
- Relacionar los conocimientos sobre la estructura de proteínas con el efecto de los diversos agentes desnaturalizantes.
- Determinar la presencia de proteínas en muestras de composición desconocida.

INTRODUCCIÓN

De todas las moléculas de importancia biológica, las proteínas son las más estudiadas debido a su gran versatilidad y por ser las más abundantes de la materia viva. Muchas proteínas tienen **actividad biológica**, como por ejemplo las enzimas y las inmunoglobulinas, otras actúan como **hormonas** (ej.: insulina) y otras como parte **estructural** de las células (por ejemplo: microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto).

Las propiedades físico-químicas de las proteínas pueden diferir drásticamente, pero todas tienen en común su composición basada en α -aminoácidos unidos por enlaces peptídicos dando lugar a cadenas lineales.

La estructura de las proteínas generalmente se describe con cuatro niveles de organización. El primero de ellos es la **estructura primaria**, que es el número, secuencia e identidad de los aminoácidos en la cadena o cadenas polipeptídicas de una proteína, comenzando del extremo que posee el grupo amino libre, y mantenida por los enlaces peptídicos que conectan cada aminoácido con el siguiente.

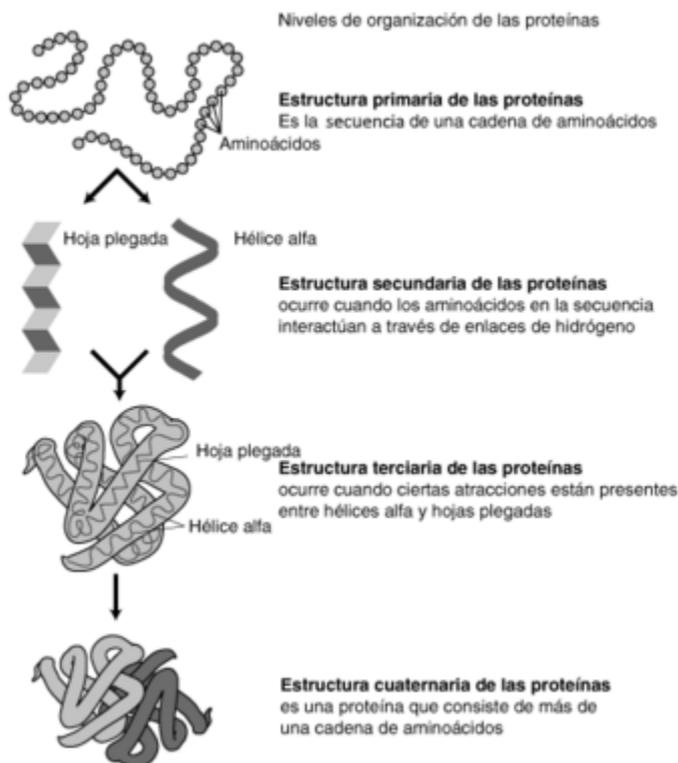
Una molécula de proteína no es un ovillo aleatorio de cadenas polipeptídicas, sino que, en cambio las cadenas están dispuestas en conformaciones únicas y específicas. El término **estructura secundaria** se refiere a la disposición fija del esqueleto polipeptídico, nos indica el ordenamiento regular y local de la cadena. Existen tres tipos principales de estructuras secundarias. En primer lugar, podemos nombrar la **hélice α** que se origina cuando la cadena polipeptídica adquiere una torsión helicoidal en el espacio de sentido dextrógira, formando una hélice o bucle de 3,6 aminoácidos por vuelta. Se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno **intracatenarios** entre el átomo de oxígeno del carbonilo de un aminoácido y el átomo de hidrógeno de la amida cuatro aminoácidos más arriba en la cadena. Un ejemplo de proteína que presenta este tipo de plegamiento es la hemoglobina, en la que se distinguen 8 segmentos hélices α , conectados por regiones con disposición al azar. Otro tipo común de estructura secundaria es la llamada **lámina β** . Ésta consiste en un plegamiento más extendido que el anterior, en el cual la cadena de aminoácidos se dispone en forma de zig-zag, y generalmente dos o más cadenas se alinean. A diferencia de la anterior, los puentes de hidrógeno, que son las fuerzas que estabilizan esta estructura, se establecen entre átomos de distintas cadenas, es decir, son **intercadenarios**. La hoja plegada β es particularmente importante en las proteínas estructurales, como la fibroína de seda. Por último, hay regiones de las proteínas que conectan zonas con plegamientos ordenados, que se disponen de la forma más estable termodinámicamente, pero que no adquieren ninguno de los plegamientos

anteriores, esta estructura se llama **disposición al azar**.

La **estructura terciaria** se refiere a la **forma tridimensional única** de la proteína como un todo, que resulta del plegamiento y la flexión de la columna vertebral de la proteína. La estructura terciaria está íntimamente ligada al correcto funcionamiento bioquímico de la proteína. Las principales fuerzas moleculares que mantienen el ordenamiento de esta estructura se dan entre los grupos laterales de los aminoácidos, y son las siguientes:

- **Interacción electrostática:** pueden ser de dos tipos, atractivas o repulsivas. Se dan entre los aminoácidos con carga, aquellos con carga positiva son los aminoácidos básicos (lisina, histidina y arginina) y los que presentan carga negativa son los ácidos (ácido glutámico y aspártico).
- **Puente de hidrógeno:** se forman entre un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno y un átomo de hidrógeno unido a otro átomo de oxígeno o nitrógeno, como los que se encuentran en las cadenas laterales de aminoácidos polares.
- **Puentes disulfuro:** es la única interacción de tipo covalente, se genera por la oxidación de los átomos de azufre de dos cisteínas, los cuales forman un nuevo enlace que las conecta.
- **Fuerzas de Van der Waals:** también llamadas fuerzas de dispersión, surgen cuando un átomo normalmente no polar se vuelve momentáneamente polar debido a una distribución desigual de electrones, lo que genera un dipolo instantáneo que induce un cambio de electrones en un átomo no polar vecino.
- **Efecto hidrofóbico:** estas interacciones surgen porque las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con otras moléculas de agua (o grupos en proteínas capaces de formar enlaces de hidrógeno). Debido a que los grupos no polares no pueden formar enlaces de hidrógeno, la proteína se pliega de tal manera que estos grupos quedan enterrados en la parte interior de la estructura de la proteína, minimizando su contacto con el agua.

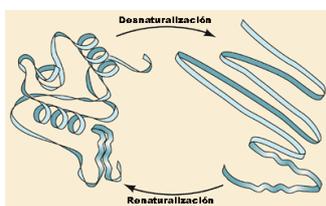
Cuando una proteína contiene más de una cadena polipeptídica, cada cadena se denomina subunidad. La disposición de múltiples subunidades representa un cuarto nivel de estructura, la **estructura cuaternaria** de una proteína. La **hemoglobina**, con cuatro cadenas polipeptídicas o subunidades, es el ejemplo citado con más frecuencia de una proteína que tiene una estructura cuaternaria. La estructura cuaternaria de una proteína es producida y estabilizada por los mismos tipos de interacciones que producen y mantienen la estructura terciaria.



DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Para que las proteínas cumplan su función biológica y mantengan sus propiedades físico-químicas, tienen que adoptar una estructura espacial determinada, denominada *nativa*. La pérdida de esta estructura tridimensional conlleva a la pérdida de su actividad biológica, proceso denominado *desnaturalización*.

Las estructuras altamente organizadas de las proteínas son verdaderas obras maestras de la arquitectura química. Pero las estructuras altamente organizadas tienden a tener cierta delicadeza, y esto es cierto en el caso de las proteínas. La desnaturalización implica un cambio en la estructura tridimensional de una proteína que la vuelve incapaz de realizar su función asignada. Una amplia variedad de **reactivos y condiciones**, como el calor, los solventes orgánicos, los medios con valores extremos de pH, los agentes caotrópicos y los iones de metales pesados, pueden causar la desnaturalización de las proteínas. Generalmente, la desnaturalización de las proteínas deja expuestos los residuos apolares de las mismas, por lo que la macromolécula pierde solubilidad y le resulta más favorable asociarse con otras, originando la **coagulación** de las mismas. La coagulación, en el contexto de la desnaturalización de las proteínas, se refiere al proceso mediante el cual las proteínas desnaturalizadas tienden a asociarse entre sí o con otras moléculas, formando agregados o precipitados.



SOLUBILIDAD DE LAS PROTEÍNAS

La mayoría de las proteínas son solubles en **agua o en soluciones acuosas**. La solubilidad de las mismas depende de varios factores pudiendo variar con el pH, la temperatura y la presencia de sales inorgánicas o solventes no polares en el medio. El comportamiento frente a estos factores es distinto para las diferentes proteínas. Esto último puede ser utilizado como fundamento cuando se quiere separar una proteína de una mezcla.

- **Efecto del pH:** el pH es un factor importante para la solubilidad de una dada proteína ya que de él depende la magnitud de la carga neta de la misma. En el punto isoeléctrico, la solubilidad de la proteína es mínima.
- **Efecto de sales:** A bajas concentraciones las sales favorecen la solubilidad de muchas proteínas ya que los iones inorgánicos interactúan con los grupos ionizados de las moléculas proteínicas. A altas concentraciones ocurre el efecto opuesto, los iones secuestran la capa de solvatación de las proteínas, induciendo su precipitación.
- **Efecto de solventes poco polares:** el agregado de solventes poco polares (etanol, acetona, etc.) a soluciones de proteínas disminuye su solubilidad y produce la precipitación cuando la concentración del solvente alcanza ciertos valores según la proteína. La precipitación se acompaña de alteración de la proteína (desnaturalización) a menos que se trabaje a temperaturas muy bajas.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°1

En esta actividad práctica se pondrá en evidencia el efecto de distintos agentes sobre el plegamiento de las proteínas, tomando como ejemplo la ovoalbúmina de huevo de gallina. Esta es la principal proteína de la clara de los huevos. La ovoalbúmina de gallina está formada por una cadena de 385 aminoácidos, y posee una masa molecular relativa de 45 kDa. Se trata de una glucoproteína con cuatro posiciones de glicosilación.

Preparación de una dispersión coloidal de ovoalbúmina

Materiales (1 por comisión):

1 huevo, NaCl, agua destilada, probeta de 250 ml, 2 beakers, espátula, balanza, papel de filtro, embudo, baño termostático (prender con antelación).

Procedimiento:

- Preparar una solución con 1 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.
- Agregar la clara de 1 huevo y agitar por 5 minutos.
- Filtrar la dispersión con papel de filtro y embudo.
- Dispensar la preparación en 3 frascos, uno para cada mesada.
- Mantener refrigerada al finalizar la actividad.

Evaluación de la reacción de desnaturalización

Material para cada grupo:

- 1 gradilla
- 5 tubos de ensayo
- 1 frasco de dispersión coloidal de ovoalbúmina
- 1 frasco con 50 ml de HCl 1M
- 1 frasco con 50 ml de etanol
- 1 frasco con 50 ml de una solución de sulfato de amonio al 50 % P/V
- 4 pipetas pasteur (rotularlas y dejarlas en un tubo pegado al frasco correspondiente).

Procedimiento:

- 1) Cada grupo preparará **5 tubos de ensayo**.
- 2) Colocar en cada tubo **2 ml** de la **dispersión coloidal de ovoalbúmina**. Pipetear con pipeta pasteur.
- 3) Se expondrá a la dispersión coloidal a diferentes condiciones de reacción, por lo que a cada tubo se le deberá agregar:
 - **Tubo 1 (control):** No se efectuará **ningún** tratamiento.
 - **Tubo 2:** Se agregarán **15 gotas de HCl 1 M** con pipeta pasteur.
 - **Tubo 3:** Se agregarán **5 gotas de etanol** con pipeta pasteur.
 - **Tubo 4:** Se agregarán **25 gotas de sulfato de amonio** con pipeta pasteur.
 - **Tubo 5:** Se lo calentará en el baño termostático a **80-90 °C por 5 minutos**.
- 4) Luego del agregado de los diferentes reactivos a los tubos 2, 3 y 4, **mezclar** el contenido y **dejar reposar 5 minutos**.
- 5) Anotar el resultado obtenido.

Resultados:

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica en diversos escenarios, como por ejemplo cuando se realiza la purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, como así también para el diagnóstico de múltiples enfermedades, entre muchos otros propósitos.

Existen **diferentes métodos** para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: (a) **la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz UV**, (b) **para la formación de derivados químicos**, o (c) **la capacidad que tienen las proteínas**

de unir ciertos colorantes. La cuantificación de proteínas presentes en los medios biológicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo) es utilizada como prueba complementaria en el diagnóstico de diversas patologías. Esta medición puede referirse tanto al total de proteínas, como en el caso de la proteinemia, proteinuria y proteinorraquia, o centrarse en proteínas específicas, como la albúmina, Bence-Jones, α -antitripsina y ceruloplasmina.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°2: Determinación de proteínas totales

Fundamento de la reacción

El fundamento del método que vamos a emplear para la **determinación de proteínas totales** consiste en que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino. Esta reacción genera un complejo de color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. Para llevar a cabo la determinación se hace reaccionar una muestra que contiene proteínas con una solución que contiene el complejo EDTA/cobre 13 mM en hidróxido de sodio 875 mM y alquil aril poliéter. Como en esta reacción el cobre se une específicamente a las proteínas, es un buen método de caracterización y cuantificación.

Dado que aún los materiales biológicos más sencillos poseen una composición química compleja, siempre se debe tener en cuenta la posibilidad de interferencias (positivas o negativas). También se debe tener en cuenta que no siempre son las mismas sustancias las que interfieren en los distintos métodos. En el caso de extractos vegetales es común encontrar sustancias como los fenoles que por lo general producen interferencias en muchos de los métodos de caracterización de proteínas.

Protocolo de la reacción

El objetivo de la actividad práctica será la identificación de la muestra que contiene proteínas. Para ello, el/la docente le entregará a cada grupo tubos que contendrán tres soluciones distintas de identidad desconocida. A cada tubo se le agregará el reactivo para la determinación de proteínas totales del **kit Proti2 de laboratorios Wiener** y de esta manera se podrá identificar cuál es la muestra de proteínas.

Materiales para cada grupo:

- 3 tubos de ensayo
- Reactivo para la determinación de proteínas totales del kit Proti2 (Wiener lab)
- Gradilla
- Micropipeta p1000
- Tips azules de 1000 ul
- Descartador de tips
- 3 pipetas serológicas
- Pera de goma

Procedimiento:

1. Rotular 3 tubos de ensayo.
2. Trasvasar a cada tubo **1 ml** de cada **solución incógnita**.

3. Agregar 0,5 ml del reactivo para la determinación de proteínas totales del kit Proti2.
4. **Mezclar.**
5. **Incubar 15 minutos** y observar la coloración final.
6. En base a los resultados obtenidos, identificar cuál de los tres tubos contiene una solución de proteínas.

Resultados:

CUESTIONARIO

1. Discuta la importancia de la presencia de un medio ácido en el estómago para el proceso de la digestión.
2. ¿Por qué la leche se corta cuando pasa demasiado tiempo después de abierta?
3. Una reacción de PCR es utilizada para la amplificación de secuencias específicas de ADN. Se emplea en múltiples aplicaciones diagnósticas, tales como la detección del SARS-CoV2 causante de Covid-19. Esta reacción emplea una enzima proteica que es calentada repetidamente a más de 90°C. ¿Cómo es posible que mantenga su actividad?
4. La estructura terciaria de una proteína está formada por la interacción de las cadenas laterales de los aminoácidos. Para cada par identifique el tipo más fuerte de interacción que se puede generar.
 - a. Ácido aspártico – lisina.
 - b. Serina – lisina.
 - c. Fenilalanina – valina.
 - d. Cisteína – cisteína.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco, A y Blanco G. Química Biológica. Editorial El Ateneo. 10° Edición, 2016.
2. <https://chem.libretexts.org/>

TRABAJO PRÁCTICO N° 7

APLICACIONES DE ESTRUCTURAS LIPIDÍCAS EN MEDICINA

OBJETIVOS

- Repasar conceptos teóricos sobre estructura y propiedades de lípidos.
- Abordar ejemplos de aplicaciones de compuestos lipídicos en la vida cotidiana, particularmente aplicaciones relacionadas con la salud.
- Resolver cuestionarios relacionados a dichas aplicaciones.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son sustancias de distinta naturaleza, composición y estructura química, el denominador común de este grupo de compuestos es que exhiben una baja solubilidad en solventes polares. Esta característica permite que los lípidos cumplan diversas funciones a nivel biológico, tales como la de acumular energía (tejido adiposo), protección mecánica de órganos y tejidos, separación física de compartimentos celulares (membranas biológicas), entre otras.

Además, gracias a sus propiedades, los lípidos tienen un sinnúmero de aplicaciones, desde su utilidad culinaria, de limpieza (jabones, detergentes), protección de superficies (ceras), hasta su aplicación en cosmética y formulación de medicamentos. En este trabajo práctico virtual abordaremos diferentes aspectos relacionados a la utilización de estructuras lipídicas en el campo de la medicina, haciendo particular énfasis en sus aplicaciones en la higiene de manos para los profesionales de la salud, y en su utilización como sistemas de transporte de drogas.

HIGIENE DE MANOS EN LA ATENCIÓN SANITARIA

Las infecciones intrahospitalarias representan un serio problema en la actualidad, siendo una causa no despreciable de mortalidad y de aumento de la morbilidad en pacientes hospitalizados. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor entre el 5 % y el 10 % de los pacientes hospitalizados contraen infecciones que no padecían al momento de su ingreso. En cuanto a la mortalidad, se estima que en Estados Unidos mueren alrededor de 80.000 personas por año por infecciones intrahospitalarias y en Inglaterra se producen 100.000 casos de infecciones nosocomiales, con una muerte de aproximadamente 5.000 personas. Este fenómeno de infecciones intrahospitalarias se agrava cuando se considera el incremento de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos, incluso hacia aquellos denominados de reserva.

Aunque pueda considerarse trivial, la higiene de manos es una de las medidas más efectivas e importantes para el control y la prevención de infecciones. Un claro ejemplo de esto es la importancia que cobró esta medida de higiene durante los últimos dos años de pandemia de Covid-19. Tal es la importancia de esta medida de seguridad que la OMS ha

emitido directrices y genera campañas de fomento para mejorar la higiene de manos en la atención sanitaria.

Ejemplificamos a continuación algunas de las directivas emitidas por la organización, particularmente aquellas orientadas a los procedimientos que deben llevarse a cabo para una correcta limpieza de manos y a los momentos críticos en los cuales es necesario efectuarla.

Técnica de lavado de las manos con agua y jabón

0 Mójese las manos con agua

1 Deposite en la palma de la mano una cantidad de jabón suficiente para cubrir todas las superficies de las manos

2 Frótese las palmas de las manos entre sí

3 Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos, y viceversa

4 Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados

5 Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos

6 Frótese con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo atrapándolo con la palma de la mano derecha, y viceversa

7 Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación, y viceversa

8 Enjuáguese las manos con agua

9 Séqueselas con una toalla de un solo uso

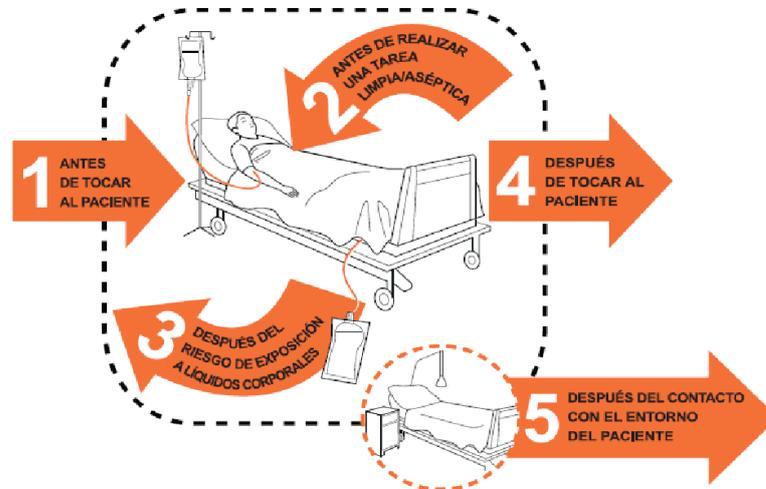
10 Sírvese de la toalla para cerrar el grifo

...y sus manos son seguras.

40 a 60 segundos

Modificado de conformidad con EN1500

Sus 5 Momentos para la Higiene de las Manos



1	ANTES DE TOCAR AL PACIENTE	¿CUÁNDO?	Lávese las manos antes de tocar al paciente cuando se acerque a él.
		¿POR QUÉ?	Para proteger al paciente de los gérmenes dañinos que tiene usted en las manos.
2	ANTES DE REALIZAR UNA TAREA LIMPIA/ASÉPTICA	¿CUÁNDO?	Lávese las manos inmediatamente antes de realizar una tarea limpia/aséptica.
		¿POR QUÉ?	Para proteger al paciente de los gérmenes dañinos que podrían entrar en su cuerpo, incluidos los gérmenes del propio paciente.
3	DESPUÉS DEL RIESGO DE EXPOSICIÓN A LÍQUIDOS CORPORALES	¿CUÁNDO?	Lávese las manos inmediatamente después de un riesgo de exposición a líquidos corporales (y tras quitarse los guantes).
		¿POR QUÉ?	Para protegerse y proteger el entorno de atención de salud de los gérmenes dañinos del paciente.
4	DESPUÉS DE TOCAR AL PACIENTE	¿CUÁNDO?	Lávese las manos después de tocar a un paciente y la zona que lo rodea, cuando deje la cabecera del paciente.
		¿POR QUÉ?	Para protegerse y proteger el entorno de atención de salud de los gérmenes dañinos del paciente.
5	DESPUÉS DEL CONTACTO CON EL ENTORNO DEL PACIENTE	¿CUÁNDO?	Lávese las manos después de tocar cualquier objeto o mueble del entorno inmediato del paciente, cuando lo deje (incluso aunque no haya tocado al paciente).
		¿POR QUÉ?	Para protegerse y proteger el entorno de atención de salud de los gérmenes dañinos del paciente.

