



PRÁCTICAS DE



Bioquímica

13ª Edición

Prácticas de bioquímica



Dirección General de Asuntos
del Personal Académico

Autores

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

Investigadora en Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación DEPEI. Facultad de Odontología UNAM.

María del Mar Josefina Becerril Román.

Estudiante de la carrera de Química de Alimentos.

Ricardo Ortiz Sánchez.

Coordinador de Diseño de software multimedia, asesor de la Sala de realidad Virtual de la Facultad de odontología. Asesor en técnicas de visualización 3D, Tecnología 3D Aplicada a la educación Odontológica. Participado en diversas publicaciones.

Diseño de portada

Mtra. Ana Pamela Becerril Román.

Diseñadora Gráfica.

1ª edición. Manual de Prácticas de Bioquímica, noviembre 2002.

13ª edición. Prácticas de Bioquímica, febrero 2016.

© D. R. Universidad Nacional Autónoma de México. Av.
Universidad 3000, Del. Coyoacán, Distrito Federal, C.P. 04510.

Hecho en México

Los autores han citado todo el material fuente utilizado. Si inadvertidamente hubieran omitido alguno, con gusto harán los arreglos necesarios en la primera oportunidad que se les presente para tal fin.

Las ciencias de la salud están en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones y ampliaciones tanto en los marcos teóricos como en los métodos. Los autores han hecho un esfuerzo corroborando que la información presentada sea vigente al momento de la publicación de esta obra; sin embargo en vista de los continuos cambios presentados, ni los autores, ni los editores, ni cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores, omisiones o los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes.

CD_PDF ISBN: 978-607-02-8051-1

En agradecimiento al Programa de Ediciones
electrónicas de libros PAPIIT, PAPIME e
INFOCAB.

Agradecimiento especial a la Dirección General de Asuntos del
Personal Académico **DGAPA**

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	1
REGLAMENTO	3
INTRODUCCIÓN.....	5

CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1.	12
MEDIDAS DE SEGURIDAD.	12
CAPÍTULO 2.	13
MANEJO DE DESECHOS.....	13
CAPÍTULO 3.	16
POTENCIOMETRÍA	16
CAPÍTULO 4.	29
ESPECTROFOTOMETRÍA	29
CAPÍTULO 5.	37
CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS.....	37
CAPÍTULO 6.	40
ELECTROFORESIS	40
CAPÍTULO 7.	47
CENTRIFUGACIÓN.....	47
CAPÍTULO 8.	50
INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	50
CAPÍTULO 9.	54
ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO.....	54
CAPÍTULO 10.....	59
FUNDAMENTOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59

PARTE EXPERIMENTAL

PRÁCTICA I	63
INTRODUCCIÓN AL MÉTODO CIENTÍFICO Y PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	63
PRÁCTICA II	69
PRESENTACIÓN DE EQUIPO	69
PRÁCTICA XI	135
AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS.	135
PRÁCTICA XII	140
DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO	140
ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	140
PRÁCTICA XIII	148

TITULACIÓN DE SALIVA.	148
PRÁCTICA XIV	151
CINÉTICA DE LA LISOZIMA SALIVAL.....	151
PRÁCTICA XV	155
PRUEBA DE SNYDER DE SUSCEPTIBILIDAD A LA CARIES.	155
PRÁCTICA XVI	160
RELACIÓN ENTRE LA CARIES CON LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> PRESENTES EN LA SALIVA	160
PRÁCTICA XVI	168
RELACIÓN ENTRE LA CARIES CON LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> PRESENTES EN LA SALIVA PARTE II	168
PRÁCTICA XVII	171
OPERÓN DE LACTOSA EN <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS</i>	171

ANEXOS

ANEXO I.....	174
REACTIVOS QUÍMICOS.....	174
ANEXO II.....	175
CONCENTRACIÓN COMERCIAL DE ÁCIDOS Y BASES	175
ANEXO III.....	176
PREFIJOS.....	176
ANEXO IV.....	177
FACTORES DE CONVERSIÓN.....	177
ANEXO V	178
TABLA PERIÓDICA DE LOS ELEMENTOS.	178
ANEXO VI.....	179
EXPRESIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE DISOLUCIONES.....	179
ANEXO VII.....	180
DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DEL EDTA.	180
ANEXO VIII.....	181
ALFABETO GRIEGO.....	181
GLOSARIO.....	182

PRESENTACIÓN

La Bioquímica, que es la rama de la ciencia encargada de descifrar los mecanismos esenciales de los seres vivos, tiene, como el resto de las ramas de la ciencia, una fase teórica y una fase práctica. La primera se imparte a través de los textos de la materia y el trabajo coordinado en las aulas escolares. La segunda, que constituye el tema de éste manual, se aprende en los laboratorios, donde el estudiante podrá establecer un contacto íntimo con los fenómenos microscópicos que ha estudiado durante los lapsos iniciales de su formación.

El trabajo en el laboratorio implica una serie de pasos, todos ellos del mayor interés, en los que se irán desentrañando, a través de mediciones exactas, cálculos y observaciones cualitativas y cuantitativas los fenómenos biológicos tan complejos y fascinantes como el metabolismo, la construcción y degradación de moléculas, el funcionamiento de las enzimas y la forma en que se replica y se traduce el material genético.

Todos estos avances de la Bioquímica están basados en el uso del método científico que es una herramienta que permite comprender y analizar el medio ambiente que nos rodea y de esta manera formular teorías. El método científico es una actividad ordenada que consiste en la observación planteamiento de un problema formulación de una hipótesis, experimentación para la comprobación de la hipótesis y una explicación de los resultados de la experimentación que se denomina, teoría.

Este manual de prácticas no está concebido para abarcar en su totalidad los temas que se imparten en un curso avanzado pero tiene como objetivo fundamental proporcionar al estudiante una visión general de los ángulos esenciales de la Bioquímica y su utilidad para analizar problemas clínicos. En cada una de las prácticas se han colocado citas bibliográficas referentes al tema de estudio, a las que deberán recurrir los estudiantes para adiestrarse en el manejo de la literatura original e iniciar una relación fructífera con las fuentes primordiales de la Bibliografía, es necesario subrayar que la Universidad tiene un gran número de Bibliotecas y que si el material bibliográfico que se requiera consultar no se encuentra en la facultad, podrá ser revisado en otras Bibliotecas como la Biblioteca Central, Biblioteca de Facultad de Medicina o las Bibliotecas de los institutos de investigación.

Al principio de cada práctica, el estudiante encontrará una referencia clara del objetivo, de los experimentos que se proponen, así como una breve introducción al tema, los materiales que deberán usarse, el método adecuado para recorrer el camino y una guía elemental sobre la forma de analizar los resultados.

Al concluir la práctica el estudiante elaborará un reporte que será entregado al profesor de laboratorio la semana posterior a la realización. El reporte deberá contener el Título de la práctica, objetivo, cálculos y resultados, discusión, conclusión y bibliografía.

Finalmente es necesario subrayar que el manual tiene como aspiración fundamental proporcionar al estudiante información básica sobre la importancia creciente de la Bioquímica en relación con los análisis clínicos y el conocimiento de los procesos químicos que determinan el origen, el desarrollo y el mantenimiento de la vida.

Por último es importante señalar que si los estudiantes desean asesoría o tiene dudas de cómo reportar los resultados podrán consultar a sus profesores en los horarios de clase o bien a:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado Facultad de Odontología.

Tel. 56 22 55 54.

REGLAMENTO

1. Se deberá usar bata Blanca abotonada.
2. Prohibido consumir alimentos o fumar dentro del laboratorio S-1
3. Todo material prestado deberá ser entregado sin daño
4. Todo material dañado o extraviado deberá ser repuesto por el alumno responsable en usarlo.
5. El material será entregado al llenar el vale y dejar como depósito la credencial.
6. Se formarán equipos de cuatro integrantes.
7. Dos faltas causan baja.
8. Una semana después de que se haya realizado la práctica se deberá entregar el reporte por equipo.
 - Introducción. 2 puntos.
 - Objetivo e Hipótesis 2 puntos.
 - Resultados, cálculos y gráficas 2 puntos.
 - Discusión 2 puntos.
 - Conclusiones 1 punto.
 - Bibliografía 1 punto.
9. El alumno se presentará a la práctica habiendo estudiado y comprendido lo que va a realizar debido a que antes de comenzar la práctica se realizará examen.
10. Es obligatorio obtener calificación aprobatoria en el laboratorio para poder acreditar la materia. La evaluación consistirá en: 1.- Calificación del reporte de la práctica, 2.- Asistencia, 3.- Participación individual, 4.- Exámenes en cada práctica, 5.- Examen experimental final y 6.- Participación en la sesión de discusión de resultados.
11. La calificación de laboratorio equivale al 30% de la calificación final.
12. El maestro deberá entregar los reportes y exámenes una semana después de haber sido entregados.
13. Usar bitácora de laboratorio, que es el diario de trabajo en donde todas las actividades, cálculos, conclusiones o procedimientos deberán ser reportados, debe ser de papel resistente, poco poroso y absorbente puede ser rayada o cuadrículada,

encuadernada y foliada. Escrita a bolígrafo, no deben usarse abreviaturas y colocar hojas sueltas con anotaciones y con el nombre del propietario. La definición de una bitácora según la Norma Mexicana NMX-AA-005-SCFI-2000 ***“Es el cuaderno de laboratorio debidamente foliado e identificado, en el cual los analistas anotan todos los datos de los procedimientos que siguen en el análisis de una muestra, así como todas las informaciones pertinentes y relevantes a sus trabajo en el laboratorio. Es a partir de dichas bitácoras que los inspectores pueden reconstruir el proceso de análisis de una muestra tiempo después de que se llevó a cabo.”***

INTRODUCCIÓN

El progreso en la ciencia se realiza mediante la observación y experimentación. Este aspecto es particularmente importante en la Bioquímica, que es un área de la ciencia en donde se han realizado prodigiosos avances en las últimas tres décadas gracias al desarrollo de nuevos métodos de estudio y técnicas experimentales.

Este manual de Bioquímica incluye una breve explicación de las técnicas más ampliamente utilizadas en la investigación Bioquímica, a decir la potenciometría, espectrofotometría, centrifugación y electroforesis.

Con la instrumentación de estas técnicas Bioquímicas, se pretende que al terminar el curso, ustedes se introduzcan e interesen en la experimentación que es la base de la Bioquímica. Para la comprensión de las prácticas se requiere que se familiaricen con todos los contenidos teóricos de cada experimento. Todos los experimentos que realizarán contienen una lista de referencias que los auxiliarán en el análisis y elaboración del marco teórico. Comenzaremos por realizar una breve explicación de las técnicas y los procedimientos que deben de realizarse en el laboratorio.