En este contexto, los lípidos cobran una gran relevancia dada sus estructuras y las propiedades que les permiten formar parte importante de las soluciones jabonosas utilizadas para el lavado de manos. Por todo esto, abordaremos el proceso de saponificación, para poder comprender cómo se elaboran los jabones y el efecto de los lípidos saponificados en la limpieza de manos.

ACTIVIDAD N°1

Teniendo en cuenta lo aprendido respecto al proceso de saponificación y el efecto de los detergentes, analice la información provista en el siguiente link y responda:

<https://www.bbc.com/mundo/noticias-52008704>

¿Qué tipo de moléculas forman la bicapa que le sirve de envoltura al virus?

¿Actúan realmente las moléculas de jabón en forma individual como se esquematiza en la figura de la nota?

¿Qué estructura formada por el jabón es importante para disolver los componentes virales no se está mencionando?

¿Qué tipo de jabón se utiliza en el lavado prequirúrgico de manos? ¿Qué función/es cumple/n el/os componentes adicionales?

También se provee una página con material didáctico para estudiar la estructura y propiedades de los lípidos

<http://biomodel.uah.es/model2/lip/inicio.htm>

Respuestas:

COMPUESTOS LIPÍDICOS COMO COMPONENTES DE FORMULACIONES COSMÉTICAS

Los lípidos tienen un papel fundamental en la formulación de medicamentos y productos de cosmética. Las cremas, pomadas y ungüentos tienen dentro de sus componentes lípidos que le dan no solo su apariencia y textura característica, sino que también permiten vehicular (transporte) principios activos, ya sea con fines terapéuticos (antibióticos, antivirales) o cosméticos (vitaminas, protectores UV).

Para comprender un poco más en profundidad el rol de los componentes lipídicos en estas formulaciones, veremos brevemente cómo están compuestas las mismas:

Ungüentos: Se elaboran con excipientes grasos altamente hidrofóbicos como parafina y vaselina (los excipientes son sustancia que se mezcla con los medicamentos para darles consistencia, forma, sabor u otras cualidades que faciliten su uso). Forman una capa impermeable entre la piel y el exterior que retiene agua interna y sudor (capacidad oclusiva), esta retención es responsable de suavizar e hidratar la piel.

Pomadas: Se elaboran con compuestos grasos, pero en este caso poseen un carácter hidrofóbico menor (son levemente más hidrofílicos, ej: polietilenglicol), de menor capacidad oclusiva que los ungüentos, tienen cierta capacidad de absorber agua y exudados.

Cremas: Consisten en mezclas de agua y sustancias lipídicas en forma de emulsión estable. A su vez, dependiendo el porcentaje de cada uno de estos componentes se pueden clasificar en:

Cremas lipofílicas: son emulsiones de agua dispersa en grasa (emulsiones w/o por el inglés *water in oil*). Poseen un efecto oclusivo moderado, no se quitan con agua y ejercen un efecto hidratante. Se pueden utilizar para formular fármacos liposolubles.

Crema hidrofílica: emulsiones de aceite en agua (o/w, del inglés *oil in water*). Tienen poco efecto oclusivo, por su bajo contenido de grasa, esta se absorbe rápidamente. Son ideales para limpieza de la piel y se lavan fácilmente con agua.

ACTIVIDAD N°2

Buscar algún producto cosmético o medicamento de aplicación local que pueda haber en casa e intente responder:

¿Es posible identificar el tipo de formulación que posee (crema, ungüento, pomada, etc.)?

¿Puede identificar algún componente lipídico en su composición?

¿Cuál es el uso principal del producto?

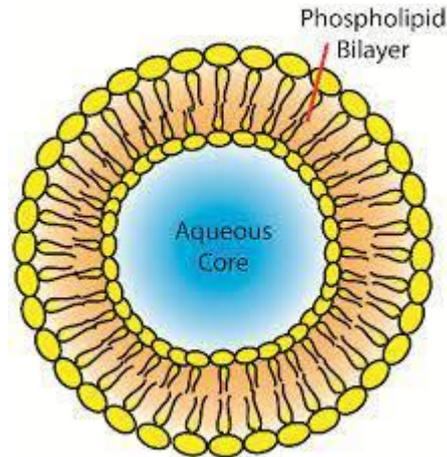
¿Cuál cree que es la función del/los componente/s lipídico/s en la formulación?

Respuestas:

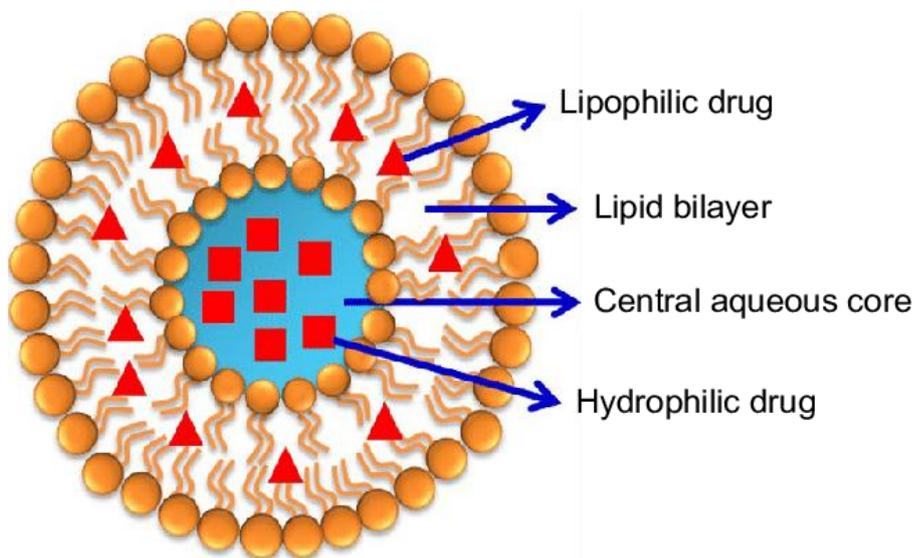
SISTEMAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS BASADOS EN ESTRUCTURAS LIPÍDICAS

Dependiendo de su estructura, las moléculas anfipáticas pueden formar micelas y bicapas (para mayor detalle, visitar la siguiente página <http://biomodel.uah.es/model2/lip/inicio.htm>). Esta propiedad no sólo es útil para la formación de emulsiones y para remover grasas en medios acuosos (efecto de los jabones), sino que también ha permitido el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos, particularmente de aquellos que poseen una muy baja solubilidad en agua.

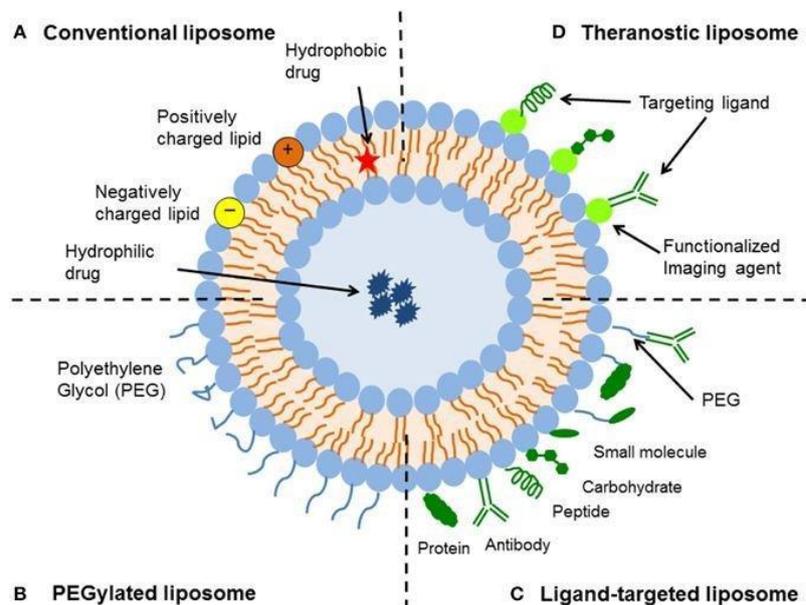
Las moléculas anfifílicas tales como fosfolípidos tienen la capacidad de formar bicapas de manera espontánea cuando se colocan en un medio acuoso. Si a este sistema se le aplica un estímulo emulsificante (ej.: ultrasonido), se forman vesículas estables que pueden variar en tamaño y composición en función del medio acuoso, la intensidad del estímulo y la composición de fosfolípidos utilizados. A estas estructuras se las denomina liposomas.



Los liposomas permiten el almacenamiento y transporte de drogas de dos maneras dependiendo de la polaridad de la misma. En el caso de drogas hidrofílicas, estas pueden transportarse en el interior de la vesícula, esto permite por ejemplo proteger una droga de su degradación hasta que llegue a su sitio de acción. Si por el contrario la droga es lipofílica, esta se ubicará en la bicapa lipídica ya que es el lugar más favorable para su permanencia y transporte.



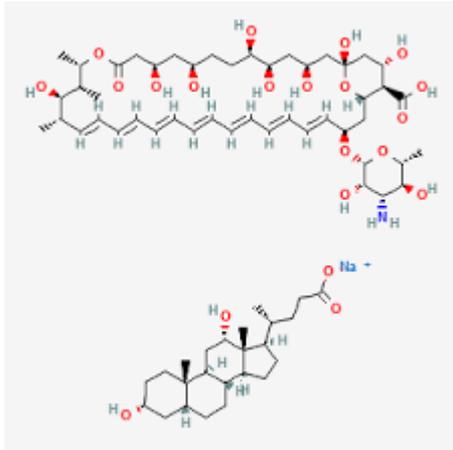
Dado que los fosfolípidos utilizados para producir los liposomas son los mismos o muy similares a los que componen las membranas de nuestras células, la toxicidad de estas partículas es muy baja y son altamente compatibles con el cuerpo humano. Otra ventaja que presentan los liposomas es que se pueden modificar los componentes polares de la porción externa para que estos permitan el direccionamiento de la partícula a un tejido o tipo de célula en particular. A modo de ejemplo, los liposomas se pueden funcionalizar con ligandos que reconozcan un determinado receptor o con anticuerpos que se unan a una determinada molécula en la superficie de las células target (como puede ser el receptor de una célula tumoral).



EJEMPLOS DE FORMULACIONES QUE CONTIENEN LIPOSOMAS

La **anfotericina b** es un antimicótico liposoluble que se utiliza como tratamiento de primera elección para diferentes infecciones fúngicas dado su amplio espectro. Es un fármaco altamente liposoluble que actúa uniéndose a ergosterol (principal esteroide de membranas fúngicas) y desestabiliza las membranas por formación de un poro transmembrana que permite el paso de iones y componentes celulares al exterior, lo que causa desbalance osmótico y muerte celular. Su selectividad radica en que posee una mayor afinidad por ergosterol en comparación con el colesterol (el principal esteroide de las membranas del cuerpo humano).

La presentación más común de anfotericina B es conjugada con deoxicolato. (El ácido desoxicólico, cuya base conjugada es el anión desoxicolato, es un ácido biliar producido a partir de colesterol, que luego de modificaciones resulta en una molécula fuertemente anfipática que favorece la emulsión de las grasas de la dieta. Una de las principales desventajas del deoxicolato de anfotericina es que su biodisponibilidad oral (lo que se absorbe luego de administrar el fármaco por esta vía) es muy baja dada su baja solubilidad en agua. Esta limitación se puede superar mediante aplicación parenteral (ej: intravenosa). Sin embargo, esta forma de aplicación genera numerosos efectos adversos tales como náuseas, vómitos, fiebre, alteraciones en la presión arterial, hipoxia, e incluso daño cardíaco. Estos efectos se deben en parte a la lisis de membranas en el sitio de aplicación, la liberación de citoquinas inflamatorias e iones citoplasmáticos. Otro efecto adverso importante a largo plazo es la nefrotoxicidad.

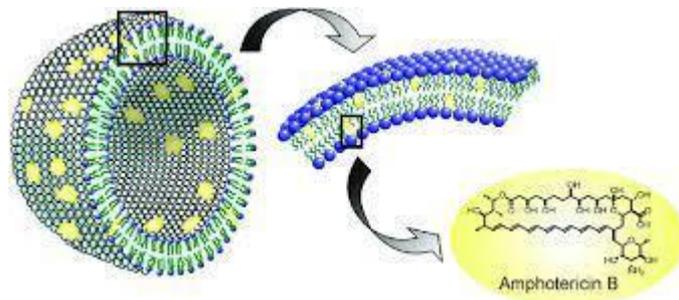


Anfotericina b

Deoxicolato de Sodio

Estructura de Anfotericina B deoxicolato

Existen otras alternativas de formulación de anfotericina B, de las cuales destacaremos la anfotericina B liposomal, que consiste en liposomas unilamelares (una sola bicapa) esféricos de 45-80 nm de diámetro compuestos por fosfatidilcolina, colesterol, diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG) y la propia Anfotericina b (al ser liposoluble, la droga se ubica en la bicapa lipídica).

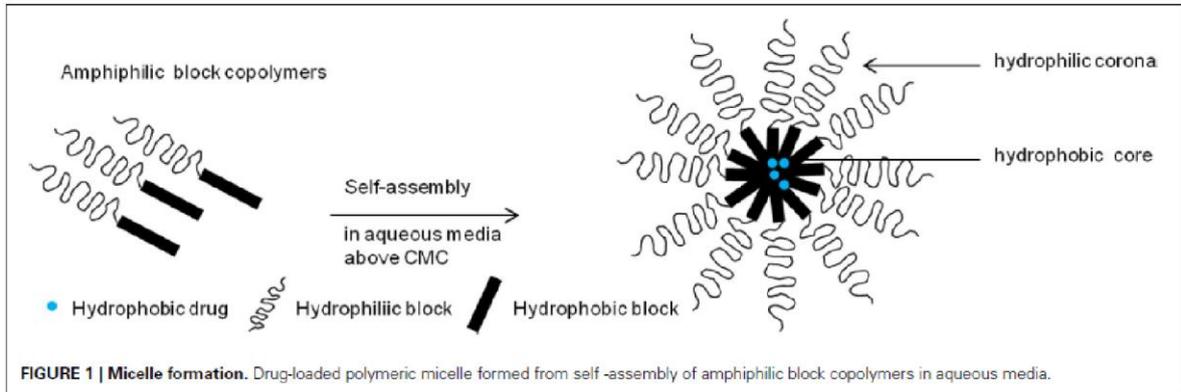


La presentación de anfotericina B liposomal exhibe una menor incidencia de efectos adversos dados por la reacción en el sitio de administración y existen estudios que muestran también la disminución de nefrotoxicidad en comparación con otras formulaciones. Además, mejora otros parámetros como la concentración alcanzada en sangre y el tiempo de vida media (tiempo que permanece la droga en circulación), entre otros.

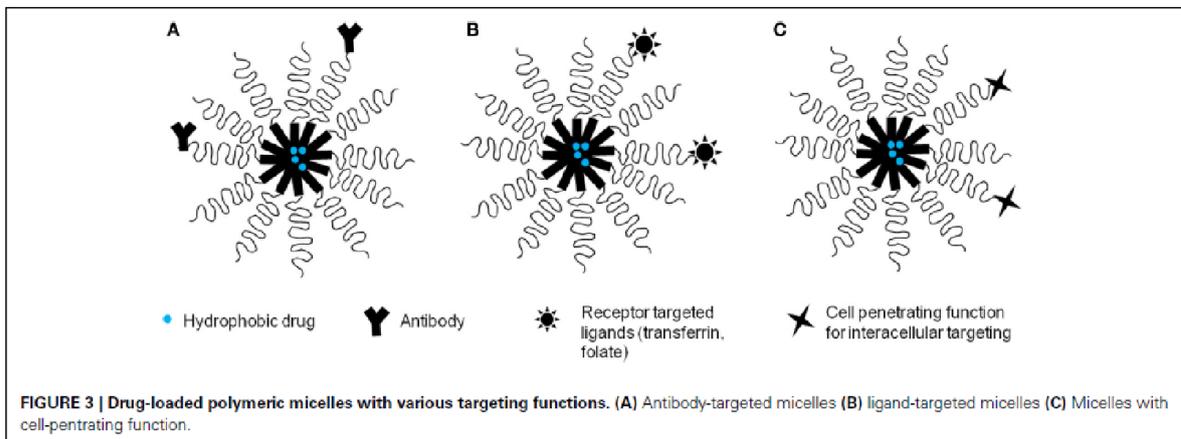
Tabla 4. Nefrotoxicidad de las anfotericinas en estudios clínicos				
Producto	Comparador	Tasa de nefrotoxicidad	Definición de toxicidad	Referencia
AmB desoxicolato	Fluconazol	43 vs 19%	Aumento 1,5 veces la creatinemia basal	(25)
AmB desoxicolato	Caspofungina	24,8 vs 8,4%	Aumento de 2 veces la creatinemia o aumento de 1 mg/dl en pacientes por encima de límite normal	(26)
Fluconazol + AmB desoxicolato	Fluconazol + placebo	23 vs 3%		(29)
AmB liposomal	Micafungina	3,7 vs 2,1%	Aumento de dos veces la creatinemia o al menos un incremento de 88,4 μ mol/L comparado con el valor de base de creatinemia	(27)
AmB liposomal	AmB complejo lipídico	25,9 vs 62,8%	Aumento de 1,5 veces el valor de base de creatinemia	(30)
AmB liposomal	AmB complejo lipídico	14,8 vs 42,3%	Aumento de dos veces el valor de base de creatinemia	(30)
AmB liposomal	AmB complejo lipídico	6,2 vs 26,9%	Aumento de tres veces el valor de base de creatinemia	(30)
AmB desoxicolato	AmB complejo lipídico	32 vs 8%	Aumento de dos veces la creatinemia de base o un incremento de más de 1,5 mg/dL	(31)
AmB liposomal	AmB complejo lipídico	7,1 vs 23,3%	Aumento de 1,5 veces la creatinemia de base	(32)
AmB desoxicolato	AmB liposomal	32 vs 16%	Incremento mayor o igual al 100% de la creatinemia de base	(33)
AmB desoxicolato	AmB liposomal	33,7 vs 18,7%	Aumento de dos veces la creatinemia de base	(28)

Perfil de nefrotoxicidad de Anfotericina b liposomal

Otra de las estructuras utilizadas en el transporte de drogas son las micelas. Estas se forman con compuestos anfipáticos que al superar un valor de concentración (concentración micelar crítica), forman espontáneamente micelas que les permiten orientarse, en el caso de un compuesto en medio acuoso, con sus regiones apolares (hidrofóbicas) en el interior de la micela y con su porción polar (hidrofílica) exponiéndose al medio acuoso.



De manera similar a los liposomas, las micelas también pueden transportar drogas, particularmente aquellas que tienen una baja solubilidad en agua. Asimismo, las cabezas polares de la micela pueden funcionalizarse con ligandos específicos que faciliten su unión a células o tejidos determinados, de manera que se dirija específicamente el transporte de la droga al sitio donde debe actuar. Esto resulta de particular interés en el desarrollo de tratamientos para tumores, ya que permite el transporte de drogas de manera selectiva a la región afectada por el tumor, lo cual puede disminuir los efectos adversos por acción de la droga en otras células/tejidos. A su vez, puede permitir un mismo efecto terapéutico con una dosis menos de droga ya que esta se dirige a y se libera de manera más específica en el sitio de acción requerido.



ACTIVIDAD N°3

Investigue brevemente sobre las vacunas de ARNm recientemente desarrolladas para SARS-CoV2 (vacunas de los laboratorios Pfizer y Moderna). Independientemente de su mecanismo de acción, preste particular atención a la estructura de esta vacuna y responda:

¿A qué tipo de estructura lipídica corresponde el diseño de esta vacuna?

¿Cuál es la ubicación del principio activo (el fragmento de ARNm)?

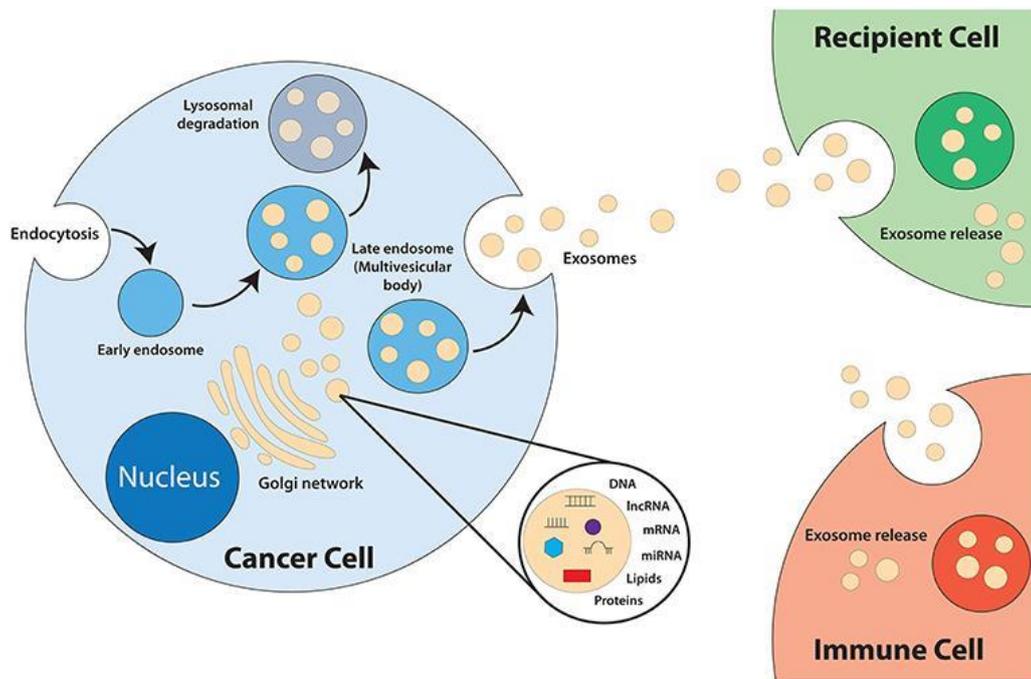
¿Cuál cree que es la función de la cubierta en este caso?