Por otra parte, los sistemas biológicos son procesos complejos que para abordarlos se debe desentrañar un efecto específico entre diferentes organismos, tejidos, tipos celulares, organelos e inclusive entre moléculas. Para cumplir con esta tarea, los bioquímicos deben de simplificar estos sistemas a fin de interpretar y definir los procesos biológicos. Por ejemplo, a partir de un tejido se pueden obtener células que en ocasiones deben romperse para obtener organelos e identificar de esta forma las moléculas involucradas en mecanismos de acción específicos.

Para cumplir con esta tarea, es indispensable dos tipos de conocimientos, el primero consiste en el conocimiento de principios básicos de química como estequiometría, fotometría, centrifugación, potenciometría y cromatografía y en segundo lugar familiarizarse con los conceptos físicos que ayuden en la comprensión Bioquímica. La Bioquímica utiliza unidades como el mol, litro, gramo y las subdivisiones de estos parámetros como milimol, micromol y nanomol. De esta forma el peso molecular puede ser convertido en moles.

El concepto mol se utilizó años después de la muerte de Amadeo Avogadro, quien fue un físico italiano nacido en Turín (1776-1856), y que en el año de 1811 publicó un artículo en la revista *Journal de Physique*, en cuyo contenido propuso que “el volumen de un gas (a presión y temperatura constante) es proporcional al número de átomos o moléculas,

independientemente de la naturaleza del gas". Llegó a esta conclusión después de estudiar la Teoría de Dalton y la Ley de Gay – Lussac.

Dalton, postuló que los elementos en estado gaseoso son monoatómicos. De igual manera, señaló que los átomos de un mismo elemento son iguales entre sí y tienen el mismo peso pero diferentes propiedades. Así mismo, postuló que los átomos al combinarse forman compuestos que guardan relaciones simples. Es preciso señalar que el modelo tenía algunas dificultades ya que concluyó que la fórmula del agua era HO y como consecuencia de esta interpretación, se realizaron cálculos erróneos. Posteriormente en 1805, Gay – Lussac y Alexander von Humboldt demostraron que el agua estaba formada por dos hidrógenos y un oxígeno.

Una década después Amadeo Avogadro, producto de su ingenio, definió que a la combinación de átomos diferentes se les denominaría moléculas y aportó a la humanidad un enunciado que se ha perpetuado para la posteridad y que se conoce como Principio de Avogadro:

“VOLÚMENES IGUALES DE GASES CUALESQUIERA, EN IGUALES CONDICIONES DE PRESIÓN Y TEMPERATURA CONTIENEN EL MISMO NÚMERO DE MOLÉCULAS”

La interpretación de este enunciado se refiere a que un mol de cualquier sustancia cuando es expresado en gramos contiene el mismo número de moléculas, por lo tanto los volúmenes molares de todos los gases deben ser los mismos. De esta forma, se asume que el número de moléculas contenido en un mol es igual al número de Avogadro cuyo valor es: 6.02×10^{23} moléculas. Por lo que un mol es la cantidad de materia que contiene 6.02×10^{23} partículas elementales (átomos, moléculas, iones, partículas subatómicas) y cuando se utiliza el término mol se refiere a 1 mol de átomos; 1 mol de moléculas; 1 mol de iones ó 1 mol de cualquier partícula elemental. Así mismo, un mol no puede medirse contando las partículas, por este motivo, se relacionó mol con otra magnitud de medición que es la masa y de acuerdo al Sistema Internacional de Medidas, el mol es la cantidad de sustancia que contiene tantas entidades (átomos, moléculas, iones) como el número de átomos existentes en 0.012 Kg de carbono puro.

A partir del concepto de mol, surge una forma para expresar concentraciones en solución o disolución. Una solución es una mezcla homogénea de dos componentes que

está formada por el soluto y el solvente. El soluto es el compuesto que está en menor cantidad y es el que se disuelve y puede ser líquido, sólido o gaseoso y el solvente es que se encuentra en mayor cantidad y es el medio en el que disuelve el soluto. Y según su concentración, las soluciones se clasifican en diluidas, concentradas, saturadas y sobresaturadas.

Las unidades de concentración de una disolución se clasifican en unidades físicas y unidades químicas. Las unidades químicas, clasifican a las soluciones en fracción molar, molaridad (M), molalidad (m) y normalidad (N).

Fracción molar: expresa la proporción en que se encuentran los moles de soluto con respecto a los moles totales de solución. Se calcula sumando los moles de soluto y del disolvente. Las fracciones molares son menores a uno y la suma de los componentes dará como resultado 1. Así mismo también se expresa de manera porcentual como se muestra a continuación.

$$\chi_i = \eta_i / \eta < 1 \quad \text{ó} \quad \%_m = \eta_{\text{sol}} / \eta_{\text{disol}} \times 100\%$$

Donde η_{sol} = moles de soluto y η_{disol} = moles de la disolución completa

Molaridad (M): es el número de mol de soluto presentes en litro de disolución.

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{mol de soluto}}{\text{Litro de disolución}} = \frac{\text{gramos}}{\text{Litro}} \times \frac{\text{mol}}{\text{gramos}} = \text{mol/L}$$

Usando la siguiente igualdad:

$$\text{Mol} = \frac{\text{Gramos de átomo o molécula}}{\text{Peso atómico o Peso molecular}}$$

Por ejemplo: la masa atómica del Hierro (Fe) es 55.84 esto significa que un mol de átomos de Hierro equivales 55.84 g.

$$\text{mol Fe} = \frac{55.84 \text{ gramos del átomo o molécula}}{55.84 \text{ Peso atómico o Peso molecular de Fe}} = 1 \text{ mol}$$

Para preparar soluciones molares se establece una relación entre mol de soluto por litro de disolución. El símbolo de molaridad es M.

Una solución molar establece la relación entre una mol de soluto por litro de disolución.

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{Vol. de disolución}}$$

$$M = \frac{n}{V}$$

Donde:

M = molaridad

n = cantidad de sustancia (# moles)

V = volumen (L)

El número de moles es igual $n = w / PM$ donde w= gramos de soluto y PM = peso molecular.

$$M = \frac{w / PM}{V}$$

Por ejemplo ¿Cuántos gramos de cloruro de sodio (NaCl) se requieren para preparar 500 mL a una concentración 5 M? Lo primero que debemos tomar en cuenta es conocer el peso molecular del NaCl. El peso molecular se obtiene de la suma de los pesos atómicos.

El sodio (Na) tiene un peso atómico = 22.99

El cloro (Cl) tiene un peso atómico = + 35.45

Peso molecular (PM) 58.44

$PM = M \times PM \times V$

$PM = 5 \text{ mol/L} \times 58.44 \times 0.5 \text{ lt.} = 146.1 \text{ gr.}$

Este resultado significa que deben de pesarse 146.1 g de cloruro de sodio y aforar has completar 500 mL con agua.

Normalidad (N): es el número de equivalentes de soluto por litro de disolución.

$$\text{Normalidad} = \frac{\text{equivalentes de soluto}}{\text{Litro de disolución}} = \frac{\text{gramos}}{\text{Litro}} \times \frac{\text{mol}}{\text{gramos}} \times \frac{\text{equivalentes}}{\text{mol}} = \text{eq/L}$$

Un equivalente o peso equivalente de una sustancia se puede expresar de la siguiente manera: $\text{Peso equivalente} = (\text{moles de la sustancia} / n)$

Donde n es el número de protones o electrones que la sustancia **cede** o **acepta**, a este proceso de le denomina valencia. En las sustancias en las que intervienen reacciones ácido – base; n es el número de protones (H^+) o hidroxilos (OH^-) que puede ceder. Por ejemplo el ácido sulfúrico (H_2SO_4) $n = 2$ y para el hidróxido de magnesio $\text{Mg}(\text{OH})_2$ $n = 2$. Cuando la cuando la “ n ” es igual a 1 ($n=1$), la normalidad es igual a la molaridad.

La normalidad se define como el número de gramos equivalentes por litro de disolución.

Normalidad (N) = gramos de equivalentes/ volumen de disolución

$$N = w / E \times V$$

Donde:

w = gramos de soluto.

E = masa equivalente.

v = volumen.

$$E = \text{PM} / n$$

n = número de H^+ u OH^- sustituibles por molécula (para ácidos y bases)

Por ejemplo: Calcular la normalidad de 28 gr de ácido sulfúrico en 250 ml. de disolución.

La fórmula del ácido sulfúrico es H_2SO_4 y el peso molecular es igual a 98 gr/mol.

Primero se calcula molaridad

$$M = w / \text{PM} \times v$$

Es decir $M = 28 \text{ gr} / 98 \text{ gr/mol} \times 0.25 \text{ L} = 1.14 \text{ mol/L}$

Para convertirlo a normalidad (N) se debe tomar en cuenta el número de equivalentes como el ácido sulfúrico presenta dos hidrógenos sustituibles entonces

$$N = 2M$$

$$N = 2 (1.14 \text{ mol/L}) = 2.28 \text{ mol/L}$$

molalidad (m) = es el número de moles de soluto por kilogramo de disolvente. Obsérvese que se expresa por kg de DISOLVENTE, y NO de DISOLUCIÓN; como en los casos anteriores.

$$\text{molalidad} = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{kg de DISOLVENTE}} = \frac{\text{gramos} \times \text{mol}}{\text{kg} \quad \text{gramos}} = \text{g/kg disolvente}$$

Por ejemplo: Calcular la molalidad de soluto de 12 g de hidróxido de calcio en 200 g de agua.