Respuestas:

APLICACIONES DE EXOSOMAS EN MEDICINA

El correcto funcionamiento de los organismos multicelulares depende, entre otros factores, de la comunicación entre las células que los componen. Existen múltiples formas de comunicación célula-célula, como por ejemplo, entre neuronas a través de la liberación de neurotransmisores, la liberación de hormonas que actúan en células distantes (efecto endocrino) o sobre células vecinas (efecto paracrino), el contacto estrecho entre células, etc. Otra forma en la que una célula puede comunicarse con otra es mediante la liberación de vesículas extracelulares, es decir, desprendimientos de la membrana celular que contienen en su interior diferentes componentes celulares y que, al entrar en contacto con la membrana de una célula blanco o *target* puede transmitirle dichos componentes ejerciendo así un efecto sobre ella. Uno de estos tipos de vesículas extracelulares son los exosomas.

Los exosomas tienen un tamaño de entre 40 y 160 nm y se forman mediante la acción conjunta de diferentes sistemas de membranas de la célula (ej.: sistema endosomal, aparato de Golgi) a partir de una estructura denominada cuerpo multivesicular (MVB por sus siglas en inglés). Cuando los MVB se fusionan con la membrana celular, liberan los exosomas al medio extracelular. Los mismos pueden contener diferentes componentes en su interior (material genético, proteínas, lípidos) así como ligandos o moléculas de unión a receptores en la cara externa de la membrana (de manera similar a lo visto para liposomas). Entonces, pueden unirse a otras células y verter en su interior el contenido transportado, modificando en consecuencia el funcionamiento de estas células receptoras. El contenido de los exosomas, y por lo tanto, el efecto que tengan sobre células receptoras dependerá de la célula que les dio origen, ya que pueden provenir de células sanas o incluso de células con alguna alteración, como por ejemplo, células cancerígenas. Como consecuencia de esto, los efectos de los exosomas pueden ser beneficiosos pero también pueden favorecer la generación de procesos patológicos.



Representación esquemática de la generación, contenido y efecto de los exosomas

El estudio de la generación, función y efecto de los exosomas creció exponencialmente en los últimos años, y cada vez son más numerosas las investigaciones sobre posibles aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades. A continuación, detallaremos algunas de las potenciales aplicaciones de los exosomas:

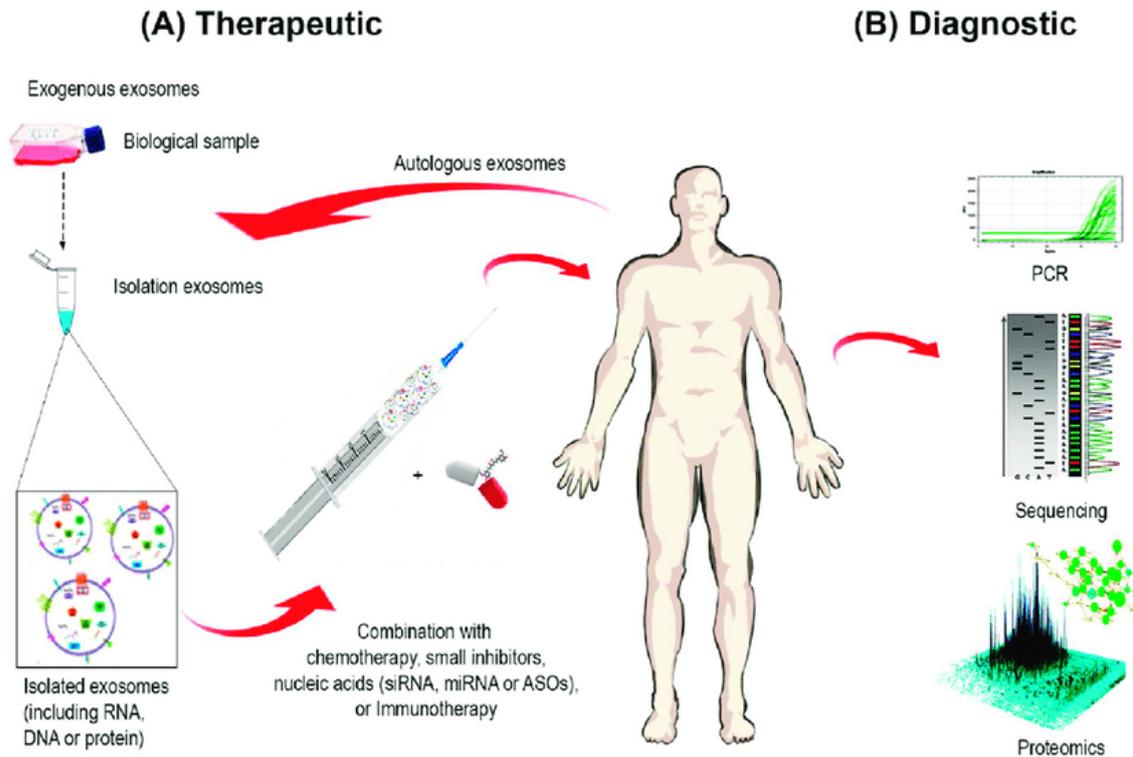
DIAGNÓSTICO DE CÁNCER

El análisis cualitativo y cuantitativo del contenido de exosomas podría ser de utilidad para la detección de enfermedades, como así también el análisis de la progresión de las mismas. De esta forma, se podría aislar exosomas y para analizar su contenido con el fin de detectar marcadores que indiquen alguna patología en particular. A modo de ejemplo, la caracterización del material presente en exosomas podría indicar la presencia de mutaciones propias de células cancerígenas. De la misma manera, se podría detectar la presencia de proteínas mutadas y otras biomoléculas (como ARN) que sirvan como biomarcadores de cáncer. El hecho de que los exosomas son liberados al medio extracelular permitiría su extracción y análisis mediante la aplicación de técnicas mínimamente invasivas (extracción de sangre, biopsias líquidas) que podrían reemplazar otras más tradicionales, como la biopsia de tejidos. Por otro lado, también sería posible aislar y analizar exosomas provenientes de tejidos de muy difícil acceso como el sistema nervioso central.

TRATAMIENTO DE CÁNCER

Una de las funciones del sistema inmune es detectar la presencia de células que presentan mutaciones y que, por lo tanto, pueden dar origen a células cancerosas. No obstante, es frecuente que las células mutadas escapen al control del sistema inmune y puedan proliferar generando tumores y una patología asociada. Por todo esto, las investigaciones sobre el rol del sistema inmune en cáncer y su potencial modulación para el tratamiento han cobrado mucha relevancia en los últimos años. Una estrategia para potenciar la respuesta inmunológica para el tratamiento del cáncer es la utilización de

exosomas aislados de cultivos de células inmunes (por ejemplo macrófagos o linfocitos citotóxicos) ya que estas vesículas contienen mensajeros químicos que potencian el sistema inmunológico facilitando el reconocimiento y la eliminación de células cancerosas. Por otro lado, de manera similar al abordaje de los liposomas, los exosomas también pueden funcionar como transportadores de fármacos, cumpliendo en este caso un doble rol: transportar los mensajeros que habitualmente transporta y además transportar una droga anticancerígena que facilite la eliminación de las células tumorales.



Representación de las aplicaciones de exosomas en tratamiento y diagnóstico.

REGENERACIÓN TISULAR

Las células madre mesenquimales tienen la capacidad potencial de diferenciarse en cualquier otro tipo de célula que forman los tejidos del cuerpo humano. Esta característica ha despertado el interés en su uso para la regeneración de tejidos. No obstante, existe el riesgo de que al implantar células madre en el tejido a regenerar estas no funcionen por no poder integrarse correctamente al tejido y ocurran desprendimientos de células implantadas que puedan generar embolias en pequeños capilares. Existe, incluso, el riesgo de que se produzca un crecimiento anómalo con la posibilidad de que se generen tumores derivados de estas células madres.

Una alternativa que recientemente ha cobrado mucha relevancia, es la utilización de exosomas derivados de células madre mesenquimales, ya que estos contienen muchos de los componentes de estas células y por lo tanto, podrían favorecer la regeneración de tejidos minimizando los riesgos antes mencionados. Otra ventaja del uso de exosomas derivados de células mesenquimales es el hecho de que pueden difundir fácilmente por todos los tejidos e incluso ingresar al sistema nervioso central, por lo que podrían ser utilizadas incluso en procesos de neuroregeneración. Existe además la posibilidad de generar exosomas autólogos, es decir, obtenidos del mismo paciente al que luego le son administrados. Esto se logra cultivando *in vitro* células mesenquimales obtenidas de

muestras de sangre o de tejido adiposo, luego se produce el aislamiento y la purificación de los exosomas a partir del medio de cultivo utilizado para hacer crecer las células (recordar que los exosomas se liberan al medio extracelular, en este caso el medio de cultivo en el que crecen las células) y se formulan de la manera apropiada para posteriormente ser administrados al paciente.

CONCLUSIÓN

El estudio de los exosomas generó un gran impacto en las ciencias de la salud y ha despertado el interés por numerosas aplicaciones potenciales de estas nanopartículas. Actualmente existen numerosos ensayos clínicos evaluando la posibilidad de utilizar exosomas en los campos antes mencionados. No obstante, existen aún algunos obstáculos a superar para poder asegurar la eficacia y la seguridad de estas estrategias. Estos obstáculos tienen que ver con la generación de procesos robustos y estandarizados que aseguren su correcta purificación y almacenamiento, la determinación de una dosis que sea efectiva y que actúe por encima de los exosomas presentes en el paciente y, finalmente, asegurar la efectividad y la seguridad de estos tratamientos y procedimientos mediante ensayos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Directrices de la OMS sobre higiene de las manos en la atención sanitaria (borrador avanzado): resumen. Organización Mundial de la Salud (2005).
- López García B, et al. Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas: ¿es todo lo mismo? Form Act Pediatr Aten Prim (2015).
- Aditi M. Jhaveri and Vladimir P. Torchilin. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. Frontiers in Pharmacology (2014).
- Alasino RV, Leonhard V, Garro AG, Beltramo DM. Sistemas nanoparticulados de vehiculización de fármacos: transportador vs fármaco. Revista SAFYBI (2019).
- Martha C. Botero, Marcela Puentes-Herrera y Jorge A. Cortés. Formas lipídicas de anfotericina. Rev Chilena Infectol (2014).
- María Torelló, Anna Viscasillas Y Alfonso Del Pozo. Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. Offarm (2002).

TRABAJO PRÁCTICO N° 8

CARACTERIZACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

OBJETIVOS

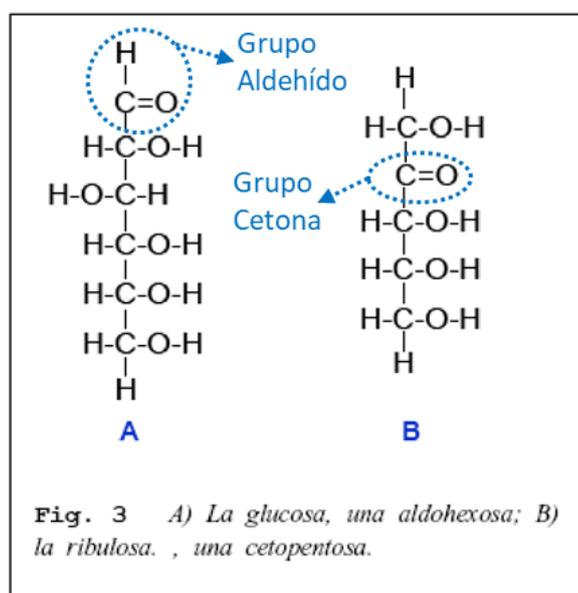
- Repasar la estructura y propiedades de los principales hidratos de carbono.
- Evaluar las características físico-químicas de los hidratos de carbono a través de las reacciones de Tollens y de Fehling.
- Evaluar la reacción de almidón con iodo.

INTRODUCCIÓN

Los **glúcidos o hidratos de carbono** son las sustancias orgánicas más ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están compuestos de C, H y O, y éstos últimos van en la proporción del agua, por eso se los llama hidratos. Constituyen la principal **fente de energía** de los seres vivos.

NATURALEZA QUÍMICA

Químicamente son **polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas o sus derivados**. Un polihidroxialdehído es un compuesto orgánico que tiene una función aldehído en un carbono primario y dos o más funciones alcohol unidas a los otros carbonos que componen su estructura. Las polihidroxicetonas en lugar de una función aldehído tienen una función cetona, normalmente en el carbono 2. Los monosacáridos que tienen una función aldehído se llaman **aldosas** y los que presentan una función cetona, **cetosas**. Se caracterizan por no ser hidrolizables.



CLASIFICACIÓN

Las moléculas más elementales de los hidratos de carbono son los **azúcares simples o monosacáridos**, como la glucosa, fructosa y galactosa. Cuando se combinan dos azúcares simples se forma un **azúcar doble o disacárido**, como por ejemplo la sacarosa, maltosa y lactosa. Entre los **polisacáridos**, constituidos por más de 10 unidades de monosacáridos existen los que resultan **digeribles** para el hombre (almidón y glucógeno) y **no digeribles**, que constituyen lo que llamamos fibra alimentaria o fibra dietética (celulosa, hemicelulosa, pectina, agar-agar, gomas y mucílagos).

MONOSACÁRIDOS

Todos los monosacáridos son **solubles en agua, tienen sabor dulce, poseen color blanquecino y son cristalizables**. Se describirán los principales monosacáridos de importancia biológica:

1) **GLUCOSA:** Es una aldohexosa. Es el azúcar de la uva, también está presente en la miel y en la sangre. La cantidad de azúcar en la sangre es lo que llamamos glucemia. Casi todos los hidratos de carbono contenidos en los alimentos, se absorben como glucosa tras la digestión.

2) **FRUCTOSA:** Es una cetohehexosa. Es el azúcar de las frutas ácidas, forma parte de la sacarosa y también se encuentra en la miel. Es soluble en agua y su poder edulcorante es muy alto. Se utiliza sobre todo en preparados para diabéticos, ya que se absorbe lentamente.

3) **GALACTOSA:** Es una aldohexosa. Es el monosacárido resultante del desdoblamiento de la lactosa o azúcar de la leche. No se encuentra libre en la naturaleza.

4) **MANOSA:** Es una aldohexosa. Se encuentra formando parte de algunos polisacáridos de las plantas (como el manano, el glucomanano, etc.), y en algunas glicoproteínas animales.

DISACÁRIDOS

Resultan de la unión de dos monosacáridos. También poseen **sabor dulce, son solubles en agua y son cristalizables**.

1) **SACAROSA:** Formada por la unión de una molécula de glucosa más una de fructosa. Se obtiene de la caña de azúcar y la remolacha azucarera. También la podemos encontrar en los frutos maduros. Es el azúcar de mesa.

2) **MALTOSA:** Resulta de la unión de dos moléculas de glucosa y se encuentra en granos germinados. Durante la digestión el almidón se hidroliza dando moléculas de maltosa.

3) **LACTOSA:** La lactosa o azúcar de la leche se encuentra únicamente en este líquido en una proporción del 5 %, desdoblándose por hidrólisis en glucosa y galactosa.

POLISACÁRIDOS

Son aquellos compuestos formados por **más de 10 moléculas de monosacáridos**. **No tienen sabor dulce, son insolubles en agua y por hidrólisis se descomponen en monosacáridos**. Se dividen en polisacáridos digeribles: almidón y glucógeno, y polisacáridos no digeribles: fibra dietética, alimentaria o vegetal. La fibra alimentaria es la parte que no se digiere ni se absorbe de muchos alimentos de origen vegetal. Está formada por distintas sustancias, casi todas son polisacáridos.

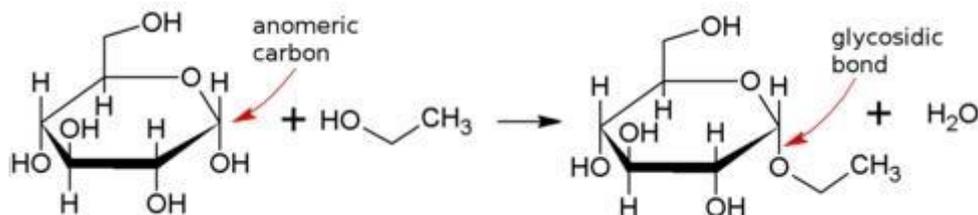
1) **ALMIDÓN:** Es un polímero de glucosa. Compuesto por dos tipos de polímeros, uno lineal llamado amilosa y otro ramificado llamado amilopectina. Constituye la reserva energética de los vegetales. Se encuentra principalmente formando parte de los cereales (trigo, arroz, maíz, etc.), de los tubérculos (patatas, zanahorias) y de las legumbres (lentejas, garbanzos).

2) **GLUCÓGENO:** Es el llamado almidón animal, es el carbohidrato de reserva energética del músculo y del hígado de los mamíferos. Es también un polímero de glucosa.

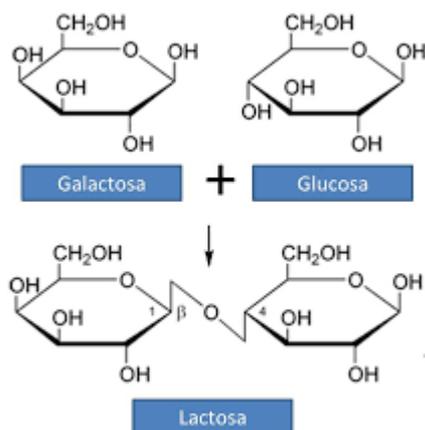
3) **CELULOSA:** Es un polímero de glucosa, con enlaces diferentes a los que se encuentran en el almidón, por lo que resulta indigerible por las enzimas humanas. Insoluble en agua.

ENLACE GLICOSÍDICO

La formación de disacáridos y macromoléculas de glúcidos, implica la formación de nuevos enlaces entre sus unidades. En general estos enlaces involucran la participación del carbono con la función aldehído o cetona, al cual denominaremos **carbono hemiacetálico**. La unión de una molécula con un hidrato de carbono involucrando el carbono hemiacetálico origina un compuesto llamado **glicósido**, cuyo nuevo enlace denominamos **enlace glicosídico**. Si el hidrato de carbono implicado es glucosa, se lo puede denominar glucósido y enlace glucosídico. Como ejemplo podemos citar a la lactosa, formada por una molécula de galactosa unida a otra de glucosa por enlace glucosídico $\beta 1 \rightarrow 4$.



Reacción entre una molécula de α -glucosa con etanol dando origen a un enlace glucosídico.



La unión entre una molécula de galactosa y una de glucosa origina lactosa que presenta un enlace glicosídico.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N° 1: ESTUDIO DE AZÚCARES REDUCTORES

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Los grupos carbonilos (aldehído o cetona) de los carbohidratos pueden actuar como agentes reductores. Los carbohidratos que presentan uno o más grupos aldehído libres o en forma hemiacetálica (grupos aldehídicos potenciales) no bloqueados (por ejemplo, formando parte de un enlace glicosídico) pueden ser oxidados por diferentes reactivos, por lo que se les denomina **azúcares reductores**. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de la **reacción de Fehling**, descrita por el químico alemán Von Fehling. Esta reacción redox implica la **oxidación de la función aldehído a un ácido carboxílico, convirtiendo el glúcido en un ácido aldónico**.

La prueba de Fehling es un método utilizado para detectar la presencia de glúcidos reductores en una muestra. La reacción se basa en una oxidación-reducción entre el sulfato de cobre (II) y el glúcido reductor. La solución de Fehling consta de dos partes: Fehling A y Fehling B. La solución A contiene sulfato de cobre (II) de color azul, mientras que la solución B es una mezcla de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle) y una base fuerte. Cuando se mezclan las soluciones A y B, se forma un complejo de cobre (II).

La reacción redox ocurre cuando esta solución se expone a un glúcido reductor. El glúcido reductor reduce el ion cúprico (Cu^{2+}) presente en el complejo de cobre (II) a óxido de cobre (I) de color rojo. Este cambio de color indica la formación de óxido de cobre (I) y confirma la presencia de un glúcido reductor en la muestra.

La ecuación química simplificada de la reacción sería:



Esto refleja la reducción del ion cúprico a cuproso. En el contexto de la prueba de Fehling, el glúcido reductor actúa como agente reductor al donar electrones a los iones cúpricos.

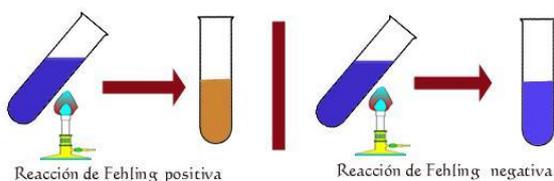
MATERIALES:

- 8 tubos de ensayo
- 7 soluciones de hidratos de carbono al 5 % P/V (glucosa, fructosa, manosa, lactosa, maltosa, sacarosa, almidón)
- baño termostatzado
- solución de Fehling A
- solución de Fehling B
- pipetas
- propipetas
- gradilla

PROCEDIMIENTO:

1. Poner en cada tubo de ensayo **1 ml de la solución** de: glucosa, fructosa, manosa, lactosa, maltosa, sacarosa o almidón.
2. Poner en un tubo **1 ml** de agua como **control**.
3. Añadir **1ml de solución de Fehling** a cada tubo (formada por la mezcla en partes iguales de los reactivos A y B).
4. Calentar los tubos en el baño termostatzado **a 90 °C por 5 minutos**.

La reacción será positiva si la muestra se vuelve de **color rojo** y será **negativa** si queda **azul** o cambia a un tono azul-verdoso.

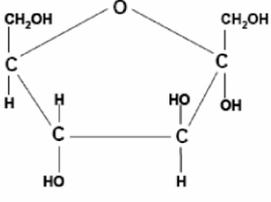
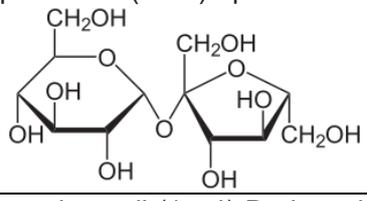
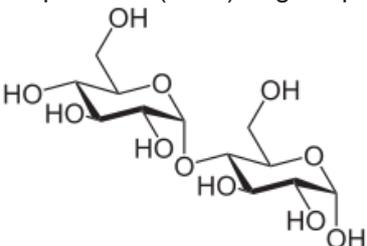
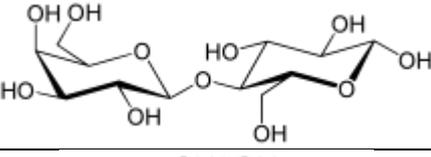
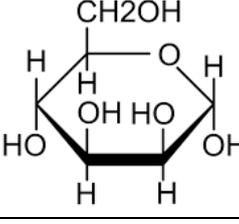


Reactivo de Fehling: Mezclar a partes iguales (el día de su uso) las soluciones A y B:

Solución A de Fehling: Sulfato de cobre 0.28 N (7 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada).

Solución B de Fehling: Tartrato sódico-potásico 1.5 N (34,6 g en 100 ml) en hidróxido potásico 4 N (22 g en 100 ml de agua destilada).

Hidratos de Carbono	Estructura	Resultado del test
Glucosa		

Fructosa		
Sacarosa	<p>α-D-Glucopiranosil - (1\rightarrow2) - β-D-Fructofuranósido</p> 	
Maltosa	<p>α-D-glucopiranosil-(1\rightarrow4)-D-glucopiranososa</p> 	
Lactosa	<p>β-D-galactopiranosil-(1\rightarrow4)-D-glucopiranososa</p> 	
Manosa		
Almidón		

2. HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA

FUNDAMENTO

La sacarosa es un disacárido que no posee carbonos anoméricos libres por lo que carece de poder reductor y la reacción con la solución de Fehling es negativa, como ha quedado demostrado en el experimento 1. Sin embargo, en presencia de **HCl y calor**, la sacarosa **se hidroliza**, es decir, incorpora una molécula de agua y se descompone en los monosacáridos que la forman, glucosa y fructosa, que sí son reductores. La prueba de que se ha verificado la hidrólisis se realiza con la solución de Fehling y, si el resultado es positivo, aparecerá un precipitado rojo. Si el resultado es negativo, la hidrólisis no se ha realizado correctamente y si en el resultado final aparece una coloración verde en el tubo de ensayo se debe a una hidrólisis parcial de la sacarosa.

MATERIALES: 1 tubo de ensayo, solución de sacarosa al 5 % P/V, HCl 1M, NaOH 1M, baño termostatzado, solución de Fehling A, solución de Fehling B, pipetas, propipetas, gradilla.

PROCEDIMIENTO:

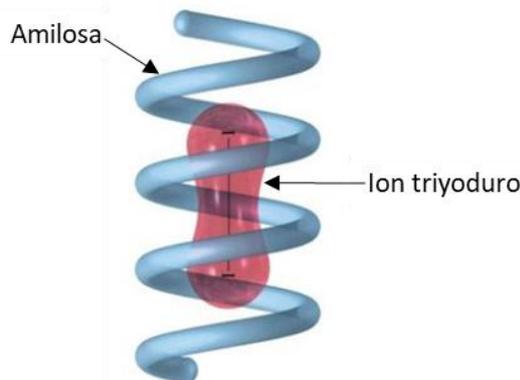
1. Tomar **1 ml** de la solución de sacarosa y añadir **5 gotas de HCl 1 M**.
2. Calentar en baño termostatzado a **90°C por 5 minutos**.
3. Dejar **enfriar**.
4. **Neutralizar** añadiendo **5 gotas de NaOH 1 M**.
5. Realizar la **prueba de Fehling** como se indica en el experimento 1.
6. Observar y anotar los resultados.

RESULTADOS: _____

3. INVESTIGACIÓN DE POLISACÁRIDOS: ALMIDÓN

FUNDAMENTO

El almidón es un polisacárido vegetal formado por dos componentes: **la amilosa y la amilopectina**. La primera se colorea de azul en presencia de yodo debido no a una reacción química sino a la adsorción o **fijación de yodo** en la superficie de la molécula de **amilosa**, esto sería la formación de un complejo de coordinación entre las moléculas amilosa y de yodo (en forma de ion triyoduro), lo cual sólo ocurre en frío. Como reactivo se usa una solución denominada **lugol** que contiene yodo y yoduro potásico.



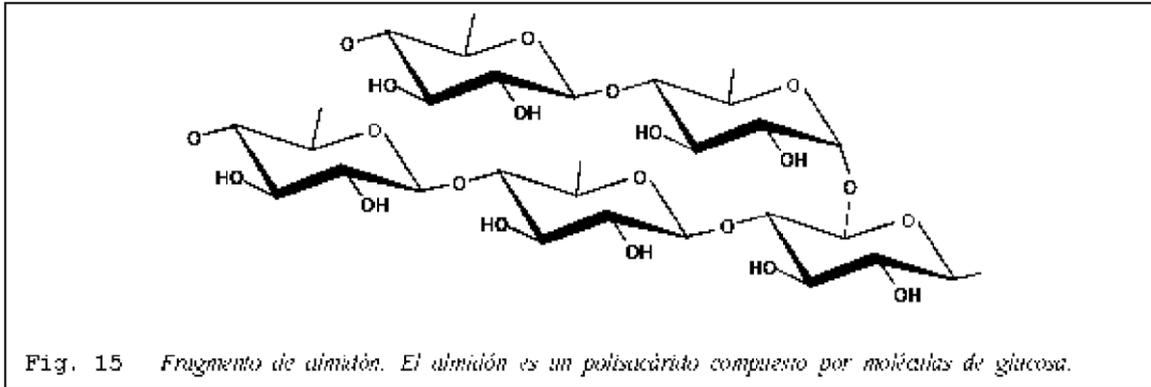
Representación esquemática del complejo formado entre la amilosa y el ion triyoduro

MATERIALES: 2 tubos de ensayo, solución de almidón al 5 % P/V, baño termostatzado, lugol, pipetas, propipetas, gradilla.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar en un tubo de ensayo **2 ml** de la **solución de almidón**.
2. Colocar en otro tubo de ensayo **2 ml de agua**.

3. Añadir **10 gotas de la solución de lugol** a cada tubo.
4. Observar y anotar los resultados.
5. **Calentar el tubo** con almidón suavemente en el baño termostatzado hasta que pierda el color.
6. **Enfriar el tubo** de ensayo al grifo y observar cómo, a los 2-3 minutos, reaparece el color azul.

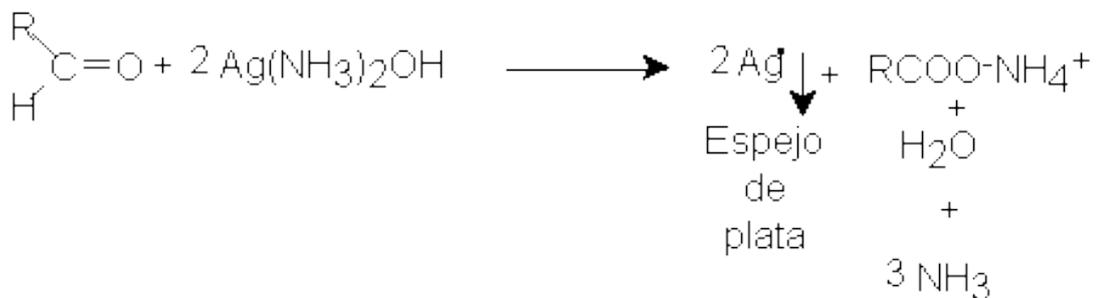


RESULTADOS: _____

4. REACCIÓN DE TOLLENS: FORMACIÓN DEL ESPEJO DE PLATA.

FUNDAMENTO

El carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una **reacción redox** llevada a cabo entre los **carbohidratos** y el **nitrate de plata**. Los carbohidratos con grupos aldehído libre reducen **la plata iónica a plata metálica**.



MATERIALES (1 por comisión): 1 tubo de ensayo, solución de glucosa al 20 % P/V, nitrato de plata 0,05 M, hidróxido de amonio, mechero, pipetas, gradilla.

PROCEDIMIENTO:

1. Verter en un tubo **3 ml** de la solución de **nitrate de plata 0,05 M**.
2. Agregar **3 ml** de la solución de **hidróxido de amonio**, gota a gota hasta la total redisolución del precipitado que se forma (agitando), por formación del complejo plata amoniacal.
3. **Calentar** en mechero a ebullición.
4. Añadir **4 ml** de la solución de **glucosa al 20 %**.
5. **Calentar** de nuevo.
6. Observar la formación del **espejo de plata** en las paredes del tubo.

RESULTADOS:



PREGUNTAS

- 1) ¿Qué tipo de reacción química ocurre durante el test de Fehling?
- 2) ¿Qué monosacárido es importante como fuente de energía en el organismo humano?
- 3) ¿Porque la sacarosa consumida en la dieta por una persona fisiológicamente normal termina generando metabolitos con alto poder reductor? Nómbralos.
- 4) El glucógeno es un polisacárido formado por moléculas de amilopectina muy ramificadas, ¿cómo podría diferenciar entre un recipiente conteniendo glucógeno y otro recipiente conteniendo almidón si ambos no estuviesen correctamente rotulados? Justificar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
2. Química La ciencia central; Brown TL, Lemay HE y Bursten BE; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 1993.
3. Fisiología Médica; Ganong WF; Decimosexta Edición; Editorial El Manual Moderno; 1998.
4. Química Orgánica; Wade LG; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 2004.

TRABAJO PRÁCTICO N° 10

CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS

OBJETIVOS

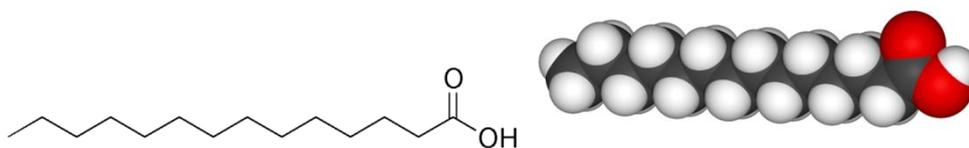
- Repasar la estructura y propiedades de los ácidos grasos y acilgliceroles.
- Evaluar las características químicas de los acilgliceroles a través de la reacción de saponificación.
- Evaluar el carácter anfipático de ciertos lípidos y ponerlo en evidencia a través de la formación de una emulsión.

INTRODUCCIÓN

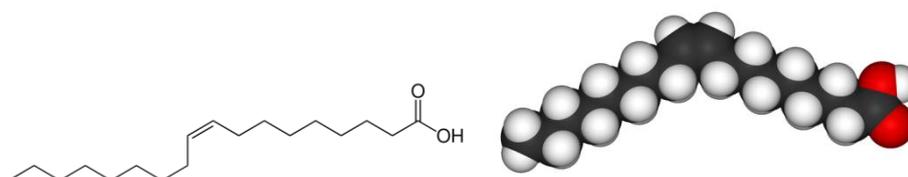
Los lípidos son moléculas altamente heterogéneas de composición y propiedades variables, cuya característica principal es la insolubilidad en solventes polares como el agua. Sus funciones a nivel biológico son variadas, como la de reserva energética, funciones estructurales (como lo son la formación de las membranas biológicas y la protección mecánica de ciertas áreas del cuerpo), la formación de vainas de mielina que permiten la transmisión direccionada de los impulsos nerviosos en el cerebro, la absorción de vitaminas, la síntesis de hormonas, etc.

ÁCIDOS GRASOS

Los **ácidos grasos** son moléculas formadas por una larga cadena alifática, que tienen un grupo carboxilo en un extremo. Los ácidos grasos en los seres vivos son generalmente ácidos carboxílicos no ramificados, saturados (sin doble ligaduras en su cadena carbonada) o insaturados (con doble ligaduras en su cadena carbonada), con un número par de átomos de carbono entre 4 y 26.



Acido graso saturado



Acido graso mono-insaturado

PROPIEDADES FÍSICAS

El **punto de fusión** de los ácidos grasos aumenta proporcionalmente con el largo de la cadena carbonada, y disminuye notablemente con el número de dobles enlaces presentes en la cadena. Los ácidos grasos saturados con 10 o más átomos de carbono son sólidos a temperatura ambiente.

La **solubilidad** de los ácidos grasos en solventes polares como el agua varía de manera inversamente proporcional con el largo de su cadena carbonada.

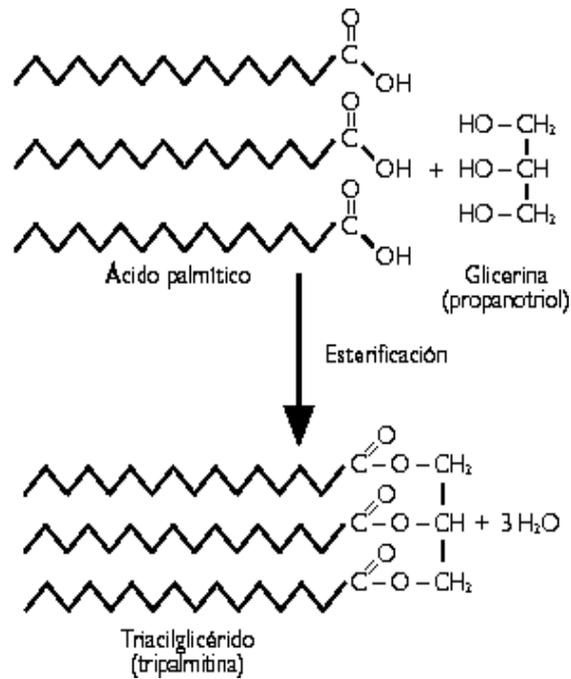
Nombre trivial	Nro de C	Nombre científico	Fórmula	Punto de fusión (°C)
Butírico	4	Butanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-5.9
Caproico	6	Hexanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	-3.4
Caprílico	8	Octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	16.7
Cáprico	10	Decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	31.6
Láurico*	12	Dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44.2
Mirístico*	14	Tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	54.4
Palmítico*	16	Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63.0
Estearico*	18	Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69.4
Araquídico	20	Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76.0
Behénico	22	Docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	79.9
Lignocérico	24	Tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	84.2
Cerótico	26	Hexacosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	87.7

*Ácidos grasos saturados más comunes en alimentos.

PROPIEDADES QUÍMICAS

Los ácidos grasos pueden participar de diferentes reacciones químicas, algunas involucran la cadena hidrocarbonada (oxidación, hidrogenación y halogenación) y otras su grupo carboxilo (carácter ácido, **formación de sales y formación de ésteres**). En esta actividad práctica será de utilidad describir con más detalle dos de éstas:

La **formación de ésteres** es el resultado de la reacción de alcoholes (generalmente glicerol/glicerina) con ácidos grasos. Los ésteres resultantes, en el caso de que el alcohol sea el glicerol son llamados **acilglicéridos**, son la forma en la que más comúnmente se encuentran los ácidos grasos en los seres vivos. Los acilglicéridos más comunes son los triacilglicéridos o triglicéridos.



La **saponificación** es una reacción química entre un lípido saponificable y una base o álcali, en la que se obtiene como productos la sal de dicho ácido. Las sales resultantes de esta reacción en ácidos grasos son llamadas jabones. Estas sales contienen una cabeza altamente polar y soluble en agua, y una cadena carbonada altamente apolar, es decir que tienen la particularidad de ser anfipáticas (solubles tanto en solventes polares como apolares). Al solubilizarse en solventes polares como el agua forman micelas, ubicando las cabezas polares en contacto con el agua y las colas hidrocarbonadas en el interior de la estructura, al resguardo del agua. Estas partículas pueden atrapar en su interior sustancias hidrofóbicas como grasas o aceites, produciendo un efecto emulsionante, o aire, produciendo un efecto espumante.



Reacción de saponificación con KOH

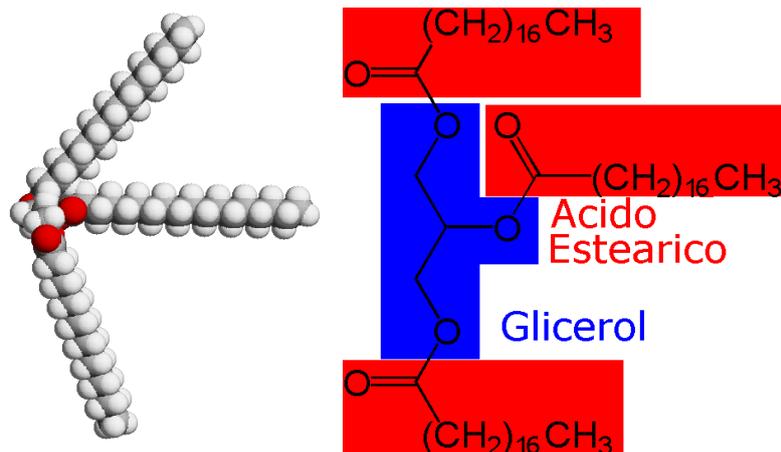


Representación de una micela

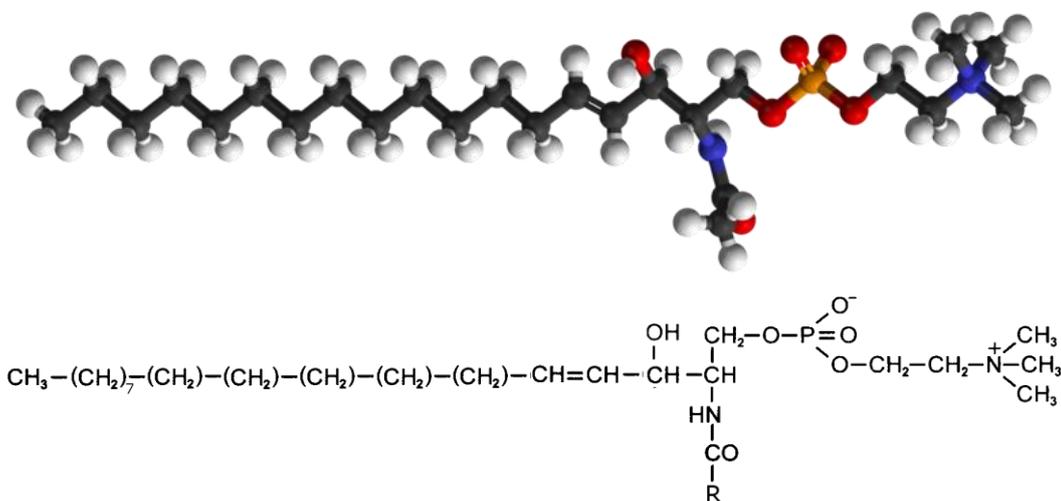
CLASIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos se pueden dividir en dos grandes categorías según su complejidad estructural: **lípidos simples** y **lípidos complejos**.

Los **lípidos simples** son aquellos cuyas moléculas tienen baja complejidad estructural. Entre ellos encontramos a los acilgliceroles y ceras. Un ejemplo de un lípido simple es el triglicérido “triestearina”:



Los **lípidos complejos** son aquellos que en su estructura, además de hidrógeno, carbono y oxígeno, presentan nitrógeno, fósforo, azufre, o bien un glúcido. Forman bicapas lipídicas debido a su comportamiento anfipático. Los lípidos complejos son los fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas. Un ejemplo es la “esfingomielina”:



ACILGLICEROLES

Los acilgliceroles son formados por esterificación de ácidos grasos con una molécula de glicerina. Los monoacilgliceroles contienen un solo ácido graso; los diacilgliceroles, dos moléculas; y los triacilgliceroles, tres moléculas de ácidos grasos. En la naturaleza existen solamente pequeñas cantidades de monoacilgliceroles, y diacilgliceroles, mientras que los triacilgliceroles son la principal forma de reserva energética utilizada por la mayoría de los organismos del reino animal. Los monoacilgliceroles y los diacilgliceroles son compuestos anfipáticos, ya que los grupos hidroxilo no esterificados de las moléculas confieren carácter polar a la misma. Mientras que los triacilgliceroles tienen sus tres posiciones esterificadas, y por ende un carácter mucho más hidrofóbico que los anteriores. La mayoría de las propiedades de los acilgliceroles dependen de las cadenas de ácidos grasos que los componen.

PROPIEDADES FÍSICAS

El **punto de fusión** de los acilglicéridos depende directamente de las cadenas de ácidos grasos que lo componen. Así, si un triglicérido está compuesto por ácidos grasos de cadenas poli-insaturadas, será líquido a temperatura ambiente.

La **solubilidad** de los acilglicéridos varía enormemente entre los mono, di y triacilglicéridos. Los monoglicéridos son altamente anfipáticos, y los diacilglicéridos comparten esta propiedad. Los triacilglicéridos son solubles en solventes apolares, al igual que los ácidos grasos.

PROPIEDADES QUÍMICAS

Los acilglicéridos pueden separarse en sus componentes (ácidos grasos y glicerol) al sufrir una reacción de **hidrólisis**. Esta reacción ocurre fácilmente en medios ácidos o básicos con la presencia de calor. Al realizarse en medio básico, los productos son glicerol libre y sales de ácidos grasos (jabón) con el catión presente en la base utilizada en la reacción.

Los acilglicéridos también pueden sufrir reacciones de hidrogenación y oxidación en las cadenas de ácidos grasos que lo componen.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

1. SAPONIFICACIÓN

En esta actividad práctica se llevará a cabo la reacción de saponificación. Los lípidos empleados provienen del aceite de girasol comestible, el cual consiste en una mezcla de triacilglicéridos y vitaminas liposolubles. Los ácidos grasos presentes son 60 % poliinsaturados, de los cuales, la gran mayoría es ácido linoleico (18:2 omega 6) y una pequeña proporción de ácido linolénico (18:3 omega 3), 25 % ácidos grasos monoinsaturados y 12 % de ácidos grasos saturados. El otro reactivo empleado es una base fuerte de un metal del primer grupo de la tabla periódica, en este caso una solución de NaOH.

MATERIALES: 1 erlenmeyer de vidrio, plancha calefactora con agitación, aceite de girasol, pipetas, propipetas, NaOH 30 % (P/V), probeta, etanol, NaCl, embudo, gasa.

PROCEDIMIENTO:

En un balón de 100 ml se mezclan 20 ml de aceite de girasol, 16 ml de la solución de hidróxido de sodio al 30% (**corrosivo!!!**) y 10 ml de alcohol etílico (**inflamable!!!**). Se coloca sobre un calentador de manta o baño térmico y se utiliza un sistema de reflujo para que el calentamiento sea más rápido y efectivo. Se calienta suave y constantemente, sin elevar la temperatura para evitar ebullición del aceite durante aproximadamente una hora. En caso de evaporación se agrega a la mezcla un poco de alcohol etílico y agua manteniendo constante el volumen. El proceso termina cuando se encuentra una masa semi-sólida en el balón, sin observarse glóbulos y restos significativos de aceite. Se debe dejar enfriar la mezcla en el balón para después agregar 50 ml de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y agitar fuertemente para que el jabón se acumule en la parte superior del balón. La solución se filtra y después se coloca en estufa y se deja secar.