Primero para calcular los moles de soluto se realiza la siguiente operación.

$$\text{Peso molecular de Ca (OH)}_2 = 74 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\text{Moles de soluto: } 12 \text{ g} \frac{1 \text{ mol}}{74 \text{ g}} = 0.162 \text{ moles de Ca(OH)}_2$$

Ahora se calcula la molalidad:

$$\text{molalidad (m)} = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{Kg disolvente}} = \frac{0.162 \text{ moles}}{0.2 \text{ Kg}} = 0.81 \text{ g/ Kg}$$

En líneas anteriores se expresaron las disoluciones en unidades químicas. Sin embargo también pueden expresarse en términos de unidades físicas que se expresan en función del peso y el volumen, de manera porcentual y se clasifican en tres grupos:

a) % **peso / peso** = es la cantidad de gramos de soluto en 100 gramos de disolución

$$\% \text{ p/p} = \frac{\text{peso de soluto}}{\text{peso de la disolución}} \times 100$$

b) % **peso / volumen** = es la cantidad de gramos de soluto en 100 mL de disolución.

$$\% \text{ p/v} = \frac{\text{gramos de soluto}}{\text{volumen de disolución}} \times 100$$

c) % **volumen/volumen** = es la cantidad de mililitros de soluto en 100 mL de disolución.

$$\% \text{ v/v} = \frac{\text{volumen de soluto}}{\text{volumen de disolución}} \times 100$$

Ejercicio: Se disuelven 40 g de NaOH en 500 g de agua. Calcula % en masa.

$$\% \text{ NaOH} = \frac{m(\text{g}) \text{ NaOH}}{m(\text{g}) \text{ disolución}} \times 100 \% = \frac{40}{500} \times 100 \% = 8.0 \% \text{ NaOH}$$

Bibliografía:

- 1.- Chang, R. (2010) Química. 10ª edición. McGraw-Hill
2. – Lister, T. (2002) Experimentos de Química Clásica (“The Royal Society of Chemistry”). Editorial Síntesis. Biblioteca de Químicas. 1ª Edición.
- 3.-Gómez M., Matesanz A.I., Sánchez, A. y Souza P. (2005) Laboratorio de Química. 2ª Edición. Ed. UAM.
- 4.- Petrucci R.H., Hawood W.S. (2003) Química general. 8ª edición. Prentice Hall
- 5.- Mercedes Martín y otros. (1994) Programa-Guión de Prácticas de Química. 1ª Edición. Editorial Hespérides.

CAPÍTULO 1.

MEDIDAS DE SEGURIDAD.

Para evitar accidentes de trabajo, es importante considerar que el uso sustancias peligrosas aunado al factor humano es una combinación que puede provocar, accidentes por lo que es necesario respetar las siguientes indicaciones:

1. Mantener el área de trabajo limpia y en orden
2. Vigilar que el lugar de trabajo esté ventilado
3. El cabello deberá estar recogido.
4. Revisar que el material que se vaya a usar esté limpio.
5. Usar barreras de protección personal.
6. Respetar las instrucciones del profesor.
7. En caso de accidente informar el profesor y laboratorista.
8. Colocar los residuos en los frascos señalados para ese propósito.
9. Identificar los reactivos tóxicos en cuanto a su inflamabilidad, reactividad, toxicidad y corrosividad.
 - Residuo Inflamables: líquidos con puntos de inflamación menor a 60°C.
 - Sólidos, líquidos o gases que consumen o liberan oxígeno.
 - Corrosividad: Solución con pH menor a 2.5 o superior a 13.
 - Tóxicos: reactivos como arsenatos, cloroformo, tetracloruro de carbono.
10. Identificar previamente el equipo que se va a utilizar, a modo de estar preparado(a).
11. Y el día de la práctica contar con el equipo de protección adecuado.



FIGURA 1.1 OREJERAS PARA EL USO DEL ULTRASONICADOR.

El ultrasonicador produce ondas sonoras que pueden dañar el tejido del oído, por lo que deben usar orejeras que los protejan.

FIGURA 1.2 USO DE REACTIVOS VOLÁTILES Y PELIGROSOS EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN.

Es un tipo de dispositivo de ventilación local diseñado para limitar la exposición a sustancias peligrosas o nocivas, humos, vapores o polvos.



CAPÍTULO 2.

MANEJO DE DESECHOS

1. **DILUIRLOS** CON EL AGUA DEL GRIFO.
2. **VERTER EN CONTENEDORES ETIQUETADOS** Y CONSERVAR HASTA QUE SEA PROCESADO POR EMPRESAS ESPECIALIZADAS PARA LA TRANSFORMACIÓN DEL COMPUESTO EN UN REACTIVO MENOS PELIGROSO.
3. **RECICLAR:** PARA ESTE PROPÓSITO NO SE DEBEN MEZCLAR LOS REACTIVOS.
4. **LA ETIQUETA** DEL CONTENEDOR DEBERÁ SEÑALAR LAS CARACTERÍSTICAS DEL REACTIVO SI ES INFLAMABLE, TÓXICO Ó CORROSIVO.
5. **RESIDUOS ÁCIDOS:** SE MEZCLAN CON BASES HASTA ALCANZAR LA NEUTRALIDAD.
6. **REACTIVOS DE PLATA:** SE TRATAN PARA RECUPERAR EL METAL.
7. **RESIDUOS FENÓLICOS:** EVITAR LA INHALACIÓN DE LOS VAPORES Y UTILIZAR PROTECCIÓN RESPIRATORIA PROVISTA DE UN FILTRO ADECUADO. EL FENOL SOLIDIFICADO EN BOTELLAS DE VIDRIO DEBERÁ LICUARSE EN BAÑO MARÍA Y SALIFICAR EN SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO O POTASIO. DESPUÉS DEPOSITAR EN BIDONES DE POLIETILENO Y ROTULARLOS PARA SU DESECHO.
8. **BROMURO DE ETIDIO:** DISOLVER EN HIPOCLORITO CONCENTRADO (AGUA LAVANDINA) EN BIDONES DE POLIETILENO DEJAR REACCIONAR POR 24 HORAS Y ELIMINAR POR LA PILETA. O BIEN COLOCAR EN EL BIDÓN CARBONO ACTIVADO EN UNA RELACIÓN DE 300 MG DE CARBONO ACTIVADO POR CADA 100 ML DE TAMPÓN.
9. **OXIDANTES:** TRATAR CON UNA SOLUCIÓN REDUCTORA DE LA MISMA CONCENTRACIÓN Y DEJAR REACCIONAR, VERIFICAR $pH=7$, DILUIR Y VERTER EN DESAGÜE.
10. **PERÓXIDOS:** DILUIRLOS Y REDUCIRLOS PARA EVITAR EXPLOSIONES Y VERTERLOS AL DESAGÜE.
11. **ACRILAMIDA:** INTRODUCIRLO EN UN CONTENEDOR PARA SU POSTERIOR INCINERACIÓN
12. **DERRAMES:**
 - a. **PRODUCTOS SÓLDOS:** DEBERÁN SER RECOGIDOS EN BOLSAS AMARILLAS O BIDÓN DE POLIETILENO, USANDO PALAS PLÁSTICAS Y CEPILLOS DE CERDAS SINTÉTICAS. SE PROCEDERÁ A LIMPIAR EL ÁREA USANDO ELEMENTOS DE PROTECCIÓN.
 - b. **PRODUCTOS LÍQUIDOS:** SE DEBERÁ CONTROLAR EL DERRAME CON ARENA O PAPEL ABSORBENTE COMO TRAJOS O PAPEL Y SE PROCEDE A NEUTRALIZAR EL LÍQUIDO.



FIGURA 2.1 ETIQUETA DE RIESGOS DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS POR EL NATIONAL FIRE PROTECTION ASSOCIATION

EN LA PARTE SUPERIOR SE INDICA EL GRADO DE RIESGO DE INCENDIO DE 0 A 4; EN LA PARTE IZQUIERDA INDICA LOS RIESGOS PARA LA SALUD; A LA DERECHA LA INESTABILIDAD; EN LA PARTE INFERIOR ES LA INFORMACIÓN DESCRIPTIVA DEL PRODUCTO.

MANEJO DE DESECHOS BIOLÓGICOS

PARA EL MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS SE DEBEN SEGUIR LOS PASOS INDICADOS A CONTINUACIÓN:

1. IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS
2. ENVASADO DE LOS RESIDUOS GENERADOS
3. ALMACENAMIENTO TEMPORAL
4. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE EXTERNO.
5. TRATAMIENTO
6. DISPOSICIÓN FINAL.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

DESECHOS DE ACRILAMIDA

- 1.-FAO-OMS (2012) Prevención y reducción de la contaminación de los alimentos y Piensos. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/publications/Booklets/Contaminants/CCCF_2012_ES.pdf
- 2.- Universidad de Concepción. Chile ().
<http://www.udec.cl/matpel/sustanciaspdf/a/ACRILAMIDA.pdf>

DESECHOS DE BROMURO DE ETIDIO

- 1.- Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2.5 A9, Frederick M. Ausubel et al. 2003.
- 2.- Bensaude, O. Ethidium Bromide and Safety- Readers Suggest Alternative Solutions. Trends Genet. 4:89; 1988.
- 3.- Lunn, G.; Sansone, E.B. Decontamination of Ethidium Bromide Spills. Appl. Ind. Hyg. 4: 234-237; 1989.

DESECHOS BIOLÓGICOS

- 1.- GUÍA DE MANEJO DE DE RESIDUOS PELIGROSOS.
http://www.promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/influenza/mat/Guia_manejo_de_residuos_biologicos.pdf

MANUAL:

Manual para el manejo de los residuos peligrosos de tipo química (CRETI)

NORMAS MEXICANAS

www.semarnat.gob.mx/leyes-y-normas/nom-residuos-peligrosos

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los **residuos** peligrosos.

Norma Oficial Mexicana NOM-055-SEMARNAT-2003, Que establece los requisitos que deben reunir los sitios que se destinarán para un confinamiento controlado de **residuos** peligrosos previamente estabilizados
<http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO441.pdf> [recurso electrónico]

CAPÍTULO 3.

POTENCIOMETRÍA

La mayoría de las reacciones químicas que se efectúan en los seres vivos se encuentran significativamente influenciadas por la concentración del ión hidrógeno (protón). El control en la concentración de este ión es tan importante que por este motivo los organismos multicelulares han desarrollado toda una variedad de estrategias y métodos sofisticados para mantener las soluciones corporales con una concentración balanceada del ión hidrógeno.

Existen diversos criterios que permiten diferenciar a un ácido de una base. Los ácidos son sustancias que al reaccionar con metales liberan iones de hidrógeno, neutralizan las soluciones básicas, producen el viraje a rojo del papel tornasol azul, tienen sabor agrio y al contacto con la piel producen escozor. Las bases son resbalosas al tacto, tienen sabor amargo, producen el viraje al azul del papel tornasol rojo, reaccionan con sales metálicas formando hidróxidos y neutralizan las soluciones ácidas. Esta definición aunque es muy práctica no dice nada acerca de la estructura molecular ni de las propiedades particulares de cada una de estas sustancias.

Por este motivo, no fue sino hasta el siglo pasado que el químico Svante August Arrhenius, publicó una teoría sobre electrolitos y utilizó a los ácidos y las bases como referencia. Por este trabajo obtuvo el premio Nobel en 1903 y con las conclusiones obtenidas de sus investigaciones se redefinió el concepto de ácido y base.