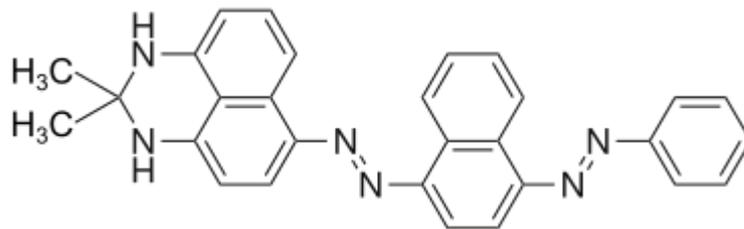
RESULTADOS:

2. MEZCLA DE AGUA - ACEITE (CON COLORANTE LÍPIDICO)

MATERIALES: gradilla, 4 tubos de ensayo largos, pipetas, propipetas, solución de sudan black (0,3 gr cada 100 ml de cloroformo), agua destilada, solución de SDS 10 % (P/V), aceite de girasol, solución de CaCl₂ 1M.

PROCEDIMIENTO:

1. Agregar al fondo de los tubos de ensayo 3 gotas del colorante *sudan black*.
2. Agregar 4 ml de agua destilada a cada tubo.
3. Agregar 1 ml de aceite de girasol al tubo 2 y 3.
4. Tapar los tres tubos y agitar vigorosamente 1 minuto.
5. Reposar y observar.

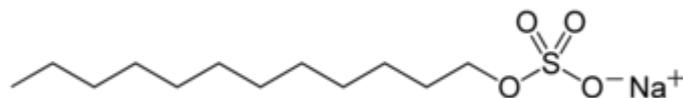


Estructura química del colorante sudan black

RESULTADOS:

3. FORMACIÓN DE UNA EMULSIÓN

Al tubo 3 de la experiencia anterior agregarle 0,5 ml de la solución de SDS. Agitar, reposar y observar. Discutir en clase los resultados obtenidos.



Estructura química del dodecilsulfato de sodio (SDS)

RESULTADOS:

4. EFECTO DEL Ca^{2+} EN LA FORMACIÓN DE LA EMULSIÓN

Lo que denominamos dureza del agua está relacionado con la concentración de compuestos minerales que hay en una determinada cantidad de agua, en particular sales de magnesio y calcio. El agua “dura” tiene una elevada concentración de dichas sales y se dice que este tipo de agua “corta” el jabón, ya que las moléculas de jabón empiezan a asociarse con estos iones, lo cual impide el correcto ensamblaje de las micelas.

Para poner en evidencia este efecto, al tubo 3 de la experiencia anterior agregarle 0,5 ml de la solución de CaCl_2 . Agitar, reposar y observar. Discutir en clase los resultados obtenidos.

PREGUNTAS

- 1- ¿Qué sucedería si en la reacción de saponificación en lugar de NaOH utilizáramos $\text{Ca}(\text{OH})_2$?
- 2- ¿Qué sucedería si utilizáramos una grasa en lugar de un aceite en la reacción de saponificación?
- 3- ¿Qué sucedería si utilizáramos colesterol en lugar de un aceite en la reacción de saponificación?
- 4- ¿En la reacción de emulsión, usted considera que hay formación de bicapas lipídicas?

Bibliografía

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Novena Edición; Editorial El Ateneo; 2010.
2. Química Orgánica; Wade LG; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 2004.
3. Nelson D., Cox M. *Principles of Biochemistry* – 3ª Ed. Worth, 2000.
4. Murray, Granner, Mayes, Rodwell. *Harper, Bioquímica ilustrada* - 16ª Ed. Manual Moderno, 2004.
5. Chang, Raymond *Química* - 7ª Ed. McGraw-Hill / Interamericana de México, 2002.

TRABAJO PRÁCTICO N° 11

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

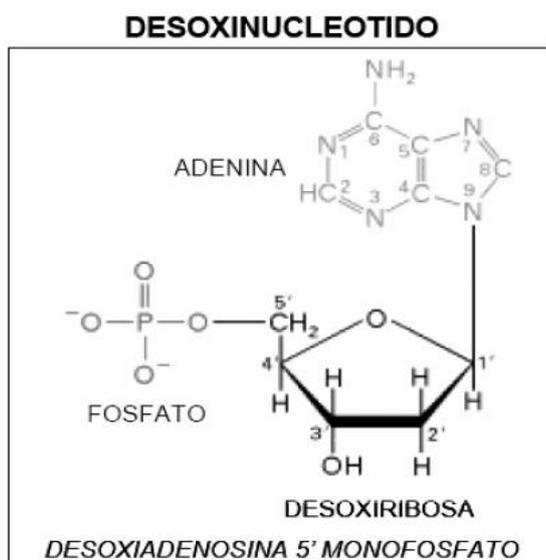
OBJETIVOS

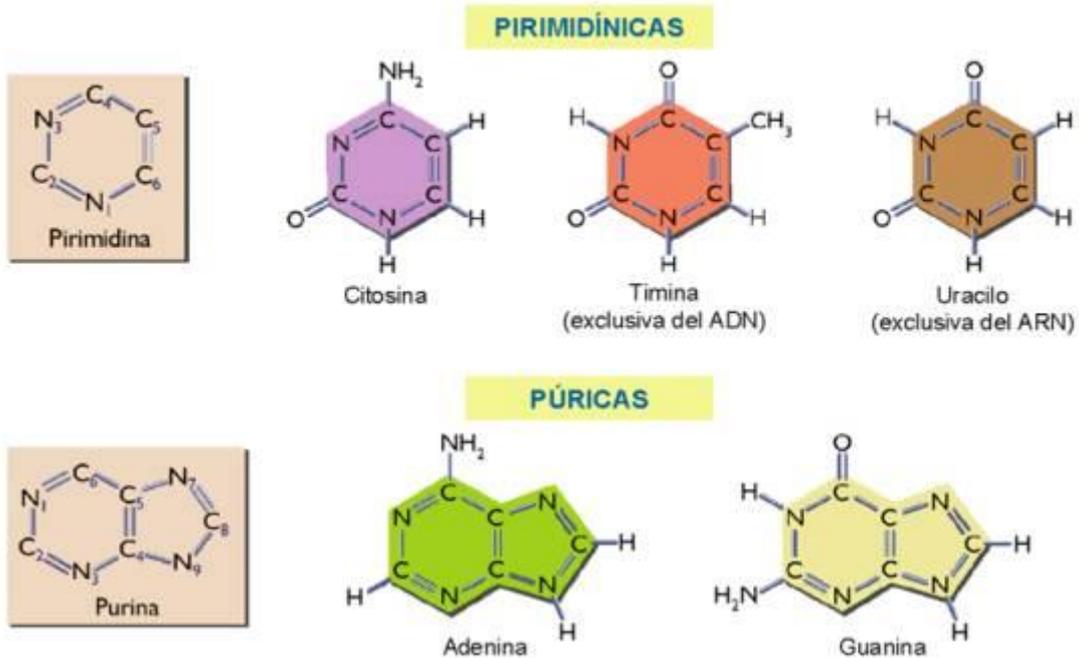
- Repasar la estructura y empaquetamiento del ADN nuclear.
- Realizar la extracción de ADN genómico a partir de hígado de ratón.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la composición química, los ácidos nucleicos se clasifican en ácidos desoxirribonucleicos (ADN), que se encuentran en el núcleo celular y en algunas organelas como mitocondrias y cloroplastos, en el caso de plantas, y en ácidos ribonucleicos (ARN).

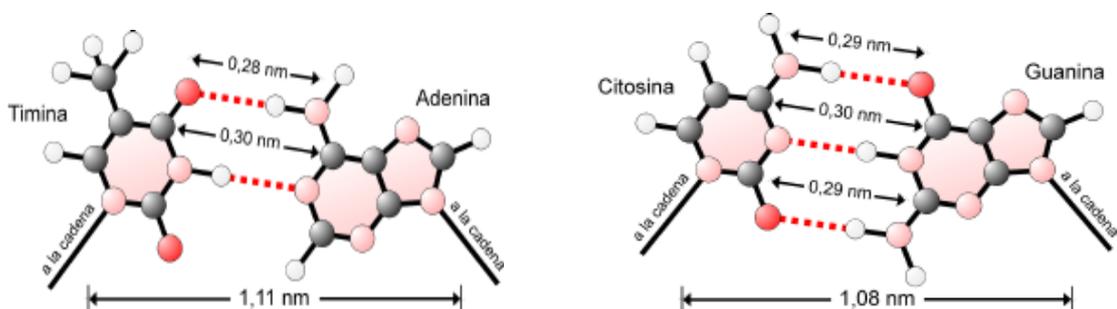
Los ácidos nucleicos son **polímeros lineales** en los que la unidad repetitiva, llamada **nucleótido**, está constituida por: (1) una pentosa (ribosa o desoxirribosa), (2) ácido fosfórico y (3) una base nitrogenada (purina o pirimidina) que puede ser adenina, citosina, guanina o timina. La unión de la pentosa con una base constituye un **nucleósido**. La unión mediante un enlace éster entre el nucleósido y el ácido fosfórico da lugar al **nucleótido**. Los nucleótidos forman polímeros a través de enlaces fosfodiéster entre el azúcar de un nucleótido y el grupo fosfato del siguiente dando lugar a la molécula de ADN o ARN.



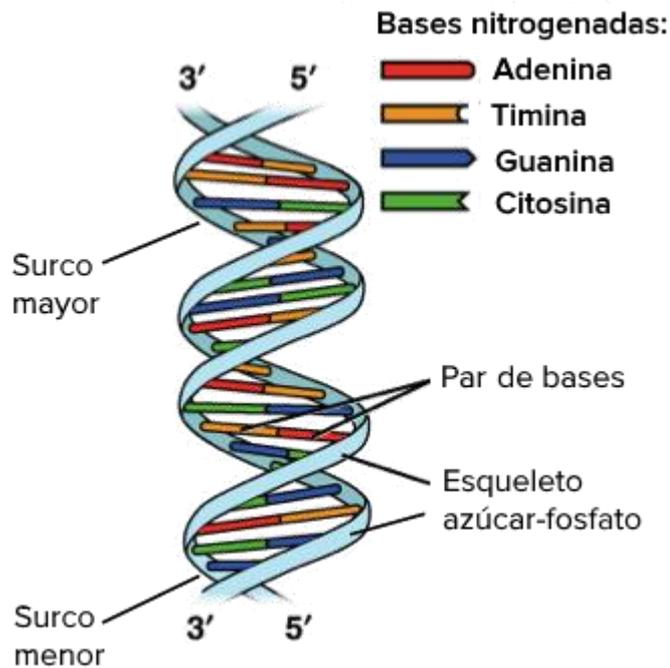


Bases nitrogenadas

El ADN es una macromolécula compuesta por dos polímeros de desoxirribonucleótidos, denominados hebras, que forman una doble hélice. La estructura final en forma de doble hélice se produce al establecerse puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de una de las cadenas con las bases nitrogenadas de la otra. Entre una adenina y una timina se establecen dos puentes de hidrógeno mientras que entre una guanina y una citosina se establecen tres puentes de hidrógeno. La disposición de las bases nitrogenadas a lo largo de la hebra de ADN es lo que se conoce como secuencia. De esta forma y sabiendo que la base complementaria a una adenina es una timina (y viceversa) y que a la base complementaria a una guanina es una citosina (y viceversa) es posible deducir la secuencia de la hebra complementaria a partir de una de las hebras.

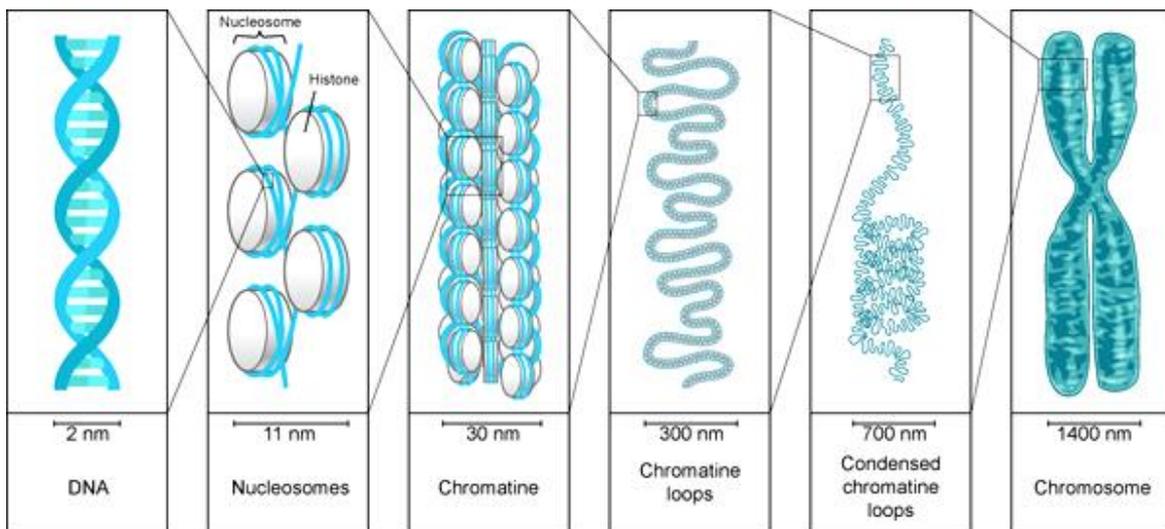


Representación de las interacciones a través de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de las dos hebras



Representación de la estructura molecular del ADN, la doble hebra.

En las células el ADN se encuentra interactuando con proteínas de carácter básico, las histonas, que permiten empaquetarlo para que ocupe un menor espacio. La longitud del total del ADN humano completamente extendido es de dos metros pero al empaquetarse en los cromosomas se reduce a unas pocas micras, una millonésima parte de esos dos metros.



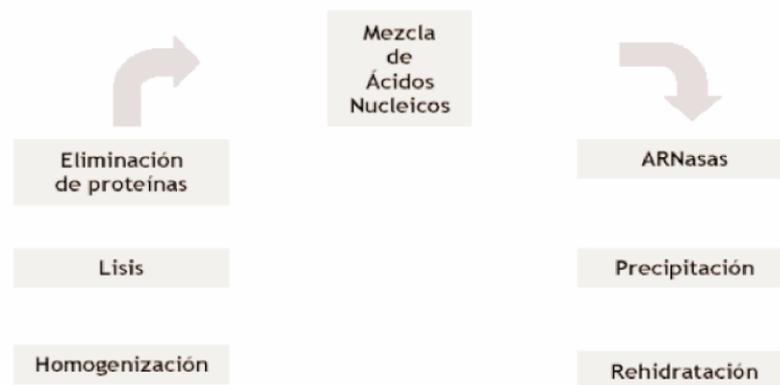
INTRODUCCIÓN A LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Debido a que el ADN es la molécula que almacena la información precisa para que un ser vivo pueda llevar a cabo todas sus funciones vitales, su aislamiento de células y tejidos es el primer paso en muchas investigaciones en biología. El aislamiento del ADN también es empleado en diversos campos como la medicina, la biotecnología o la criminología para obtener mejores terapias, mejorar cosechas o identificar individuos.

Aunque el objetivo de esta práctica es aislar ADN de un material biológico es importante aclarar que cuando hablamos del ADN debemos de diferenciar el ADN genómico, que se encuentra en el núcleo y contiene la mayoría de los genes, de los ADN extranucleares, que se encuentran en la mitocondria y el cloroplasto y contienen la información requerida para la síntesis de ciertas proteínas que son necesarias para el funcionamiento de esas organelas.

El método que emplearemos en este trabajo práctico es utilizado para extraer ADN genómico y consta de los siguientes pasos:

1. Desintegración del tejido y solubilización de los componentes celulares (homogenización de la muestra).
2. Extracción parcial de proteínas y de lípidos.
3. Precipitación de los ácidos nucleicos.



1. Homogeneización de la muestra

El método para desintegrar el tejido debe estar adaptado a las características de éste. Para grandes volúmenes de tejidos blandos, suelen usarse licuadoras esencialmente iguales a las licuadoras domésticas. Para volúmenes menores, en general es suficiente un homogeneizador, el cual consiste en un tubo de vidrio de paredes gruesas y un pistón (de vidrio o de teflón). La rotación del pistón dentro del tubo (propulsión manual o por un motor), disgrega la muestra.



Homogeneizadores de tejido eléctrico (izquierda) y manual tipo pistón (derecha).

Tejidos más resistentes, como hueso o diente, necesitan tratamientos mecánicos especiales. Aquellos tejidos con células cuya pared celular es resistente como por ejemplo

vegetales, hongos o bacterias, requieren también condiciones más agresivas. Uno de los métodos más utilizados consiste en congelar la muestra en nitrógeno líquido y, manteniéndola congelada, pulverizarla con un mortero. Así, además de desintegrar la muestra, se logra que ésta se mantenga a muy baja temperatura durante el tratamiento, con lo cual se evita la acción de enzimas endógenas que pudieran degradar el material de interés.

Para ayudar a la solubilización de los componentes celulares, a la ruptura de membranas y de complejos proteicos, la solución de lisis contendrá un detergente iónico (dodecilsulfato de sodio, SDS). Este detergente dispersa los componentes de las membranas y desnaturaliza las proteínas.

La solución de lisis contiene además el agente quelante de cationes divalentes EDTA. Esta molécula secuestra dichos iones lo que impide la acción de las enzimas que degradan el ADN, llamadas ADNasas que dependen de Mg^{2+} para su funcionamiento, aunque no tiene efectos sobre la mayor parte de las ribonucleasas.

2. Extracción de proteínas y lípidos

Dada la fuerte hidrofiliidad que los grupos fosfato le confieren a los ácidos nucleicos, éstos son muy solubles en agua. Dentro de una mezcla de solventes no miscibles, uno acuoso y otro orgánico no polar, los ácidos nucleicos tenderán a permanecer en la fase acuosa, en tanto que los lípidos y gran parte de las proteínas desnaturalizadas se encontrarán en la fase orgánica.

En la preparación de ácidos nucleicos, los solventes que se usan más frecuentemente para la extracción de proteínas y lípidos son el fenol y el cloroformo. Las condiciones de trabajo en el salón de prácticos desaconsejan la utilización de fenol por razones de bioseguridad. Se utilizará entonces una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La inclusión de alcohol isoamílico en la mezcla ayuda a la dispersión de agregados y hace disminuir la formación de espuma.

3. Precipitación de ácidos nucleicos

La precipitación de los ácidos nucleicos permite su purificación y concentración. Se basa en la simultánea neutralización de las cargas negativas y deshidratación de la molécula, lo cual posibilita su agregación y precipitación.

La precipitación es un fenómeno reversible (mediante la resuspensión en soluciones acuosas) y no debe ser confundido ni con la desnaturalización (potencialmente reversible) ni con la degradación (irreversible) de los mismos.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

Se procederá a aislar los núcleos celulares de páncreas o hígado de ratón y posteriormente se les extraerá ADN con una solución concentrada de cloruro de sodio. Se trabajará en condiciones de baja temperatura (en hielo) y con el material de vidrio previamente lavado con solución de citrato de sodio (*solución B*) para evitar la acción de las ADNasas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos a utilizar:

Tubos tipo eppendorf de 1,5 ml

Pipetas automáticas y tips

Microcentrífuga

Homogeneizador

Hielo granizado

Solución A: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,5 % P/V

Solución B: NaCl 2 M

Solución C: cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v:v)

Etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Procedimiento

A) Obtención de núcleos celulares

1. Homogenice el tejido con 6 volúmenes de solución A (lisis) y transfiera el homogeneizado a un tubo eppendorf.
2. Centrifugue a 1000 g durante 10 minutos y descarte el sobrenadante por inversión.
3. Resuspenda el precipitado con la solución A en un volumen igual al original.
4. Repita la operación. De esta manera se eliminan mitocondrias y retículo endoplásmico que contaminan la preparación. El EDTA elimina cationes divalentes como Mg^{2+} y Mn^{2+} , que son activadores de las ADNasas. Las células se lisan por acción del SDS (detergente iónico).

B) Extracción del ADN

1. Resuspenda el sedimento obtenido en el paso anterior en 0,5 ml de solución B (salina) y agite.
2. Centrifugue a 1000 g durante 15 minutos, recupere el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf y resuspenda en precipitado nuevamente en la misma solución.

C) Eliminación de proteínas contaminantes

1. Agregue a la mezcla de sobrenadantes un volumen (0,5 ml) de cloroformo:alcohol isoamílico y agite vigorosamente.
2. Centrifugue a 1200 g por 5 minutos. Las proteínas desnaturalizadas forman un tapón en el medio del tubo.
3. Tome la fase superior acuosa en la que se encuentra el ADN y transfiera a un tubo eppendorf limpio.

D) Precipitación de ADN

1. Al extracto de ADN libre de proteínas obtenido en el paso anterior, agregue lentamente 2 volúmenes de etanol frío. El alcohol debe agregarse por las paredes del tubo con mucho cuidado.
2. A medida que el ácido nucleico va precipitando se pueden ir visualizando sus hebras, mediante suaves movimientos rotatorios del tubo. Después de 10 minutos en hielo, centrifugar a 6000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Remover el etanol (sobrenadante).

3. Secar el ADN y resuspender en 100 ul de agua. El ADN puede tener apariencia gelatinosa por contaminantes como polisacáridos.

RESULTADOS:

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; 10ª Edición; Editorial El Ateneo; 2016.
2. Química La ciencia central; Brown TL, Lemay HE y Bursten BE; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 1993.
3. Fisiología Médica; Ganong WF; Decimosexta Edición; Editorial El Manual Moderno; 1998.
4. Química Orgánica; Wade LG; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 2004.

TRABAJO PRÁCTICO N° 12

INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR

El cultivo de células animales y tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte. Fue considerada inicialmente como una técnica particularmente difícil de aprender, y durante los años 50 empezó a ser una técnica rutinaria de laboratorio como soporte a la investigación en virología. Los problemas originales asociados a esta metodología están hoy en día prácticamente superados gracias a factores como la disponibilidad de antibióticos, los medios de composición definida, las instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles, etc.), y dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas, entre otros). Los avances técnicos y la aparición de un buen número de compañías comerciales de suministro de medios, sueros, equipo y líneas celulares han hecho del cultivo celular una tecnología con buena reproducibilidad.

Podemos dividir el cultivo de tejidos en dos grupos de técnicas: el cultivo de órganos y el cultivo de células. El cultivo de órganos se puede definir como el mantenimiento de pequeños fragmentos de tejido u órganos completos *in vitro*. El cultivo celular es la propagación de células dispersas tanto en suspensión como en monocapas sobre cristal o plástico.

CONCEPTOS ACTUALES DE CULTIVO CELULAR

Actualmente se entiende por cultivo celular al **conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células “*in vitro*”, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas**. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, de explantes, primarios o secundarios, etc.

Aplicaciones del cultivo celular

Los **estudios** que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular. Como ejemplo de **áreas de investigación** fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular son:

1. Virología: Cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas, etc.
2. Investigación del Cáncer: Búsqueda de células madre, determinación de receptores hormonales, etc.
3. Inmunología: Producción de anticuerpos monoclonales (generación de hibridomas), así como en el análisis de la genética de la célula somática.
4. Biotecnología: Para la producción industrial de proteínas recombinantes en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento.
5. Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo: Comprende el estudio de los receptores y de las vías de traducción de la señal.

6. Aplicaciones diagnósticas: Por ejemplo, en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad, etc.
7. Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos (piel, cartílagos) para trasplante.
8. Aplicaciones industriales y agronómicas: producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.

Ventajas e inconvenientes de las técnicas de cultivo celular

Estas técnicas poseen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo existen ciertas características no tan ventajosas a tener en consideración. Dentro de las **ventajas** podemos citar:

- a. Permiten un control preciso y fino del medio ambiente: En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial, etc.), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Esto es completamente cierto sólo para algunas líneas celulares para las que se han diseñado los denominados **medios definidos**. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran.
- b. Caracterización y homogeneidad de la muestra: Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.
- c. Economía: Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en un animal completo. Es diferente el coste de investigación de un nuevo fármaco para la empresa farmacéutica que está desarrollando moléculas si ha de sintetizar de cada una de las que ha de probar en cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) a que baste con pocos miligramos.
- d. Motivaciones éticas: La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo "*in vivo*" pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos.

En cuanto a las **desventajas** del cultivo celular:

- a. Técnica sensible: El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc.) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una

compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación.

b. Cantidad y costo: El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal.

c. Inestabilidad: Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente.

d. Validez del modelo *in vitro*: Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:

- Se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
- Se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular.
- Carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis *in vivo*, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS

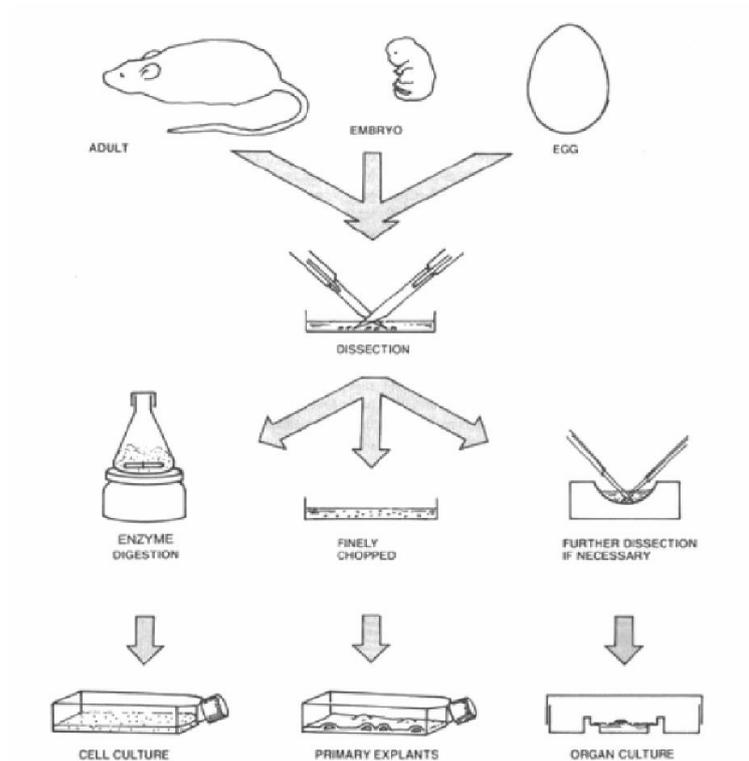
Se podría hablar de tres tipos de cultivos:

a. **Cultivo de órganos**. Implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen.

b. **Explantos primarios**. Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.

c. **Cultivo celular**. Existen dos tipos de cultivos celulares: los cultivos primarios y las líneas celulares. Los cultivos primarios son obtenidos a partir de explantes (fragmento escindido desde un órgano o tejido), por disgregación de tejidos y órganos o aislados de fluidos orgánicos como la sangre. La mayoría de los cultivos primarios mantienen la viabilidad por un periodo de tiempo limitado, a excepción de algunos derivados de tumores. En algunos casos, las células de un cultivo primario son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Así se pueden pasar a un nuevo frasco de cultivo y aumentar su cantidad. Los sucesivos cultivos así formados se denominan una **línea celular**. Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a **líneas celulares continuas**, que crecen

indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación.



EL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

La característica principal que define al laboratorio de Biología Celular en general y de cultivo de células y tejidos en particular es el mantenimiento de la asepsia. La tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior al de los contaminantes habituales: hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas, y por ello para el mantenimiento del cultivo será vital evitar la aparición en éste de cualquier microorganismo indeseado. El área de trabajo para realizar cultivos debe instalarse en una parte del laboratorio tranquila, alejada de las vías de paso y a ser posible dedicada exclusivamente al cultivo de células. La solución ideal es disponer de una habitación aislada.

1. Tipos de laboratorios de cultivo celular
2. La instrumentación del laboratorio de cultivo celular
 - 2.1 Las cabinas de bioseguridad
 - 2.2 Incubadores
 - 2.2.1 Incubador de CO₂
 - 2.3 Instrumentos ópticos de observación: microscopio de contraste de fases invertido
 - 2.4 Congeladores e instalación de criogenia (depósito de nitrógeno líquido)
 - 2.5 Equipo de esterilización
 - 2.5.1 Equipos de filtración

2.5.2 Autoclave

2.6 Otros instrumentos: centrífugas, contadores de células electrónico, equipo de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteador

1. TIPOS DE LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

La necesidad de asepsia depende del tipo de material que se va a procesar en el laboratorio. Esto define dos tipos de contención y de área de trabajo diferentes:

A. El laboratorio de cultivo de tejidos general, para la manipulación de cultivos no patógenos, se instalará preferentemente en una sala aislada y a la cual se le suministrará aire filtrado. Esto produce un aumento de presión atmosférica en el interior del laboratorio que impide la entrada de aire no filtrado al área limpia.

B. El laboratorio de cultivo con patógenos supone un nivel de contención superior. A fin de evitar la salida accidental de estos agentes se filtra el aire que sale de la sala, generando un déficit de presión en el interior de ésta. El aire sale siempre estéril.

2. LA INSTRUMENTACIÓN DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

En el laboratorio de cultivo celular propiamente dicho se encuentran los siguientes tipos de instrumentos:

A. Cabinas de bioseguridad (áreas de trabajo y de contención estéril).

B. Incubadores: baños termostatzados, incubadores de CO₂, incubadores 'roller', otros.

C. Instrumentos ópticos de observación del cultivo: microscopio invertido de contraste de fases, de fluorescencia, etc.

D. Instalación de criogenia (tanques de N₂ líquido) y congeladores.

E. Equipo de esterilización: autoclave, equipos de filtración, etc.

F. Otros instrumentos: centrífugas, contadores electrónicos de células, equipo de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteadores y dispensadores de líquidos, etc.

2.1 LAS CABINAS DE BIOSEGURIDAD

Su función es la de mantener un **área libre de partículas**, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras, etc.) que puedan acceder al cultivo, brindando un área para el trabajo seguro. Esto se consigue mediante un dispositivo mecánico que fuerza el paso del aire a través de un filtro de gran superficie (filtro HEPA) situado o bien en el techo (flujo vertical) o en la pared frontal (flujo horizontal) y que con una eficiencia del 99.999 % retiene las partículas por debajo de un cierto tamaño que es en general de 0.2 μm (como referencia, una bacteria *E. coli* mide 1 μm).

Los diferentes tipos de cabinas de flujo laminar se diseñan con diferentes propósitos:

a. **Protección personal:** protección del personal de los posibles agentes dañinos del interior de la cabina, por ejemplo, si el operador trabaja con virus patógenos.

b. **Protección del producto**, experimento o cultivo que se encuentra en el interior de la cabina de los contaminantes exteriores o de la contaminación cruzada con otros productos o cultivos situados en la misma cabina.

c. **Protección medioambiental**: evitar la salida al medio ambiente de productos o agentes contaminantes.



Imágenes de cabinas de bioseguridad de flujo vertical

Las cabinas de flujo laminar horizontal son muy adecuadas para una buena protección del producto, pero no son adecuadas para el trabajo con materiales peligrosos o con algún tipo de riesgo pues el operador queda completamente expuesto. En las cabinas de flujo vertical, más sofisticadas, se asegura una buena protección del producto, y, dependiendo de su diseño se puede asegurar una protección total del operador. Son por ello más adecuadas para el trabajo con agentes peligrosos.

2.2 INCUBADORES

Se trata de equipos comunes a la mayor parte de los laboratorios de biología y constan de una cámara hermética para mantener una atmósfera controlada que brinde las condiciones óptimas para el crecimiento de las células. Una función de estos equipos es mantener la **temperatura** necesaria para el crecimiento de las células. Las células en cultivo son capaces de soportar sin daños importantes variaciones de temperatura, siempre que sean por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden. Así pues, las células humanas soportan incubaciones a 4° C durante días y pueden ser congeladas a -196° C durante años (con sustancias preservantes). Sin embargo, no sobreviven más de unas pocas horas a variaciones de 2° C por encima de 37° C.

Además, los incubadores brindan control sobre la atmósfera a la cual se exponen los cultivos. Contienen un dispositivo de control de la **humedad** ambiente para mantener una humedad ambiente elevada, a fin de reducir la evaporación del medio de cultivo.

La mayor parte de los cultivos celulares se realiza en incubadoras de **CO₂** dotadas de la capacidad de controlar con precisión la concentración de este gas. El propósito del CO₂ es fundamentalmente la regulación del pH en el medio de cultivo de células eucariotas, donde el tampón bicarbonato es el de uso más extendido.

Es importante una recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura y los gases en su interior. Si además en el circuito de circulación de aire se intercala un filtro HEPA se consiguen eliminar las posibles partículas contaminantes, y se asegura la esterilidad del ambiente.



Incubadora de CO₂ (izquierda). Cultivos celulares mantenidos en el interior del incubador (derecha)

2.3 INSTRUMENTOS ÓPTICOS DE OBSERVACIÓN: MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES INVERTIDO.

El control morfológico del cultivo se realiza mediante el uso de un microscopio. El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor hace que un microscopio convencional no sea adecuado, por lo que se han desarrollado microscopios de diseño original, en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional (Ver figura).



La segunda característica que condiciona el instrumento óptico es su ausencia de color, es decir se trata de muestras vivas y con poco contraste. El microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases (diafragmas anulares a nivel del condensador y placa de fases entre las lentes del objetivo). De esta forma el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.

2.4 CONGELADORES E INSTALACIÓN DE CRIOGENIA

Es preciso el almacenamiento de soluciones y células a diferentes temperaturas, para lo que se requiere:

- a. Heladeras (4° C) para el almacenamiento de medios de cultivo y otras soluciones.
- b. Congeladores de -20° C para el almacenamiento de suero, aditivos (glutamina, antibióticos) y soluciones enzimáticas (tripsina, colagenasa).
- c. Congeladores de -80° C para el almacenamiento a largo plazo de los aditivos del medio (suero, glutamina, antibióticos, etc.) y de sustancias especialmente sensibles (factores de crecimiento, mitógenos, inductores, etc.).
- d. Unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196° C), para el almacenamiento de las líneas celulares.



2.5 EQUIPO DE ESTERILIZACIÓN: AUTOCLAVE Y EQUIPO DE FILTRACIÓN

La necesidad de asepsia para el cultivo de tejidos se extiende no sólo al medio en que se realiza el trabajo sino muy especialmente a los recipientes en que se realiza el cultivo, a los medios líquidos o sólidos, y a los instrumentos que puedan entrar en contacto con éste en algún momento de su manipulación (pipetas, puntas de pipeta automática, pinzas, tubos, material variado de vidrio, etc.). Para esterilizar todo este material, de variada naturaleza se emplean una serie de métodos: irradiación con radiación gamma o rayos X, esterilización por gas, autoclavado, filtración. En el laboratorio general de cultivo de tejidos se suele disponer de: equipos de filtración y autoclave.

Equipos de filtración: Constan de una fuente de vacío conectada a un kitasato dotado de una unidad de filtración o de una bomba peristáltica que fuerza el flujo de solución a través de una unidad de filtración. En ambos casos la esterilización se produce al atravesar la solución un filtro de poro 0.22 µm.

Autoclave: Instrumento que permite la esterilización por calor húmedo tanto de sólidos como de líquidos.



Equipo de filtración (izquierda) y autoclave (derecha)

EL MEDIO AMBIENTE DE CULTIVO

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello consideraremos que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos:

1. La naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células.
2. Las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio.
3. La naturaleza y composición de la fase gaseosa.
4. Las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.

1. EL SUSTRATO DE CULTIVO

La mayor parte de las líneas celulares crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido. El crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares especialmente de células hematopoyéticas y tumores ascíticos. Según si la línea celular precise o no unirse al sustrato para proliferar se dice que es dependiente o independiente del anclaje.

1.1 Tipos de sustrato

Los tipos de sustrato más empleados en la actualidad son los siguientes:

- a. **Vidrio.** Tiene como ventajas su escaso coste y su facilidad de limpieza y esterilización. Asimismo, es útil para su posterior observación al microscopio por su calidad óptica.
- b. **Plástico desechable.** Muy empleado en la actualidad como material desechable estéril por irradiación. El plástico más empleado es el poliestireno, de buena calidad óptica.

1.2 Recipientes de cultivo.

Tal como se ha descrito previamente, el material más utilizado como sustrato es el plástico desechable, en forma de diferentes tipos de recipientes. Los más comunes son:

- a. **Placas de Petri.** Disponibles en varios tamaños son las más empleadas cuando se trata de crecer las células para usar directamente en experimentos.
- b. **Multiplacas.** Es una variante de las placas de Petri. Placas de varios pocillos, desde 6 a 96 pocillos.
- c. **Frascos de Roux.** Disponibles en diferentes tamaños, son recomendables para el mantenimiento de las líneas y la producción de células, o bien para el crecimiento de células en suspensión.

2. LA FASE GASEOSA

Los componentes más significativos de la fase gaseosa son el oxígeno y el dióxido de carbono.

2.1 Oxígeno

La necesidad de oxígeno para la mayor parte de los cultivos celulares es cubierta con la tensión atmosférica, aunque existen cultivos, especialmente los cultivos de órganos que requieren una tensión de oxígeno superior (del 95%) posiblemente debido a la geometría del órgano y a las dificultades de difusión del gas en su interior.

2.2 Dióxido de carbono

El dióxido de carbono juega un complejo papel en el medio debido a que influye la cantidad de CO₂ disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO₃⁻. Las reacciones que tienen lugar en el medio son:



El incremento de la concentración de ión bicarbonato desplaza la ecuación (1) hacia la izquierda, de modo que el pH se establezca en 7.4. De modo que para establecer un pH determinado se debe tener en cuenta los niveles de bicarbonato sódico y la tensión de CO₂. Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y tensión de CO₂ para alcanzar el pH correcto. Sin embargo, se emplean otras sustancias tamponadoras en la formulación de muchos medios en la actualidad, lo que permite una estabilidad superior del pH en el medio, así como una mayor capacidad buffer. En resumen, los cultivos crecidos a baja densidad en un recipiente abierto precisan una atmósfera de CO₂, cuya concentración esté en equilibrio con el bicarbonato sódico en el medio.

3. PROPIEDADES FÍSICAS

Las características físicas del medio son: pH, osmolaridad, temperatura y viscosidad.

3.1 pH y capacidad buffer.

El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7.4, aunque existen pequeñas variaciones dependiendo de la línea celular que se esté cultivando. Para tener un control del pH del medio se suelen utilizar “indicadores de pH”, el más comúnmente usado

es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7.4, naranja a pH 7.0, amarillo a pH 6.5, azul-rojo a pH 7.6 y púrpura a pH 7.8. El medio de cultivo debe estar tamponado, a fin de evitar los cambios bruscos de pH. La solución tamponadora más empleada sigue siendo el tampón bicarbonato, que equilibra el CO₂ atmosférico.

3.2 Osmolaridad

Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia frente a la osmolaridad del medio, creciendo bien en el rango de 260 a 320 mOsm/Kg, con pequeñas variaciones dependiendo de la especie considerada.

3.3 Temperatura

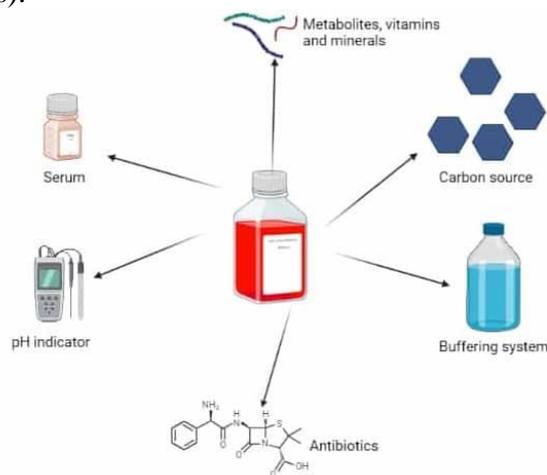
La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de ésta en la incubación.

3.4 Viscosidad

La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo, la centrifugación y el pipeteado.

4. CONDICIONES FISIOLÓGICAS

Hacen referencia a la composición del medio. Ya se indicó que la principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es el de obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar al medio "natural". Los medios de cultivo contienen una mezcla de aminoácidos, glucosa, sales, vitaminas y otros nutrientes, y están disponibles en forma de polvo o líquido a través de proveedores comerciales. Los requisitos para estos componentes varían entre las líneas celulares. Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos: sistema tamponador, sales inorgánicas, aminoácidos, fuente de carbono, vitaminas, otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular, hormonas y factores de crecimiento (suero) e inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).



4.1 Sistema amortiguador

La regulación del pH es fundamental para lograr condiciones óptimas de cultivo y generalmente se logra mediante uno de los dos sistemas de amortiguación, tampón CO₂/HCO₃⁻ o HEPES. Este último tiene una capacidad de amortiguación superior en el

rango de pH de 7,2 a 7,4 y no requiere una atmósfera gaseosa controlada, sin embargo, es relativamente caro y tóxico en concentraciones más altas para algunos tipos de células.

4.2 Sales inorgánicas

El empleo de sales inorgánicas ayuda a mantener el equilibrio osmótico y proporciona iones de sodio, potasio, magnesio y calcio para diversas funciones celulares.

4.3 Aminoácidos

Los aminoácidos son los componentes básicos de las proteínas y, por tanto, son ingredientes obligatorios de todos los medios de cultivo celular conocidos.

4.4 Fuente de carbono

Este tipo de componente brindará la fuente de energía para las células. Todo medio de cultivo requiere una fuente de carbono que las células puedan metabolizar. Suele ser glucosa, que será metabolizada preferentemente vía glucólisis hacia piruvato, que puede ser convertido en lactato o aceto para entrar al ciclo de Krebs.

4.5 Vitaminas

Los medios más básicos sólo se suplementan con vitaminas del grupo B, siendo los demás grupos aportados a través del suero. En medios más definidos se suplementan todas las vitaminas. La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular.

4.6 Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular

Dependiendo del medio, éste incluye en su formulación nucleósidos, intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato, lípidos, etc. La adición de piruvato en el medio permite al cultivo incrementar su producción endógena de CO₂ haciéndolo independiente de la aportación exógena de éste.

4.7 Hormonas y factores de crecimiento: suero.

En los medios no definidos suele aportarlos el suero. Los tipos de suero empleados son suero de ternero ("calf serum", CF), suero bovino fetal ("fetal calf serum", FCS), suero de caballo ("horse serum", HS) y suero humano ("human serum", HuS). El más usado es el suero de ternero, mientras que el suero bovino fetal es usado en líneas más exigentes, y el suero humano en líneas humanas.

4.8 Antibióticos y antifúngicos

A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos ha de ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo.

LA ESTERILIZACIÓN EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR

La técnica de cultivo artificial de células (tanto procariotas como eucariotas), requiere que las condiciones tanto ambientales como de los instrumentos a utilizar garanticen la asepsia necesaria para que sólo tenga lugar el crecimiento de la célula de interés. El hecho de que existan distintos tipos de microorganismos en el medio ambiente, crea grandes dificultades en los estudios de biología celular, cuando es necesario obtener las especies microbianas en estado de pureza, ya que tanto el instrumental como los medios de cultivo son invadidos con suma facilidad por los microbios del medio ambiente. Debido a este problema, se han desarrollado un grupo de procedimientos que tienen como objetivo la destrucción de todas las formas vivas que existan sobre los objetos o sustancias que se desean libres de ellas (asepsia), a este conjunto de técnicas y procedimientos se los denomina **esterilización**.

LA ESTERILIZACIÓN

El proceso de esterilización comprende todos los procedimientos físicos, químicos o mecánicos que se llevan a cabo para destruir, inactivar o retener gérmenes en general u organismos patógenos en particular. Gracias a estos procedimientos, se obtienen materiales de laboratorio aptos para investigación o diagnóstico, como así también elementos quirúrgicos que alcanzan un estado de asepsia que evita la contaminación durante las intervenciones médicas.

Los métodos de esterilización pueden ser divididos en dos tipos, **físicos**, aquellos que emplean agentes físicos, o **químicos**, que son los que utilizan compuestos o sustancias con la finalidad de eliminar los contaminantes.