A los ácidos los definió como sustancias que al entrar en contacto con el agua incrementan la concentración del ión hidrógeno. Una base es una sustancia que al ser disuelta en agua incrementa la concentración de los iones hidroxilo. Con la teoría de Arrhenius se explicó la conductividad eléctrica de las soluciones ácidas y básicas.

Posteriormente los investigadores Brønsted y Lowry propusieron de forma independiente una nueva definición sobre ácidos y bases. Definieron a los ácidos como sustancias que contienen hidrógeno y que es capaz de donar los protones. Las bases son sustancias que son capaces de aceptar protones.

Los principios de sus teorías serían los siguientes:

- Al reaccionar un ácido con una base se obtiene el par ácido-base conjugado.
- El agua puede actuar como ácido o base.

- Los pares ácido-base se denominan conjugados debido a que por un ácido fuerte hay una base conjugada y por cada base fuerte hay un ácido débil conjugado.
- Los ácidos que ceden un protón se llaman monopróticos.

Finalmente Gilbert Lewis propuso una nueva teoría sobre ácidos y bases sin tomar en cuenta la transferencia de protones, su teoría se basó en el modelo electrónico de valencia según esto define a un ácido como una sustancia que acepta un par de electrones.

Los ácidos y las bases se clasifican en débiles y fuertes dependiendo el grado de ionización, a fin de calcular la concentración del ión hidrógeno en solución, el científico danés Sorensen, mediante un modelo matemático logró deducir la concentración del ión hidrógeno en solución y definió el pH como el logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno.

Una solución 0.01M de HCl tendrá un pH igual a 2.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$\text{pH} = -\log [0.01] = 2$$

Para calcular el pH de una solución 0.01 M de NaOH se realiza un procedimiento distinto, para conocer el pH primero se calcula el pOH.

$$\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$$

$$\text{pOH} = -\log [0.01]$$

$$\text{pOH} = 2$$

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

despejando:

$$\text{pH} = 14 - \text{pOH}$$

$$\text{pH} = 14 - 2 = 12$$

Por tanto el pH de una solución de NaOH 0.01 M será de 12.

En el caso del cálculo de pH para ácidos y bases débiles, que se disocian parcialmente en solución acuosa, se sigue la ecuación de Henderson-Hasselbach.



$$K_a = [H] [A] / [HA]$$

$$\text{Log } K_a = \text{Log } [H] [A] / [HA]$$

$$\text{Log } K_a = \text{Log } [H] + \text{Log } [A] / [HA]$$

$$-\text{Log } [H] = -\text{Log } K_a + \text{Log } [A] / [HA]$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \text{Log } [A] / [HA]$$

La ecuación de Henderson-Hasselbach señala:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \text{Log } [\text{Aceptor de protones}] / [\text{Dador de protones}]$$

Cuando $[A] = [HA]$ el valor de pH es igual a pKa

Donde pKa es el valor de pH en cual se tiene igual concentración del par ácido – base conjugado.

Por ejemplo ¿Cuál será el pH de una solución que contiene 0.125 M de acetato y 0.07 M de ácido acético si el pKa es igual a 4.77?

$$\text{pH} = 4.77 + \log 0.125 / 0.07 = 5.02$$

En líneas anteriores hemos revisado como se calcularía el pH en soluciones, pero en la práctica existen también otras formas de medir el pH una de estas formas consiste en la utilización de moléculas cromóforas que cambian de color en función del valor de pH que presenta una solución, a continuación se enlistan algunos indicadores de pH (Tabla 3.1).

TABLA 3.1 INDICADORES DE pH			
INDICADOR	RANGO DE pH	COLOR ÁCIDO	COLOR BASE
AZUL DE TIMOL	1.2 – 2.8	ROJO	AMARILLO
AZUL DE BROMOFENOL	3.0 – 4.6	AMARILLO	AZUL VIOLETA
VERDE DE BROMOCRESOL	3.8 – 5.4	AMARILLO	AZUL
ROJO DE FENOL	6.4 – 8.0	AMARILLO	ROJO
AZUL DE TIMOL	8.0 – 9.6	AMARILLO	AZUL
PARANITROFENOL	6.2 - 7.5	INCOLORO	AMARILLO

Actualmente los cromóforos se utilizan en papel indicador de pH o como indicador de pH para el crecimiento de microorganismos y células. Si se coloca una gota de la solución sobre el papel pH el color del papel cambiará en respuesta al pH de la solución (Fig. 3.1).



FIGURA 3.1 ESTUCHE DE TIRAS REACTIVAS DE PH

La forma más precisa para la determinación de pH es la que se efectúa con los equipos de medición de pH que reciben la denominación de potenciómetros (Fig. 3.2). Estos instrumentos están compuestos de un electrodo de referencia y un electrómetro que es un equipo capaz de medir pequeñas diferencias de potencial en un circuito de una resistencia extremadamente elevada.

Los electrodos de referencia permiten mantener un potencial eléctrico constante, entre los más comúnmente utilizados se encuentran el electrodo de calomel y el de plata.

Los electrodos consisten en una pieza metálica de plata que está inmersa en una solución de cloruro de potasio (Fig. 3.3).

La potenciometría es un método muy utilizado en el área de la electroanalítica y tiene como propósito determinar la concentración de una especie electroactiva presente en la solución. En términos generales, utiliza un electrodo selectivo que se caracteriza por su alta sensibilidad a la especie electroactiva, se le denomina también como electrodo de membrana. Los electrodos de pH son elaborados de un material de fibra de vidrio y funcionan midiendo la diferencia de potencial a través de un celda electroquímica. El equipo está compuesto de un electrodo de referencia, electrodo indicador y un dispositivo sensible a medir la diferencia de potencial y temperatura. Por lo general, los potenciómetros utilizan circuitos con poca corriente a fin de potenciar la corriente y disipar la baja potencia. Por otra parte, los reostatos, son de mayor tamaño y circulan más corriente y también disipan más potencia. De los diferentes potenciómetros que se han diseñado, los más utilizados son los potenciómetros digitales que constan de un circuito integrado compuesto por un divisor resistivo de $n+1$ resistencias y los puntos n intermedios que está conectados a un multiplexor analógico que selecciona la salida. Se manejan a través de un interfaz en serie y tienen una tolerancia del 20%. La determinación del pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través una membrana de vidrio que separa dos soluciones con diferente concentración de protones. Una celda para medir el pH, que se compone de un par de electrodos, uno de calomel (mercurio, cloruro de mercurio) y el otro de vidrio que se sumerge en la disolución problema a la que se le medirá el valor de pH. La varilla del electrodo es de vidrio común y no conductor. La parte sensible es la que corresponde al bulbo que está formado por vidrio polarizable, el cual se llena de ácido clorhídrico 0.1 N saturado con cloruro de plata. El voltaje en el electrodo es constante con lo cual, mantiene el pH con valor fijo de 7 y de esta forma la diferencia de potencial solo depende del pH del medio externo.

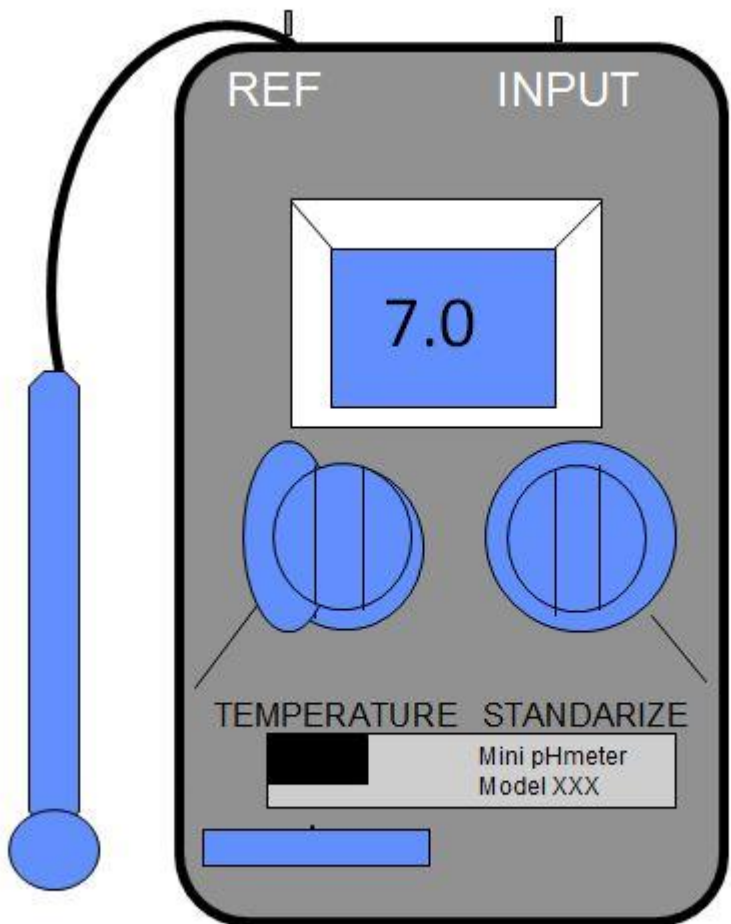


FIGURA 3.2 DIAGRAMA QUE REPRESENTA EL PANEL FRONTAL DE UN POTENCIÓMETRO.

Para el manejo del potenciómetro es necesario su calibración para este propósito se debe introducir el electrodo en una solución de referencia con pH de 4, 7 o 10. Se enciende (OFF → ON) y se ajusta la lectura con el botón de calibración (standarize) hasta que señale el valor de la solución de referencia que se esté determinando. En cuanto queda calibrado, se retira el electrodo de la solución de referencia y se limpia con agua desionizada y se seca. Posteriormente el electrodo se introduce en la solución problema.

Calibración de los Potenciómetros: Los electrodos deben ser calibrados de manera periódica a fin de asegurar la precisión en la toma de lectura y para este propósito diferentes casas comerciales ofrecen amortiguadores para calibración, los más utilizados muestran lecturas de pH de 4, 7 y 10.

Mantenimiento: El electrodo de vidrio es relativamente resistente a las interferencias por color, turbidez, a agentes oxidantes y reductores. Sin embargo, la membrana de vidrio puede afectarse por la presencia de grasa o algún otro tipo de material insoluble, lo que impide que el electrodo haga contacto con la muestra, para lo cual se requerirá de

mayor limpieza. De manera cotidiana se prosigue de la siguiente manera: Enjuagar el electrodo con agua destilada y nunca secarlo con trapo o paño porque lo puede cargar electrostáticamente, por lo que para quitar el exceso de agua se limpia con papel que no libere pelusa. Los electrodos siempre deben de mantenerse humedecidos, es recomendable guardarlos en solución 4M de cloruro de potasio (KCl) o en solución de pH 4 o 7 y nunca se debe guardar el electrodo en agua destilada porque se inactiva.

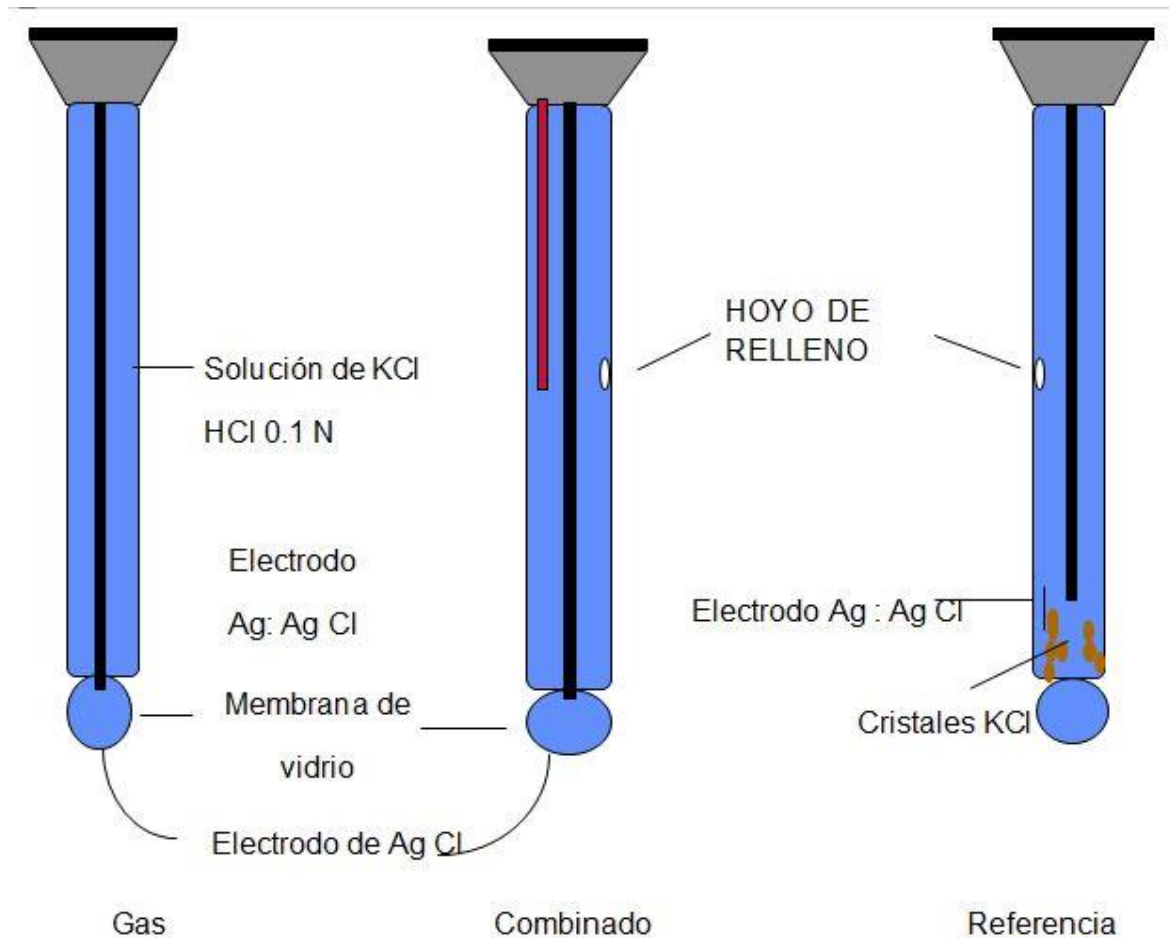


FIGURA 3.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE UN ELECTRODO DE GAS, COMBINADO Y REFERENCIA.

Los electrodos deben ser manejados con un cuidado muy especial sobretodo cuando se sumergen en soluciones enriquecidas en proteínas, que provocan su contaminación y que en ocasiones se remedia el problema lavándolos en soluciones de ácido clorhídrico (HCl) 0.0001 N.

Procedimiento para la calibración de un electrodo: Como mencionamos anteriormente existen soluciones estándar de pH con de valores 4, 7 y 10. Se recomienda la calibración con muestra de referencia pH 4 para soluciones ácidas y muestra de

referencia pH 10 para soluciones alcalinas. El procedimiento consiste en sumergir el electrodo en solución de referencia pH 4 y esperar que se estabilice la lectura o en su defecto hacer la calibración manualmente; enjuagar el electrodo y sumergirlo en solución de referencia pH 7 o 10 y esperar a que se estabilice o hacerlo manualmente. Finalmente, enjuagar el electrodo y sumergirlo en la solución de la que se desea conocer el valor de pH.

Curva de Calibración: Las curvas de calibrado son una representación gráfica del potencial del electrodo (mV) frente a concentraciones (M) conocidas de soluciones patrón de escala logarítmica.

AMORTIGUADORES

“Una disolución amortiguadora o tamponada resiste los cambios de pH cuando se le añaden ácidos o bases o cuando la solución se diluye”. El amortiguador es una mezcla de un ácido y su base conjugada que cuando está en equilibrio el ácido y la base conjugada, la solución presenta un efecto amortiguador significativo. En el área de la Bioquímica existe un interés particular por los sistemas amortiguadores, porque el manejo de las muestras biológicas requiere del control preciso del valor de pH en las diferentes soluciones. Verbigracia, cuando se realizan ensayos de actividad enzimática cambios en pH representan una modificación en la velocidad de reacción de las enzimas. Por otra parte, pacientes con diabetes pueden fallecer por acidosis.

Cuando se mezclan moles idénticos del ácido débil (A) con moles de su base conjugada (B) no se produce reacción por lo que no hay cambio de concentración del par ácido – base conjugado. De acuerdo al principio de Le Chatelier, en el cual se analizan constantes de disociación del par ácido/base conjugado, a saber K_a y K_b . Si consideramos que el ácido débil presenta un pK_a con valor de 4.0 y su base conjugada pK_b valor de 10. Se calcula la fracción de disociación del ácido a concentración de HA 0.01 M, y de acuerdo a este principio se puede establecer el porcentaje de disociación como se muestra a continuación.



$$0.1 - \chi \chi \chi$$

$$\chi / F - \chi = K_a \Rightarrow \chi = 3.1 \times 10^{-3}$$

$$\text{Fracción de disociación} = \alpha = \chi / F = 0.031$$

En estas condiciones solo se disocia el 3.1%

Ecuación de Henderson-Hasselbach

Una forma muy aceptable de mantener el pH *in vitro* es a través del uso de amortiguadores apropiados (Tabla 3.2), la elección de un amortiguador depende de varias características, pero la característica principal consiste en elegir un amortiguador con valor de pK de 0.5 a 1.0 unidades de pH del pH final deseado.

Tabla 3.2 Reactivos comúnmente usados como buffer

Nombre	Estructura	pKa (25 °C)	Masa molar (g/mol)
ÁCIDO FOSFÓRICO		2.15 7.20 12.15	97.99
ÁCIDO BÓRICO		9.24 12.74	61.83
ÁCIDO ACÉTICO		4.76	60.05
ÁCIDO CÍTRICO		3.13 4.76 6.40	192.12
GLICINA		2.34 9.60	75.07
ÁCIDO ASPÁRTICO		1.88 3.65 9.60	133.11
ÁCIDO GLUTÁMICO		2.19 4.25 9.67	147.13
PIPES Ácido piperacín- <i>N,N'</i> -bis(2-etansulfónico)		2.67 6.80	302.37
MOPSO Ácido 3-(<i>N</i> -morfolín)-2-hidroxiopropanosulfónico		6.93	225.26
MOPS Ácido 3-(<i>N</i> -morfolín)propanosulfónico		7.20	209.26
HEPES Ácido <i>N</i> -2-hidroxiethylpiperacina- <i>N'</i> -2-etanosulfónico		7.56	238.30
TRIS Tris(hidroximetil)aminometano		8.06	121.14

Fuente: Harris (2007) Análisis químico cuantitativo

Los ácidos débiles tienen curvas de valoración características.

La valoración consiste en determinar la concentración de un ácido en una disolución determinada. Para cumplir con este propósito se utiliza una base como el hidróxido de sodio (NaOH) cuya concentración se conoce y se adiciona a un ácido de concentración desconocida (fig. 3.4).

El NaOH se adiciona en volúmenes pequeños hasta que el ácido es neutralizado, lo que determina al obtener un valor de pH 7. La representación gráfica del pH de una disolución frente a la cantidad de NaOH añadido se conoce como curva de valoración (fig. 3.5).

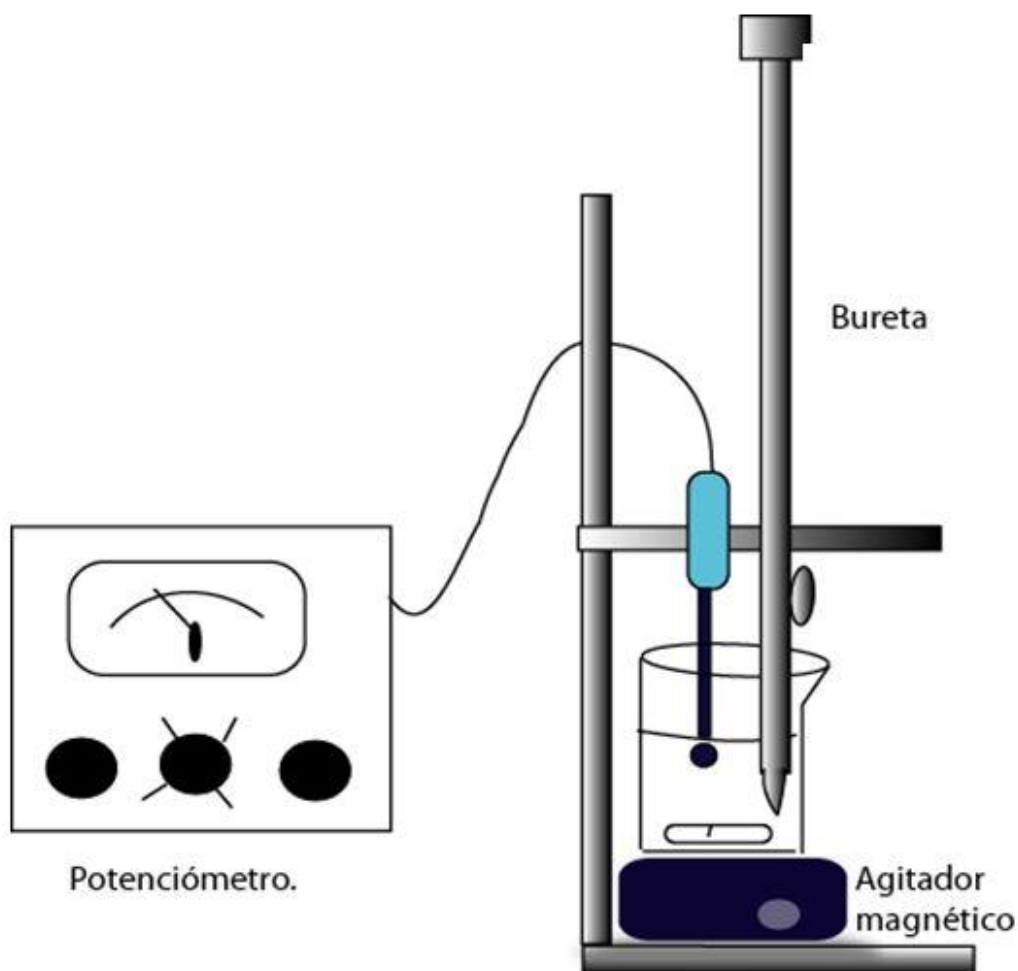


FIGURA 3.4. SISTEMA DE TITULACIÓN

El esquema muestra una solución que se coloca en un sistema de agitación constante junto con la bureta y el electrodo del potenciómetro.