1. METODOS FÍSICOS

1.1 Calor

La utilización de este método y la eficacia del mismo depende de dos factores muy importantes: el tiempo de exposición del material y la temperatura empleada durante el proceso. Todos los microorganismos son susceptibles, en mayor o menor medida, a la acción del calor. El calor conduce a la desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes que son irreversibles en los microorganismos.

a. Fuego Directo: Este procedimiento consiste en la eliminación de toda forma de vida por exposición directa del objeto que se desea esterilizar a la llama de un mechero de Bunsen. Cuando éste es de metal se expone el área a esterilizar hasta que se ponga al rojo vivo (asas de cultivo; agujas, etc.). Si es de vidrio se deja un tiempo prudencial, procurando que la llama llegue a todos lados. Antes de utilizar el objeto esterilizado es necesario dejarlo enfriar en un sitio aséptico. Este procedimiento tiene limitaciones debido a que el mismo conlleva el deterioro de los objetos y si son de gran volumen, la esterilización nunca es totalmente perfecta.

b. Calor Seco: El calor seco produce deshidratación celular, lo cual es tóxico debido a los altos niveles de electrolitos que se encuentran en las células y fusión de membranas, residuos que quedan adheridos al objeto estéril. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos. Este

procedimiento sigue siendo rutinario en los laboratorios donde se utiliza para la esterilización de placas de Petri de vidrio y pipeteros (tubos metálicos para la esterilización de pipetas de vidrio). Para esterilizar por intermedio del aire caliente es necesario colocar los objetos en estufas, donde se lleva el aire de su interior a una temperatura entre 150° y 190° C por 3 horas.

Ventajas del calor seco:

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles.

Desventajas del calor seco:

- El tiempo requerido para el proceso de esterilización es mayor respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor.

c. Calor Húmedo: El calor húmedo como agente esterilizador produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones:

- El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas son producidas por reacciones que eliminan agua.
- El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire. Por lo que el tiempo de exposición necesario para la eliminación de cualquier forma de vida es menor comparado con el necesario cuando se emplea calor seco

El **autoclave** es el equipamiento que se utiliza para llevar a cabo la esterilización con calor húmedo, funciona como una olla a presión. El procedimiento realiza la esterilización por vapor de agua a una alta temperatura, 121° C, la cual se obtiene al ejercer mayor presión que la atmosférica (combina temperatura y presión). Esteriliza a una atmósfera de presión y se deja el material durante 20 a 30 minutos. El equipamiento consta de una caldera de cobre, sostenida por una camisa externa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas o por una resistencia eléctrica. La caldera se cierra en la parte superior por una tapa de bronce sujeta firmemente por bulones.

d. Tindalización: Esta variante se basa en el principio de Tyndall donde se da lugar a la esterilización por acción discontinua del vapor de agua, Las bacterias que resisten una sesión de calefacción, hecha en determinadas condiciones, pueden ser destruidas cuando la misma operación se repite con intervalos separados y en varias sesiones.

Ventajas del calor húmedo:

- Rápido calentamiento y penetración
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo
- No deja residuos tóxicos
- Hay un bajo deterioro del material expuesto

Desventajas del calor húmedo:

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

1.2 Filtración

Cuando se necesita esterilizar sustancias o soluciones que no resisten la acción del calor sin sufrir descomposición total o parcial debe de aplicarse la técnica de esterilización por filtración, la cual puede aplicarse por medio de presión o aspiración. Este procedimiento es aplicable a la esterilización de líquidos y gases, especialmente los primeros. Esta técnica se basa en el pasaje de líquidos a través de sustancias porosas que retienen a los

microorganismos. En la actualidad se disponen de membranas filtrantes con poros de un tamaño determinado. El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas, estos últimos están en el límite de separación según el diámetro de poro que se utilice.

1.3 Radiación

Su acción esterilizante depende del tipo de radiación, el tiempo de exposición y la dosis empleada.

a. Radiaciones Ionizantes: Estas radiaciones dan lugar a la producción de iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos. Se caracterizan por tener gran penetrabilidad y se las utiliza para esterilizar materiales termolábiles (termosensibles) como jeringas descartables, sondas, etc.

b. Rayos Ultravioleta: Afectan a las moléculas de DNA de los microorganismos. Son escasamente penetrantes y se utilizan para superficies, y en la esterilización de quirófanos.

c. Rayos Gamma: Su empleo está basado en los conocimientos sobre la energía atómica. Este tipo de esterilización se aplica a productos o materiales termolábiles y de gran importancia en el campo industrial. Puede esterilizar antibióticos, vacunas, alimentos, etc.

2. MÉTODOS QUÍMICOS

Estos métodos modifican irreversiblemente las estructuras necesarias para la vida como los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos y provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos. Se basa en la utilización de diferentes **agentes químicos** con la suficiente reactividad para alterar dichas biomoléculas esenciales. La iodopovidona (Pervinox), el cloruro de benzalconio (sal de amonio cuaternario o cloruro de zefirano) son ejemplos de antisépticos útiles para desinfectar manos y superficies. Cuando la superficie es resistente, el mejor agente biocida es el hipoclorito de sodio (agua lavandina). Otros agentes químicos empleados en la esterilización son:

a. Óxido de etileno: El Óxido de etileno es un agente alquilante que se une a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhidrilos, hidroxilos, etc. Mediante este procedimiento se logra la destrucción de todos los organismos y microorganismos conocidos, incluso esporas y virus. Esteriliza sin deterioro artículos de goma, plástico, metal, madera, lana, piel, papel, productos farmacéuticos. Es utilizado en la esterilización gaseosa, generalmente en la industria farmacéutica. Sirve para esterilizar materiales termosensibles como el descartable (goma, plástico, papel, etc.), equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias, metal, etc. Es muy peligroso por ser altamente inflamable y explosivo, y además cancerígeno. Por esto, luego del proceso de esterilización, el material se deja estacionado en una zona denominada de venteo, en la cual se mantiene a temperatura controlada y con circulación continua de aire para promover la eliminación completa del óxido de etileno residual.

Aldehídos: Son agentes alquilantes que actúan sobre las proteínas, provocando una modificación irreversible en enzimas e inhiben la actividad enzimática. Estos compuestos aseguran la destrucción de esporas.

- **Glutaraldehído:** Se prepara una solución alcalina al 2% y se sumerge el material a esterilizar durante un lapso de 20 a 30 min, y luego un enjuague de 10 min.

Este método tiene la ventaja de ser rápido y ser el único esterilizante efectivo frío. Puede esterilizar plástico, goma, vidrio, metal, etc.

- **Formaldehído:** Se utilizan las pastillas de paraformaldehído, las cuales pueden disponerse en el fondo de una caja envueltas en gasa o algodón, que después pueden ser expuesta al calor para que se dé lugar a una rápida esterilización (acción del gas formaldehído).

Antisépticos	Alcoholes
	Iodo
	Agentes catiónicos, aniónicos y anfóteros
	Órgano-Mercuriales
	Colorantes
Desinfectantes y/o Esterilizantes	Cloro y Compuestos clorados
	Aldehídos
	Óxido de Etileno
	Compuestos Fenólicos
	Ácidos y Álcalis

BIBLIOGRAFÍA

- Holbrock, K. A. y Hennings, H. (1983). "Phenotypic expression of epidermal cells '*in vitro*': a review". J. Invest. Dermatol. 81: 11s-24s.
- Hayflick y Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains". Exp. Cell Res. 25: 585-621.
- Jennie P. Mather y David Barnes, Methods in Cell Biology, Academic Press, Volume 57, 1998.

TRABAJO PRÁCTICO N° 13

TÉCNICAS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

OBJETIVOS

- Aplicar los conceptos aprendidos sobre el cultivo celular en la realización de una actividad práctica.
- Aplicar la técnica aséptica para llevar a cabo la actividad.
- Familiarizarse con el cultivo de bacterias en medios de cultivo sólidos y líquidos.
- Analizar la sensibilidad de la bacteria *Escherichia coli* a diferentes antibióticos.

INTRODUCCIÓN

En microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos. Es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en humanos y animales. Al proporcionar un entorno y condiciones apropiadas, los microorganismos proliferan produciendo réplicas de sí mismos, para lo cual necesitan los elementos presentes en su composición química. Los nutrientes deben proporcionar estos elementos en una forma que sea accesible desde el punto de vista metabólico. Además, los microorganismos requieren energía metabólica para sintetizar macromoléculas y mantener gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Los factores que deben controlarse durante la proliferación incluyen nutrientes, pH, temperatura, aireación, concentración de sales y fuerza iónica del medio.

TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo adecuado debe contener todos los nutrientes necesarios para el microorganismo a cultivar: fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y minerales como hierro y calcio.

Existe una gran variedad de medios para el cultivo de microorganismos en el laboratorio, la mayoría de ellos pueden adquirirse ya elaborados, necesitando algunos de ellos sólo la adición de agua y/o la esterilización. Los medios de cultivo pueden clasificarse por el **estado físico** en que se encuentran:

1. Medios líquidos o caldos: Son aquellos que contienen, disueltos en agua, los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

2. Medios sólidos: Contienen nutrientes disueltos en agua, pero se les añade un agente solidificante que en general es el agar. Éste es un polisacárido complejo que se obtiene de algas rodfíceas de origen marino cuyas propiedades son de gran utilidad en la preparación de medios de cultivo sólidos: no es degradado enzimáticamente por los microorganismos (a excepción de algunos microorganismos de ambientes marinos), se disuelve aproximadamente a 100° C y permanece en estado líquido por encima de los 45 – 50 °C, por lo cual permanece sólido a la temperatura de proliferación de las bacterias (37 °C).

Generalmente, el agar se añade para solidificar un medio líquido, en una concentración del 1,5 % P/V. Los medios con agar se envasan en tubos o en placas de Petri. Estos medios son utilizados para la obtención de colonias aisladas, selección de microorganismos y preservación a 4° C.

3. Medios semisólidos: Son similares a los medios sólidos, pero la concentración del agente solidificante es menor, generalmente del 0,4 %. Con ello, una vez solidificados presentan una consistencia gelatinosa. Se utilizan, por ejemplo, para determinar la movilidad de los microorganismos.

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de medios de cultivo se ha simplificado en gran medida a medios deshidratados, en los que los diferentes nutrientes se encuentran ya mezclados en las debidas proporciones, siendo sólo necesario la adición de la cantidad correcta de agua destilada para disolver sus componentes (Figura 1).

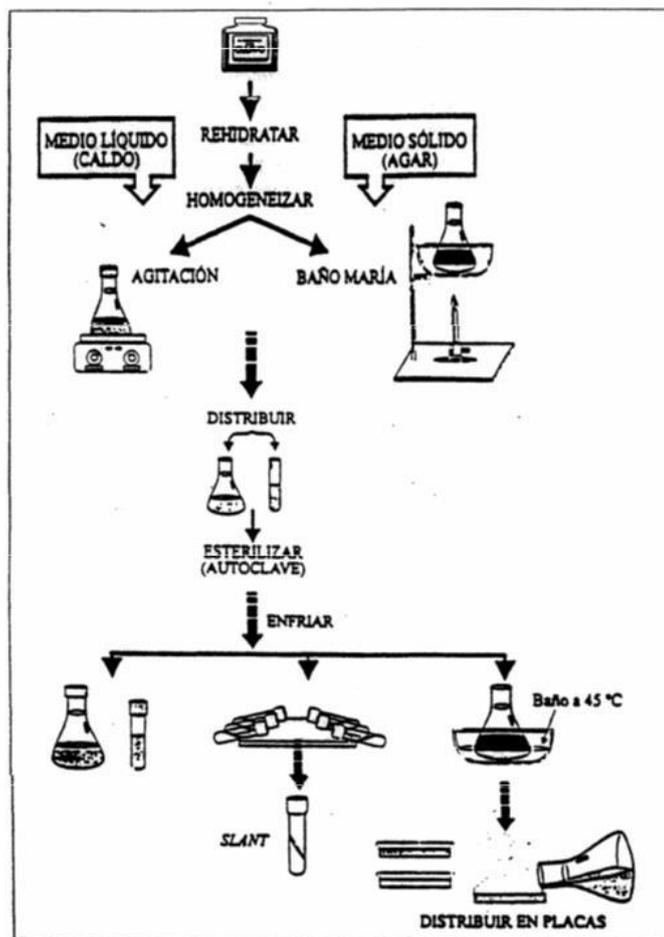


Figura 1: Preparación de medios de cultivo (Manual práctico de Microbiología, Díaz y col.)

Cuando se prepara un medio líquido se deben disolver totalmente todos sus componentes en agua destilada. A continuación, el caldo se envasa en los recipientes adecuados (matraces o tubos), tapando los mismos y esterilizándolos.

La preparación de un medio sólido puede hacerse de dos maneras: preparar el caldo y añadir agar al 1,5 % o bien utilizar un medio sólido comercial el cual sólo debe ser fundido

previo a su utilización. Independientemente de la forma elegida para hacerlo, la preparación de los medios de cultivo sólidos requiere procedimientos especiales, ya que el agar es insoluble en agua. Por ello, una vez añadida el agua, se debe calentar la mezcla hasta 100° C, para permitir que el agar se funda y quede incorporado al resto de los nutrientes disueltos. El medio fundido se dispensa en tubos o matraces estériles. Los medios sólidos contenidos en tubos pueden dejarse enfriar en posición vertical, si van a ser inoculados en profundidad, o bien pueden inclinarse para que al solidificarse en esa posición adopte la forma inclinada que proporciona una mayor superficie de siembra (agar pico de flauta o agar inclinado).

Para preparar placas de Petri, se utilizará el medio de cultivo que ha sido esterilizado en un frasco y, una vez atemperado, se verterá en placas vacías en un ambiente aséptico, como el que proporciona la proximidad de la llama de un mechero o una campana de flujo laminar. En algunas ocasiones, el medio de cultivo destinado a placas puede conservarse estéril en tubos, que se fundirán al baño maría cuando se vayan a preparar las placas.

Si se han de incorporar al medio compuestos termolábiles, como vitaminas o antibióticos, se esterilizarán éstos por filtración y se añadirán al medio de cultivo previamente esterilizado en autoclave y una vez que este se haya atemperado.

La conservación de los medios ya preparados puede hacerse a temperatura ambiente, pero es preferible conservarlos a 4° C para retrasar su deshidratación y conservar mejor sus nutrientes.

• **Medio LB (proporciones para la preparación de 1 litro):**

- Bactotripton 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Cloruro de sodio 10 g
- Agua destilada completar hasta 1 litro. Ajustar pH a 7.

• **Medio LB-agar proporciones para preparar de 1 litro:**

- LB 1 L
- Bactoagar 15 g

Mecanismo de acción de Ampicilina: los antibióticos beta-lactámicos, como la ampicilina, son bactericidas. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBS (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte. La ampicilina es bactericida tanto para bacterias Gram positivas como para bacterias Gram negativas. La estructura molecular de la ampicilina se muestra a continuación:

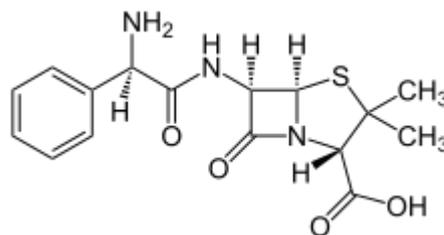


Figura 2: Estructura del antibiótico ampicilina

FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO

1) Concentración de iones hidrógeno (pH)

La mayor parte de los microorganismos tiene un pH óptimo muy estrecho. El pH óptimo debe determinarse empíricamente para cada especie. La mayor parte de los microorganismos (neutrolófilos) prolifera mejor en un pH de 6,0 a 8,0, aunque algunas formas (microorganismos acidófilos) encuentran su cifra óptima con pH de 3,0 y otros (alcalófilos) tienen un pH óptimo de hasta 10,5.

2) Temperatura

La temperatura óptima para el cultivo de las distintas especies microbianas varía: los psicrófilos crecen mejor a temperaturas bajas (-5 a -15°C) y por lo general se encuentran en ambientes de este tipo como las regiones del Ártico y la Antártida; para los psicrotrofos, la temperatura óptima es entre 20 y 30°C , pero también crecen bien a temperaturas menores. Constituyen una causa importante de desperdicio alimentario. Los mesófilos crecen mejor entre 30 a 37°C , y la mayor parte de los termófilos crece mejor entre 50 a 60°C . Algunos microorganismos son hipertermófilos y pueden desarrollarse a temperatura de ebullición, la cual existe en sitios con alta presión como en las profundidades del océano. La mayor parte de los microorganismos son mesófilos; 30°C es la temperatura óptima para muchas formas de vida libre y la temperatura corporal del hospedador es óptima para simbioses homeotermos.

3) Aireación

Muchos microorganismos son aerobios obligados, esto es, necesitan oxígeno como aceptor de hidrógeno; otros son anaerobios facultativos, es decir, tienen la capacidad de vivir en forma aeróbica o anaeróbica; en tanto que otros son anaerobios obligados, pues necesitan una sustancia distinta al oxígeno como aceptor de hidrógeno y son sensibles a la inhibición de oxígeno; otros más son microaerófilos, que necesitan pequeñas cantidades de oxígeno (2 a 10 %) para la respiración aerobia (la concentración más elevada es inhibitoria); y otros son anaerobios aerotolerantes, pues son indiferentes al oxígeno. Éstos pueden crecer en su presencia, pero no lo utilizan como aceptor de hidrógeno.

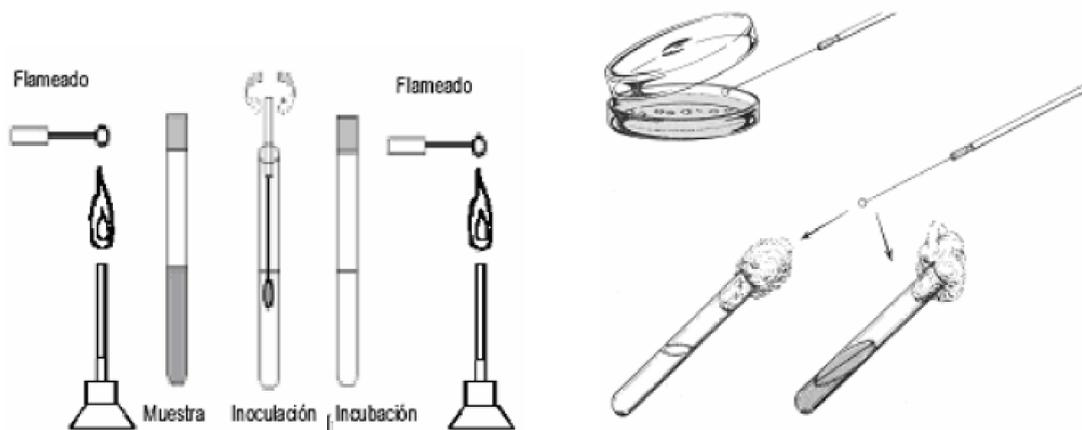
ACTIVIDAD EXPERIMENTAL N°1: CULTIVO DE *E. coli*

MATERIAL NECESARIO:

- Asa de siembra
- Tubos con medio LB líquido
- Placas de Petri con medio de cultivo sólido LB-agar
- Cultivo de bacterias de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α
- Mechero

A) CULTIVO DE *E. coli* EN LB LÍQUIDO

- 1- Previo a encender el mechero, desinfectar la zona utilizando alcohol etílico al 70%.
- 2- Llenar el tubo con 3 ml de caldo LB. Calentar el asa hasta que se ponga roja y luego enfriarla en el medio.
- 3- Transferir asépticamente, con el asa de siembra, una pequeña muestra de los microorganismos, desde el tubo que contiene el material problema o tomando una colonia de una placa de Petri. Sumergir el asa en un tubo con LB líquido agitar para desprender y diluir la muestra.
- 4- Repetir desde el punto 1 para cultivo en LB con ampicilina (50 μ g/ml).
- 5- Incubar el tubo recién sembrado en estufa preferiblemente en agitación, durante 24-48 horas a la temperatura óptima de crecimiento.



B) CULTIVO DE *E. coli* EN LB-AGAR

- 1- Previo a encender el mechero, desinfectar la zona utilizando alcohol al 70%.
- 2- Calentar el asa hasta que se ponga roja. Enfriar el asa en el medio con agar.
- 3- Tomar un inóculo de bacteria y sembrar en la placa por agotamiento de acuerdo a la técnica de estría múltiple en superficie.
- 4- Colocar en estufa a 37 °C con la tapa hacia abajo por 24 - 48 hs.
- 5- Repetir desde el punto 2 para cultivo en LB-agar-ampicilina.

Tipos de siembra en placas de medio sólido:

1) Estría múltiple en superficie (técnica a utilizar en este práctico)

Extender en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría (Figura 3). Se lleva la placa a incubar, a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida. La posición invertida evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas. Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias. Técnica de aislamiento por estría en superficie:

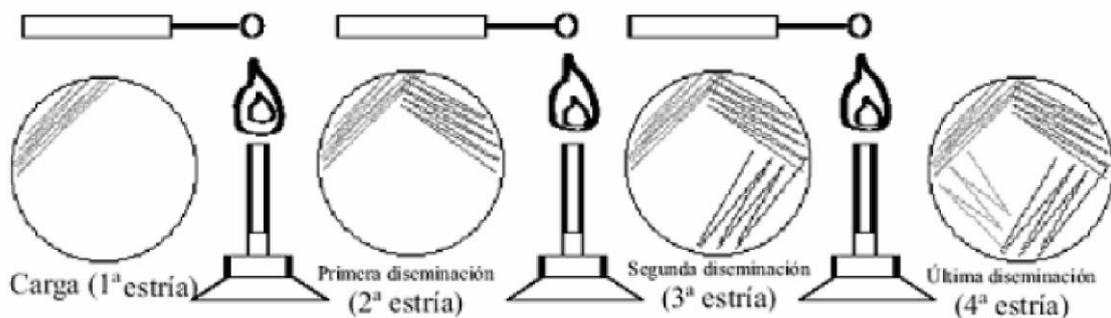


Figura 3: Cultivo de bacterias por estriado.

2) Dilución en masa

En una placa de Petri vacía se deposita un pequeño volumen conocido de muestra y a continuación se añade el medio de cultivo (agar nutritivo) fundido y atemperado aproximadamente a 45° C. Se mezclan ambos por rotación suave de la placa. De esta forma los microorganismos se distribuirán de forma homogénea en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar. Otra variación de esta técnica consiste en inocular el medio de cultivo, fundido y atemperado, contenido en un tubo, con un determinado volumen de la muestra. La homogeneización de la muestra y el medio de cultivo se realizan por rotación del tubo entre las manos, antes de verterlo sobre la placa (Figura 4). En ambos casos, después de la homogeneización, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (siempre en posición invertida).

Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerofílicos.

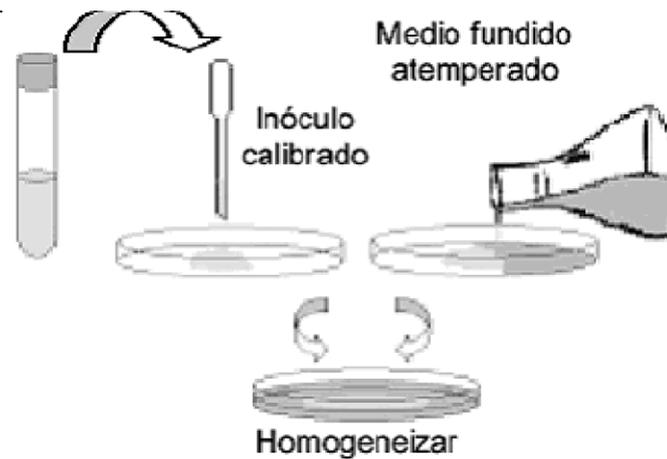


Figura 4: Cultivo de bacterias por dilución en masa.

3) Extensión en superficie

Depositar sobre la superficie de una placa con agar nutritivo una gota o 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo de microorganismos problema y extenderlo con ayuda del cayado, previamente esterilizado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco. Incubar la placa, en posición invertida, a la temperatura deseada (durante 24, 48 ó 72 horas) según el tipo de microorganismo. La posición invertida evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas (Figura 5). Es una técnica usada para el aislamiento de colonias, que permite igualmente el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.

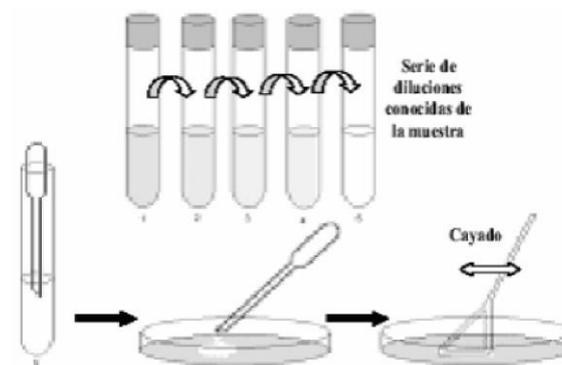


Figura 5: Siembra por extensión en superficie para recuento.

RESULTADOS ESPERADOS

a) **Extensión en superficie:** Tras el período de incubación (24 a 48 horas) se examinarán las placas. Las colonias aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta. Mediante esta técnica podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc. Esta técnica de siembra, además de permitir que se distingan las colonias por su morfología, permite el recuento de microorganismos viables. La expresión de este recuento se hace en "unidades formadoras de colonias" (UFC) ya que cada una procede de un sólo microorganismo (o de un grupo de

microorganismos, pues en algunos casos éstos tienden a formar agregados). A partir de las colonias aisladas, los microorganismos pueden transferirse a otros medios de cultivo para su estudio.

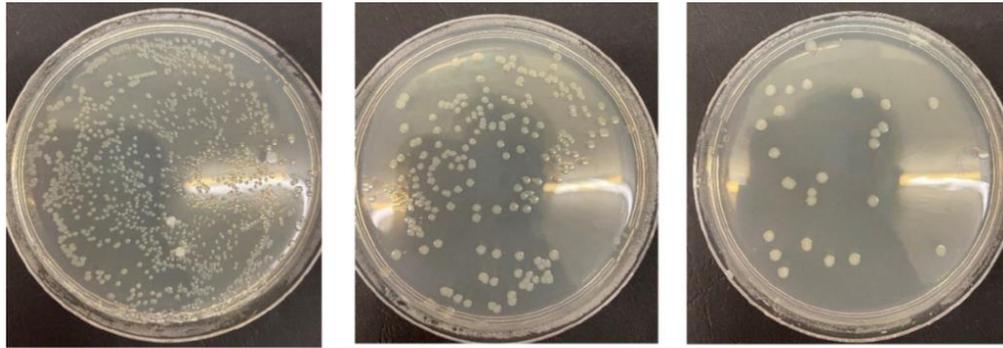


Foto: María Pacheco. Banco de diluciones

b) **Por estría múltiple en superficie:** Tras la incubación, se observarán las colonias aisladas en alguna región de la placa inoculada. Con esta técnica se logra la separación de los microorganismos que se encuentran en un cultivo mixto, o bien que proceden de muestras homogéneas, pero en las que existe un elevado número. En las zonas donde existen colonias aisladas se puede estudiar la morfología colonial.



c) **Dilución en masa:** Aparecen las colonias distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que forman las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología.



El diagnóstico microbiológico se basa en gran medida de la capacidad del operador de reconocer las distintas especies bacterianas en función de la morfología colonial que estas presentan cuando son cultivadas sobre un medio sólido.

Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas aisladas sobre medio sólido

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 	Filamentoso 	Crateriforme 	Invasiva o superficial
Filamentosa		Acuminada 	

ACTIVIDAD EXPERIMENTAL N°2: CULTIVO DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES

Cada grupo de trabajo dispondrá de una placa de petri con LB-agar. Deberán traer a la clase una muestra de algún material de interés a partir del cual se cultivarán los microorganismos que estén presentes en esa muestra. Para coleccionar la muestra se deberán lavar las manos y el utensilio que empleen (cuchara) con agua y jabón y luego rociarlo con alcohol. Tomar una pequeña cantidad y colocarla en un frasco estéril de orina. Conservar la muestra en la heladera hasta el día del práctico. Les brindamos algunos ejemplos, pero apelamos a que usen su imaginación: yogur, agua de un florero, tierra de una maceta, etc.

CUESTIONARIO DE INTEGRACIÓN:

1. Si usted recibe una muestra biológica perteneciente a un paciente con posible infección bacteriana. Se suponen dos posibles agentes causales morfológicamente diferentes, ¿Cuál es la técnica que utilizaría para poder aislar ambas bacterias para su estudio individual?
2. ¿Cómo demostraría en el laboratorio que una bacteria presenta movimiento propio?
3. Discuta con sus compañeros/as las ventajas y desventajas que presentan el uso de medios líquidos y sólidos en el proceso de aislamiento de bacterias.

4. ¿Cuáles son las características de crecimiento de la bacteria *E. coli* en cuanto a temperatura, concentración de oxígeno y pH?
5. ¿Qué métodos de esterilización se utilizaron para la preparación de los materiales del práctico?
6. ¿Qué métodos de esterilización se emplearon durante el práctico?
7. Discuta las ventajas, desventajas y alternativas de cada método de los puntos 5 y 6.
8. Un paciente se presentó con una infección urinaria, y se le prescribió ampicilina para combatirla. Sin embargo, al finalizar el tratamiento vuelve a la consulta porque los síntomas persisten. ¿Cuál es una posible explicación para la persistencia de los síntomas? ¿Cómo debería proceder?

TRABAJO PRÁCTICO N° 14:

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

OBJETIVOS

- Llevar a cabo la hidrólisis del almidón como modelo de reacción enzimática.
- Evaluar el efecto de diferentes factores como la concentración de enzima, la temperatura y el pH sobre la actividad de la enzima amilasa salival humana.

INTRODUCCIÓN

Los principios de la termodinámica nos permiten predecir la espontaneidad con la cual una reacción ocurre, pero no la velocidad con la que ella transcurre. Se ha demostrado la existencia de ciertos compuestos que tienen la propiedad de acelerar los procesos de transformación de reactivos en productos, dichas sustancias son denominadas *catalizadores*, éstos actúan disminuyendo la energía de activación de la reacción. En los seres vivos las reacciones que constituyen el metabolismo celular están catalizadas por *enzimas*, sustancias que sin consumirse aumentan notablemente su velocidad.

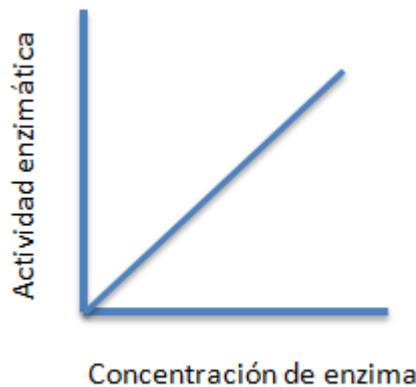
En este tipo de catálisis, la enzima se asocia con la molécula sobre la que actúa (sustrato, S) formando un complejo enzima-sustrato (ES) a partir del cual se formará el producto P, liberándose nuevamente la enzima E sin modificaciones:



La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido en un tiempo determinado. Existen diferentes factores que pueden modificar la actividad de una enzima, por ello, es fundamental mantener constante la composición del medio, la temperatura y definir precisamente las condiciones en las que se realiza el ensayo enzimático.

A. Concentración de la enzima

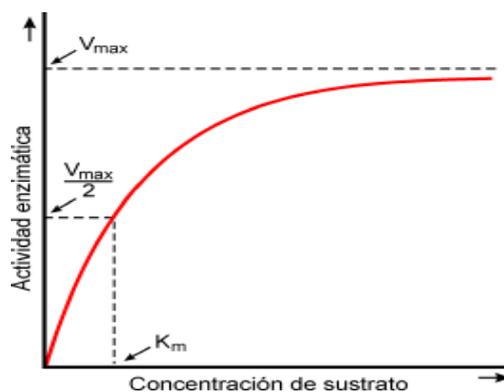
Bajo ciertas condiciones experimentales la velocidad inicial de la reacción varía linealmente con la concentración de enzima y puede ser utilizada para cuantificar la enzima presente. Esta relación se mantendrá si la reacción no se prolonga más allá del tiempo necesario para consumir 5% del sustrato originalmente presente.



B. Concentración del sustrato

Al determinar la actividad enzimática manteniendo constantes la concentración de enzima y las otras condiciones de reacción, y variando la concentración del sustrato, el comportamiento del sistema se describe por medio de una hipérbola.

Cuando la concentración de sustrato es baja (gran parte de las moléculas de enzima se encuentra libre), la actividad aumenta rápidamente con el incremento de concentración de sustrato (S), la actividad enzimática crece en forma lineal con la concentración de sustrato, manteniendo una cinética de primer orden. A medida que aumenta la concentración de sustrato, los incrementos de velocidad son cada vez menores y se llega a una situación donde la actividad no aumenta por más que se incremente la concentración de sustrato (estado en que prácticamente todas las moléculas de enzima están ocupadas por sustrato, es decir, la enzima se ha “saturado”). En este momento, la curva tiende a ser horizontal y corresponde a la velocidad máxima, se comporta con una cinética de orden cero. Si el aumento de concentración de sustrato continúa y excede las concentraciones de enzima, se alcanza un *estado estacionario* en el cual la velocidad de reacción no varía.



En la figura se representa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. Aunque no todas las enzimas presentan dicho comportamiento (como en el caso de enzimas alostéricas), este es el caso más habitual y sencillo; las enzimas que se ajustan a este modelo se conocen con el nombre de enzimas michaelianas.

Velocidad máxima (V_{\max}): solo se alcanza a concentraciones infinitas de sustrato.

Determinación de la V_0 : La velocidad inicial de una reacción enzimática para una determinada cantidad de enzima, depende de la concentración inicial de sustrato y se calcula como la pendiente de la parte lineal de la curva [Producto]/tiempo (en el tiempo cero).

K_m: corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la máxima. En condiciones definidas de pH, temperatura, etc., K_m tiene un valor fijo para cada enzima y sirve para caracterizarla.

La hipérbola de saturación de una enzima por su sustrato puede expresarse con la ecuación deducida por Michaelis-Menten:

(1)

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

V: velocidad inicial con concentración de sustrato igual a [S]
 V_{max}: velocidad máxima
 K_m: constante de Michaelis para el sustrato.

A partir de esta ecuación se deduce que cuando [S] está por debajo del valor de K_m, la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato (porción inicial de la curva en la cual la reacción es de primer orden respecto a [S]).

Cuando la [S] es muy superior al valor de K_m, la velocidad inicial es prácticamente máxima (porción final de la curva, reacción de orden cero).

Si [S] es igual al valor de K_m reemplazando en la ecuación (1):

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$

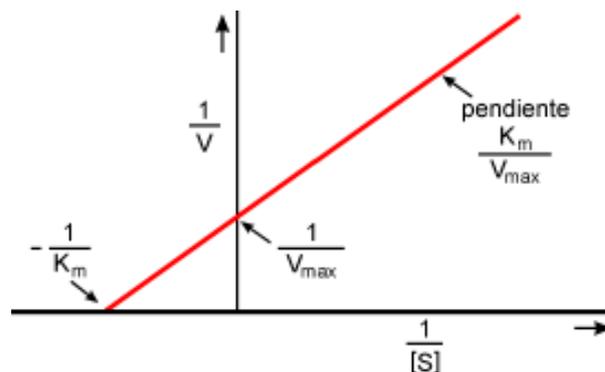
Es decir, cuando la concentración de sustrato es igual a K_m, la velocidad de reacción es igual a la mitad de la máxima.

Si tomamos la inversa de la ecuación (1):

$$(2) \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} =$$

$$= \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

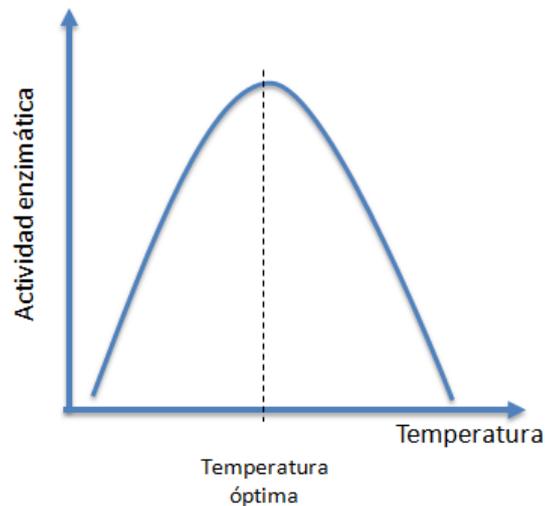
Esta ecuación transformada se denomina Lineweaver-Burk y corresponde a la ecuación de una recta.



La representación de la inversa de la velocidad inicial ($1/v$) en función de la inversa de la concentración de sustrato $[S]$ da una recta. La pendiente de esta recta es iguala K_m/V_{max} , la intersección con el eje vertical corresponde a $1/v$.

C. Temperatura

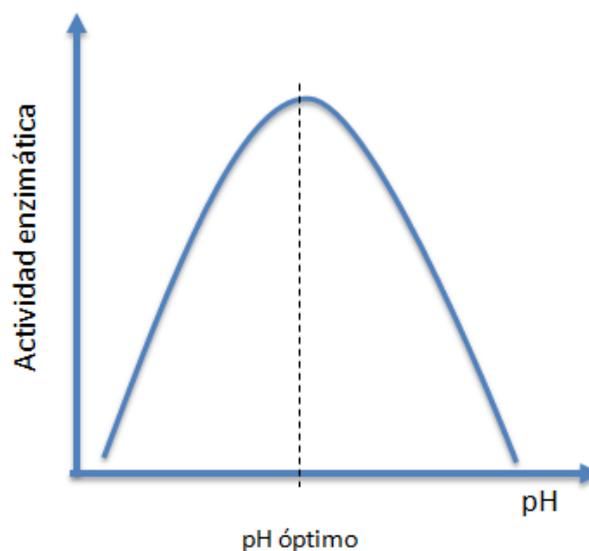
Si se mantienen constantes las concentraciones de enzima y de sustrato y otros factores del medio de reacción y se determina actividad enzimática a diferentes temperaturas, y se grafica en un sistema de coordenadas, se observa el siguiente comportamiento:



Cuando la temperatura asciende, aumenta la velocidad de una reacción química como consecuencia del incremento en la energía cinética. Si bien la actividad enzimática aumenta con la temperatura, se llega a un valor máximo, correspondiente a la temperatura óptima. Por encima de este valor óptimo, la actividad cae rápidamente, ya que la acción del calor sobre la estructura molecular produce la desnaturalización de la enzima.

D. pH

Si se mide actividad enzimática a diferentes pH, manteniendo constantes todos los otros factores, se puede demostrar el efecto de la concentración de hidrogeniones, como se observa en la siguiente figura:



Para la mayoría de las enzimas, la actividad óptima se efectúa entre pH 6 y 8, por debajo o por encima de esos valores, la velocidad de reacción decrece. Los cambios de pH del medio afectan el estado de ionización de grupos funcionales en la molécula de enzima y también en el sustrato. Para la formación del complejo enzima-sustrato es necesario mantener una adecuada distribución de cargas en ambas moléculas. El pH óptimo es aquel en el cual el estado de disociación de los grupos esenciales es el más apropiado para interactuar en el complejo ES. Por otra parte, pH extremos provocan desnaturalización de la molécula enzimática llevando a su inactivación.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

En bioquímica tiene interés la medición de la concentración de enzimas en algunos líquidos biológicos como marcadores de alteraciones en la funcionalidad diversos órganos y tejidos. La amilasa producida en el páncreas exócrino y en las glándulas salivales, escinde los enlaces α 1-4 glucosídicos de los polisacáridos almidón y glucógeno, pero no hidrolizan aquellos situados antes o dos subunidades después de su punto de ramificación.

Normalmente pequeñas cantidades de amilasa originadas principalmente en el páncreas y glándulas salivales están presentes en sangre (hasta 120 Unidades Amilolíticas / dl). Esta enzima se puede encontrar elevada en plasma (hiperamilasemia) y orina (amilasuria) de pacientes con pancreatitis. También es posible encontrar valores aumentados en cualquier caso de abdomen agudo, parotiditis bacterianas y paperas. Por lo tanto la determinación de la actividad de esta enzima en muestras biológicas constituye un valioso medio de diagnóstico en numerosas patologías.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Existen métodos que nos permiten medir tanto la concentración de sustrato consumido como de producto formado en las soluciones en las que se ha dejado actuar una enzima durante un tiempo determinado. En este caso podremos reconocer la acción de la amilasa salival sobre el almidón, estudiando el sustrato que no ha sido hidrolizado, lo cual se hace evidente por la disminución de la formación del complejo almidón-yodo.

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

MATERIALES

Sustrato de la enzima: Solución de Almidón

Enzima: Amilasa salival

Tubos de ensayo

Gradillas

Pipetas

Baño termostático

Hielo

Papel indicador de pH

Lugol

PROCEDIMIENTO

- Recolección de la saliva.

Un voluntario junta saliva (2-3 ml) en un vaso de precipitado pequeño. Se mide el pH de la misma con papel indicador, anotar el valor.

- Dilución óptima y tiempo de referencia.

Enzima: Diluir la saliva 20 veces con agua destilada (0.5 ml de saliva + 9.5 ml de agua destilada) en un tubo de ensayo. Tapar el tubo, mezclar por inversión varias veces y centrifugar a 10.000 g 10 minutos. Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo.

- Cada grupo desarrollará una actividad práctica para evidenciar experimentalmente el efecto de los diversos factores que afectan la actividad enzimática.

A) Determinación de la actividad enzimática en función de la temperatura.

- 1) Tomar 4 tubos de ensayo y colocar 1 ml de solución de almidón al 1 %.
- 2) Tomar 3 tubos de ensayo y colocar 1 ml de la saliva diluida.
- 3) Poner un tubo con la saliva y un tubo con almidón en:
 - hielo (0° C)
 - 37° C
 - 70° C
- 4) Esperar 5 minutos a que tomen la temperatura deseada.
- 5) Trasvasar 1 ml de saliva diluida al tubo con el almidón (utilizar la solución de saliva que estaba incubada a la misma temperatura). Mezclar.
- 5) Dejar transcurrir la reacción durante 5 minutos.
- 6) Interrumpir la reacción agregando cinco gotas de la solución de yodo.
- 7) El tubo número cuatro se utilizará como blanco, por lo cual **no deberá agregarse saliva**, sólo contiene almidón más 5 gotas de lugol.

Tubo	Temperatura	Color observado
1		
2		
3		
4		

- 8) Discuta los resultados obtenidos.
- 9) Compare el comportamiento obtenido con el esperado.

RESULTADOS: _____

B) Determinación de la actividad enzimática en función del pH.

- 1) Colocar en 4 tubos de ensayo 0,5 mL de saliva diluida.
- 2) Agregar a cada tubo 0,5 mL de agua.
- 3) Ajustar el pH de la solución de saliva de acuerdo con la siguiente tabla:

Tubos	pH	Solución	Número de gotas
1	7	agua	2
2	3	HCl 1M	2
3	8	NaOH 0,1M	4
4	10	NaOH 1M	1

- 4) Incubar durante 5 minutos.
- 5) Agregar 1 ml de la solución de almidón, mezclar bien e incubar a 37°C 5 minutos.
- 6) Interrumpir la reacción agregando cinco gotas de la solución de yodo.
- 7) Finalmente preparar el tubo de ensayo número 5 que contenga 1 ml de agua + 1 ml de almidón y agregarle 5 gotas de lugol.

Tubo	pH	Color observado
1		
2		
3		
4		
5		

- 8) Discuta los resultados obtenidos.
- 9) Compare el comportamiento obtenido con el esperado.

RESULTADOS: _____

C) Determinación de la actividad enzimática en función de la concentración de enzima.

- 1) Colocar en los tubos los siguientes reactivos:

Tubo	1	2	3	4	5
Saliva	0 ml	10 ul	50 ul	125 ul	250 ul
Almidón	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Agua	4 ml	4 ml	4 ml	3,87 ml	3,75 ml

- 2) Incubar los tubos 5 minutos a 37° C y agregar a cada tubo 10 gotas de yodo.

Tubo	Color observado
1	
2	
3	
4	
5	

3) Discuta los resultados obtenidos.

4) Compare el comportamiento obtenido con el esperado.

RESULTADOS: _____

De acuerdo a lo aprendido en el práctico:

¿Por qué los alimentos se conservan en la heladera?

Si bien se conservan en la heladera, ¿Por qué se pudren eventualmente?