Valoración: es un método de análisis cuantitativo en el que se determina la concentración de un reactivo (analito) a partir de otro reactivo de concentración conocida (Patrón Primario). Durante la valoración se efectúan reacciones de neutralización, precipitación, Redox y de formación de complejos. La reacción que ocurre entre un ácido y una base, se denomina neutralización y el valor de pH que tiene un ácido una base fuerte en la neutralización es 7.

La neutralización es una reacción química entre un ácido y una base para formar una sal y agua.

Por ejemplo:

Se valoraron 50 mL de HCl 0.01 M con NaOH 0.01 M. Realice los cálculos siguientes:

a) Calcular el pH al inicio de la titulación:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$\text{pH} = -\log 0.01$$

$$\text{pH} = 2$$

b) Volumen de NaOH para la neutralización de los 50 mL de HCl.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$\frac{0.01 \text{ moles H}^+}{1000\text{mL}} = \frac{x}{50 \text{ mL}} = 5 \times 10^{-4} \text{ moles de H}^+$$

Usando la misma fórmula que se mencionó anteriormente:

$$\frac{0.01 \text{ moles de OH}^-}{1000 \text{ mL}} = \frac{5 \times 10^{-4} \text{ moles de H}^+}{x} = 50 \text{ mL}$$

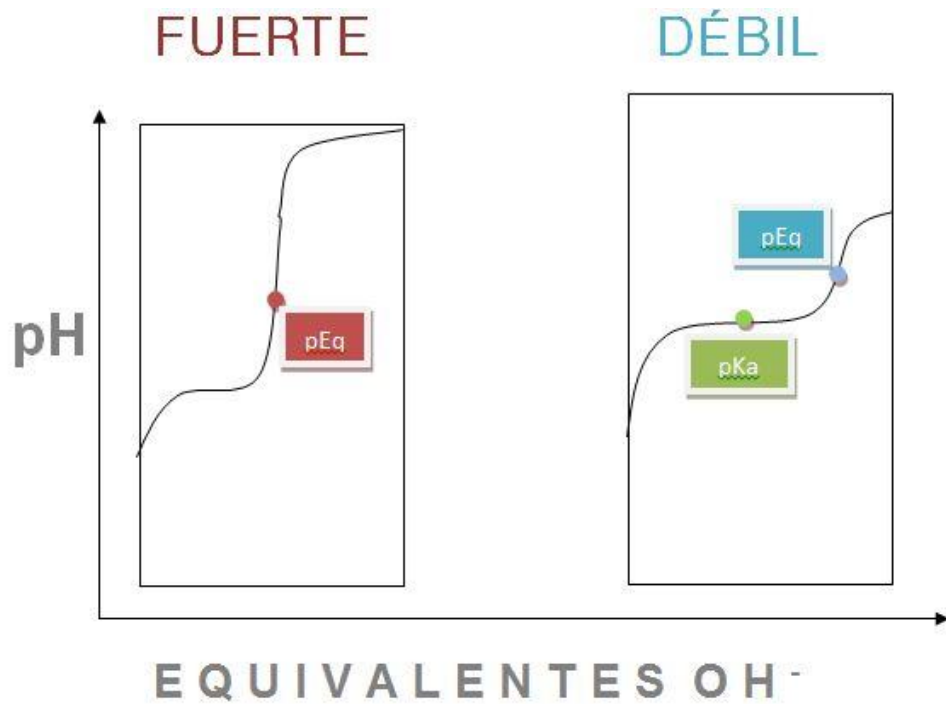


FIGURA 3.5. CURVAS DE TITULACIÓN DE UN ÁCIDO DÉBIL Y UN ÁCIDO FUERTE.

EN EL ESQUEMA SE MUESTRA EL PUNTO DE EQUIVALENCIA (PEQ) DE LA TITULACIÓN DE UN ÁCIDO FUERTE Y UN ÁCIDO DÉBIL. ASÍ MISMO, EN LA TITULACIÓN DEL ÁCIDO DÉBIL SE MUESTRA EL PKA QUE ES EL VALOR DE PH EN QUE SE ENCUENTRA IGUAL CONCENTRACIÓN DEL PARA ÁCIDO-BASE CONJUGADO.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Lehninger. (1986) *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Ed. OMEGA.
2. Lehninger, Nelson, Cox. (1992) *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Ed. OMEGA.
3. Harris. (2007) *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª ed. Madrid: Ed. Reverté.

CAPÍTULO 4.

ESPECTROFOTOMETRÍA

Una característica importante de los compuestos químicos es su coloración. La intensidad de la coloración es ampliamente utilizada en los ensayos bioquímicos. La luz visible que es captada por el ojo humano ocupa una porción restringida del espectro electromagnético que abarca de los 400 a los 800 nm. Para la investigación bioquímica se utiliza tanto el espectro visible como el ultravioleta, este último abarca entre los 10 y 380 nanómetros (nm) (Tabla 4.1). Se denomina espectro electromagnético a la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas. El espectro electromagnético es la radiación electromagnética que emite (espectro de emisión) o absorbe (espectro de absorción) una sustancia cualquiera.

Tabla 4.1 Rangos de longitudes de onda en la región visible.

Color absorbido	Color transmitido	Absortividad (nm)
Violeta	Amarillo verdoso	380 – 450
Azul	Amarillo	450 – 480
Verde azulado	Naranja	480 – 490
Azul verdoso	Rojo	490 – 500
Verde	Púrpura a rojo violeta	500 – 570
Amarillo	Azul	570 – 590
Naranja	Verde azulado	590 – 620
Rojo	Azul verdoso	620 - 780

Para cuantificar las reacciones coloridas se desarrolló un instrumento denominado espectrofotómetro (del latín: *spectrum*; imagen y de la griega *phos o photos*; luz) equipo que es capaz de producir luz monocromática y medir la cantidad de luz absorbida por una muestra. Los espectrofotómetros, utilizan las propiedades de la luz y su interacción con otras sustancias. Están integrados de cinco componentes: fuente luminosa, monocromador, filtro, cámara para la colocación de la muestra, detector y la unidad electrónica para la captura de datos.

El principio básico, considera a la luz como forma de energía electromagnética, que en el vacío tiene una velocidad constante [C] y universal de aproximadamente 3×10^8 m/s. El paso de la luz a través de un medio transparente presentará una velocidad ligeramente menor y se calcula mediante la siguiente ecuación $v_0 = C/n$

Donde

v= velocidad a través del medio por el que pasa la luz.

n = índice de refracción del medio, cuyo valor oscila entre 1.0 y 2.5

La energía electromagnética presenta una amplia gama de longitudes de onda. Algunos ejemplos se describen a continuación.

La luz ultravioleta cubre el intervalo de 10 a 380 nanómetros. El Sol es una importante fuente emisora de rayos en esta frecuencia.

Los rayos X se refieren a una radiación electromagnética, invisible, capaz de atravesar cuerpos opacos y de impresionar las películas fotográficas. La longitud de onda está entre 10 a 0,1 nanómetros, correspondiendo a frecuencias en el rango de 30 a 3.000 PHz (de 50 a 5.000 veces la frecuencia de la luz visible).

La radiación gamma es un tipo de radiación electromagnética producida generalmente por elementos radioactivos o procesos subatómicos como la aniquilación de un par positrón-electrón (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Clasificación de la Energía Electromagnética	
Tipo de energía electromagnética	Intervalo de longitud de onda.
Ondas de radio	De pocos metros a pocos kilómetros
Ondas de radar	De 1 a 10 cm
Infrarrojo lejano	30 000 – 300 000 nm
Infrarrojo medio	3 000 – 20 000 nm
Infrarrojo cercano	789 – 3 000 nm
Luz visible	De 300 a 700 nm
Ultravioleta cercano	200 – 280 nm
Ultravioleta lejano	10 – 200 nm
Rayos X	De 0.1 a 0.5 Å
Rayos Gamma	Aprox. 0.0012 Å

Cuando la luz de cierta longitud de onda pasa de un material a otro, presenta un conjunto de fenómenos físicos, entre los que se encuentran: reflexión, refracción, difracción, absorción, difusión y polarización y para evaluar cada uno de estos fenómenos se han diseñado equipos específicos que tienen la capacidad de analizar diferentes regiones en el espectro luminoso (Fig. 4.1) (Tabla 4.2)

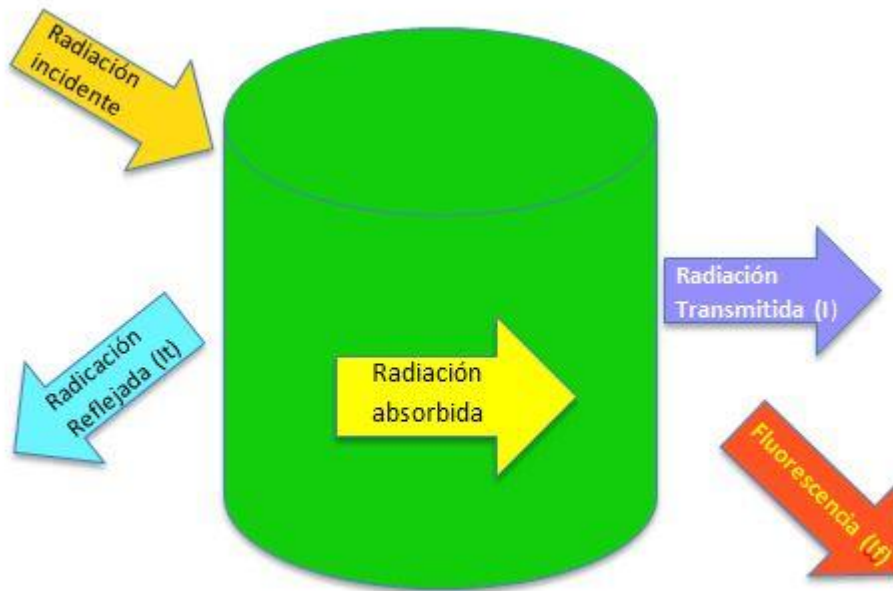


FIGURA 4.1 INTERACCIÓN DE LA LUZ CON LA MATERIA.

Un gran número de métodos bioquímicos requieren del uso de marcos de referencia para calcular las concentraciones de las muestras problema. Estos marcos de referencia tendrán una concentración conocida y de esta forma se podrá determinar la concentración de muestras problema. En el caso de proteínas se realiza curva patrón de suero albúmina de bovino.

La solución estándar se ensaya a diferentes concentraciones con lo que se procede a realizar la reacción colorida. Y se observa que a mayor concentración del estándar habrá una mayor coloración, se realizarán lecturas espectrofotométricas (absorbencia) de cada concentración que se eligió del estándar y se grafica ABS vs. concentración del estándar. Las lecturas obtenidas por los problemas se interpolan en la gráfica.

LEY DE LAMBERT Y BEER.

La ley de Lambert y Beer, explica la relación entre la concentración de la muestra y la intensidad de la luz transmitida a través de la misma. En relación a esta ley están implícitos los conceptos de transmitancia (T) y absorbancia (A) (Fig. 4.2).

La transmitancia [T] es la fracción de luz incidente que a una determinada longitud de onda pasa a través de la muestra y se define de la siguiente manera:

$$T = I_T / I_0$$

Donde:

I_T = intensidad de la radiación transmitida.

I_0 = Intensidad de la radiación incidente.

El porcentaje de Transmitancia [%T] puede expresarse por la siguiente ecuación:

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

La absorbancia [A] (Fig 4.2), se relaciona con la Transmitancia [T] mediante la siguiente ecuación:

$$A = \text{Log}_{10} 1/T = \text{Log}_{10} I_0/I_T = \text{Log}_{10} 10^{\epsilon ct} = \epsilon ct$$



FIGURA 4.2 FENÓMENOS DE ABSORBANCIA Y TRANSMITANCIA

La ley de Lambert y Beer postula que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si conocemos I y α , la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde:

A = absorbancia medida

ϵ = Coeficiente de extinción molar [moles/litro]

l = longitud de la celda (cm)

Ley de Lambert – Beer: Valoración Fotométrica.

Una dilución de sulfato de magnesio [1.0×10^{-4}] M presenta una transmitancia del 50% a una longitud de onda de 540 nm. Midiendo con una celda de 1 cm de paso óptico.

a) ¿Cuál es la absorbancia de la muestra?

b) ¿Qué concentración daría con una transmitancia del 75% en esa celda.

$$A = \epsilon bc$$

$$A = -\log T = -\log 0.5 = 0.301$$

Absorbancia obtenida = 0.301

b) A partir de los datos iniciales se puede calcular la absortividad molar

$$\epsilon = A / bc = 0.301 / 1 \text{ cm} \cdot 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} = 3010.3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Aplicando la Ley de Lambert – Beer, despejar concentración.

$$C = A / b \cdot \epsilon = -\log 0.75 / 1 \text{ cm} \cdot 3010.3 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 4.15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO:

- FUENTE LUMINOSA
- MONOCROMADOR
- PORTADOR DE MUESTRAS
- SISTEMA DETECTOR
- SISTEMA DE LECTURA.

FUENTE LUMINOSA:

VARIÁ SEGÚN EL TIPO DE ESPECTOFOTÓMETRO PERO POR LO GENERAL CONTIENE DOS LÁMPARAS UNA DE TUNGSTENO PARA LUZ VISIBLE Y OTRA DE DEUTERIO PARA LUZ ULTRAVIOLETA. LAS LÁMPARAS SE MONTAN SOBRE UNA BASE QUE PERMITE ASEGURAR LA POSICIÓN Y MANTENER LAS CONDICIONES DE AJUSTE ÓPTICO Y ENFOQUE. LA ENERGÍA RADIANTE ES DE 2 600 A 300 °C

MONOCROMADOR:

DISPONE DE UNA RENDIJA DE ENTRADA QUE LIMITA LA RADIACIÓN LUMÍNICA PRODUCIDA POR LA FUENTE Y DE ESTA FORMA QUEDA CONFINADA A UN ÁREA DETERMINADA, CONSISTE EN UN CONJUNTO DE ESPEJOS QUE PERMITEN PASAR LA LUZ A TRAVÉS DEL SISTEMA ÓPTICO, CONTIENE ADEMÁS UN ELEMENTO PARA SEPARAR LAS LONGITUDES DE ONDA DE LA RADIACIÓN LUMÍNICA, QUE PASA POR UN PRISMA O REJILLA DE DIFRACCIÓN, ASI MISMO, PERMITE ELIMINAR LA DISPERSIÓN NO LINEAL Y SON INSENSIBLES A LOS CAMBIOS DE TEMPERATURA.

PORTADOR DE MUESTRAS:

SOSTIENE A LA MUESTRA QUE SE DESEA ANALIZAR DENTRO DEL RAYO DE LUZ DE LONGITUD DE ONDA DETERMINADA POR EL MONOCROMADOR. EN EL PORTADOR DE MUESTRA SE COLOCA UNA CELDA RECTANGULAR QUE PUEDE SER DE VIDRIO PARA ANÁLISIS DE RANGO DE 340 A 1000 NM O DE CUARZO O SÍLICE PARA RANGO DE 220 A 340 NM. POR CONVENCIÓN LAS CELDAS TIENEN 1 CM DE ANCHO.

SISTEMA DETECTOR:

ESTÁ DISEÑADO DE FOTOCELDA, FOTOTUBOS, FOTODIODOS O FOTOMULTIPLICADORES. SU FUNCIÓN ES RECIBIR LA ENERGÍA LUMÍNICA PROVENIENTE DE LA MUESTRA CONVERTIRLA EN SEÑAL ELÉCTRICA PROPORCIONAL A LA ENERGÍA RECIBIDA.

SISTEMA DE LECTURA:

CUANDO LA LUZ SALE DEL DETECTOR, SE AMPLIFICA Y TRANSFORMA PARA QUE LA INTENSIDAD RESULTE PROPORCIONAL AL PORCENTAJE DE TRANSMITANCIA O ABSORBANCIA. EL SISTEMA PUEDE SER ANALÓGICO O DIGITAL.

CURVA PATRÓN

Es un método analítico utilizado en el análisis químico cuantitativo llamado también como calibración, consiste en la elaboración de una curva de calibración. La cual se representa en forma gráfica y se utiliza para calcular la concentración de una molécula problema en función de la concentración conocida de un analito.

Mide la concentración de una sustancia en una muestra comparándola con una serie de elementos de concentración conocida, es decir, es un marco de referencia que se elabora a partir de cantidades conocidas de una sustancia (por ejemplo la albúmina sérica bovina para cuantificación de proteínas y que se utiliza para determinar la cantidad de proteínas presentes en una muestra incógnita). En determinaciones colorimétricas, se cumple una relación proporcional entre la magnitud o **intensidad de color** que da una reacción y la **cantidad del reactivo** que la provoca. Por ejemplo: Utilizando una mezcla de reactivos en ocasiones la presencia de proteína provoca una tinción de color azul. La cantidad de 10 ug de proteínas desarrolla una tinción color azul pálido cuando es agregada a una mezcla

reactiva, la presencia de 20 ug de proteína dará lugar a que la solución que se torne azul más oscuro y así sucesivamente. La intensidad de color se mide con un espectrofotómetro o colorímetro, en función de los valores de abosorbancia y de las concentraciones crecientes de la sustancia de concentración conocida, con lo que se obtiene una línea recta. Es decir, a mayor cantidad de proteína, mayor cantidad de producto de reacción y por lo tanto, mayor intensidad de color.

La calibración de una curva patrón se realiza siguiendo un modelo de línea recta en donde cada punto del analito de concentración definida está circunscrito a la variable X (variable independiente) y la variable Y (variable dependiente) representa la respuesta del instrumento. La recta está definida por una ordenada al origen (b) y una pendiente (m) y se analiza mediante la ecuación de la recta $y = mx+b$. A fin de que los valores experimentales se ajusten a una recta se utiliza el método de mínimos cuadrados. Este método estadístico consiste en hacer la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental y que la recta del calibrado sea mínima o tienda a cero, como se muestra en la figura 4.3.

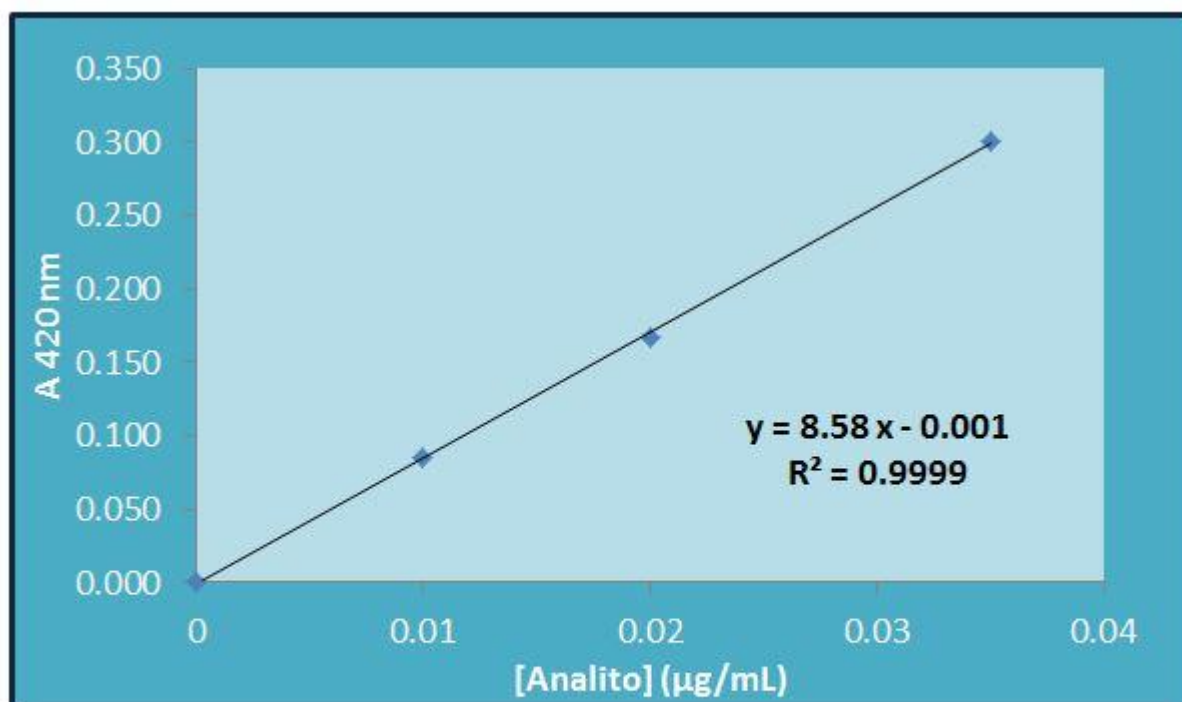


FIGURA 4.3 CURVA PATRÓN DE UN ANALITO DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA.
EN LA FIGURA SE MUESTRA UN GRÁFICO CORRESPONDIENTE A LA CURVA PATRÓN DE UN ANALITO Y
EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

* Nota: En los sistemas analíticos para la realización de una curva de calibración o patrón se requiere como mínimo cinco valores.

Toda curva de calibración debe contener un “blanco” que es la muestra que tiene todos los reactivos y disolventes usados en el ensayo pero sin el **analito**. El blanco mide la respuesta del procedimiento analítico referente a impurezas o especies interferentes que existen en los reactivos o a las características inherentes del instrumento de medida. La medida del blanco se incluye en la recta de calibrado como $x = 0$. Según IUPAC, blanco se define **“como la lectura resultante originada por la matriz, los reactivos o cualquier otra medida residual debida al instrumento o al proceso de medición que contribuye al valor obtenido en el proceso analítico para el mesurando”**. Cabe destacar que independientemente de la técnica instrumental que se utilice los parámetros que deben ser considerados son los siguientes: Linearidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y el intervalo analítico

.

Bibliografía

- 1.- Lobkowicz, F., Melissinos A. (1975) *Physics for Scientists and Engineers*. vol. 2, Philadelphia. W. B. Saunders Company.
- 2.- Harris, D. C. (2007) *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª ed. Capítulo 18. Ed. Reverté.
- 3.- Higson, S. P. J. (2007) *Química Analítica*. 1ª ed. Capítulo 5. Ed. Mc Graw Hill.
- 4.- Martínez Urreaga, J.; Narros Sierra, A.; De La Fuente García-Soto, M.M.; Pozas Requejo, F.; Díaz Lorente, V.M. (2006) *Experimentación en Química General*. Capítulo 5. Ed. Thomson Paraninfo.
- 5.- Hernández-Hernández, L.; González-Pérez, C. (2002) *Introducción al análisis instrumental*. Capítulo 3. Ed. Ariel Ciencia.

CAPÍTULO 5.

CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS

Los primeros experimentos que se realizaron utilizando la técnica de cromatografía fueron realizados por Ismalilov y Shraiber en 1938, como resultado de estas investigaciones lograron separar y caracterizar extractos de plantas medicinales. Estos investigadores rusos consideraban que la técnica de cromatografía se basaba en la división de sustancias en diferentes zonas con la utilización de fragmentos de papel, látex o vidrio impregnados de una sustancia que podría ser la sílica gel o alúmina, esta técnica demostró que se requería de un mínimo de muestra y de poco tiempo para su realización.

Los métodos de separación por cromatografía se basan en fraccionar o separar una sustancia partir de una mezcla de sustancias disueltas en un líquido o solución que se denomina fase móvil la cual se aplicará en una matriz absorbente denominada fase estacionaria. Los componentes de la muestra se distribuyen en el interior de la capa cromatográfica al ser arrastrados por la fase móvil, las especies individuales quedan retenidas en la fase estacionaria en función de la adsorptividad superficial, solubilidad y carga.

Separación cromatográfica.

Se puede clasificar en función de la forma en la que se lleva a cabo y se divide en dos grandes grupos:

- a) Plana que consiste en que la fase estacionaria se coloca en una placa.
- b) Columna la fase estacionaria se coloca en tubo, a través de la cual se hace pasar la fase móvil.

Es importante considerar que las sustancias que componen la fase móvil presentarán un tiempo de retención, que el tiempo que tarda cada sustancia en abandonar el sistema cromatográfico, que efectúa en función de las características moleculares de cada compuesto y de la elución, que es el proceso por el cual todos solutos terminan por abandonar la cromatografía.

En la cromatografía líquida existen dos modalidades que es la fase normal: en donde la fase móvil es no polar y la fase estacionaria es polar (Gel de sílice) y la cromatografía de

fase invertida en la cual la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar (puede ser una cadena hidrocarbonada).

Así mismo en la cromatografía de partición se pueden distinguir según sea la retención de la fase estacionaria y se divide en convencional: cuando la fase estacionaria líquida es retenida por adsorción a un soporte sólido. Y en retención de fases ligadas, en donde la fase estacionaria líquida es retenida por un enlace químico sobre el soporte.

Clasificación de los métodos cromatográficos.

Tipo	Fase estacionaria	Fase móvil	Interacción
Adsorción	Sólido	Líquido – Gas	Fuerzas de Van del Waals
Intercambio iónico	Resina	Líquido	Carga
Exclusión	Gel	Líquido	Tamaño del poro
Afinidad	Sólido	Líquido	Interacción bioquímica
Partición	Líquido	Líquido - Gas	Solubilidad

Entre las matrices estacionarias se encuentran sílica gel que es una sustancia amorfa y porosa. Para la elaboración de la placa como fase inicial debe formarse una suspensión con agua la cual será removida mediante la activación por el calentamiento de la placa entre 100 y 200 grados centígrados con lo que se forma el hidróxido de sílice de un poro determinado. Algunas otras sustancias además de la sílica han sido ampliamente utilizadas como la alúmina y kieselghur.

Para la preparación de la placa existen diversas técnicas como las de vaciado, inmersión, extendido y de spray. Después de la elaboración de la placa se debe someter a secado y activado para que quede en condiciones de ser utilizada.

Aplicación de la muestra: se pueden utilizar micropipetas o microjeringas.

Cámara de cromatografía, por lo general se utilizan de vidrio grueso, para que resistan a solventes agresivos. Las cámaras deben ser saturadas con la solución que servirá de fase móvil.

Para la visualización de las sustancias se utilizan diversos agentes en este caso la identificación de aminoácidos se hará mediante la técnica de la ninhidrina, que es una técnica colorimétrica que se produce como resultado de la interacción de dos moléculas de ninhidrina con el átomo de nitrógeno del aminoácido (Fig. 5.1).

La prolina es el único de los aminoácidos que no presenta el grupo amino libre por lo que produce una coloración amarilla. Toda vez que la ninhidrina ha capturado el grupo amino se produce dióxido de carbono (CO₂) y un aldehído.

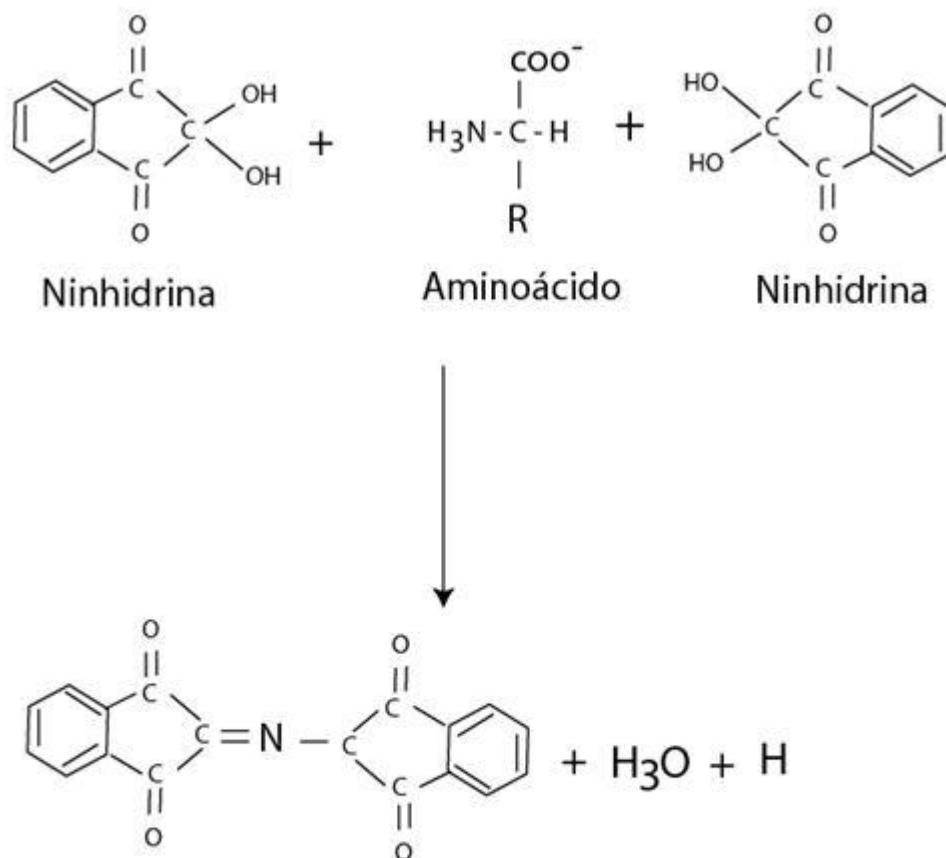


FIGURA 5.1. MECANISMO DE REACCIÓN DE LA NINHIDRINA.

La reacción de la ninhidrina cuantifica la reacción de los aminoácidos del grupo alfa amino, reacciona rápidamente con el grupo amino, lo oxida y libera amonio el cual se condensa con la ninhidrina reducida, y con otra molécula de ninhidrina libre, para producir un aducto púrpura.

Bibliografía.

Méndez Stivalet, J.M.; Santos Santos E. *Química Orgánica*. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial. UNAM. México. 2001.

<http://www.chinasilicagel.es/4-1-column-chromatography-silica-gel.html>[2013-03-17]

CAPÍTULO 6.

ELECTROFORESIS

Las técnicas electroforéticas se utilizan ampliamente en la investigación bioquímica para la caracterización del tamaño o carga eléctrica de macromoléculas y para la determinación de la pureza de las mismas. Este método se basa en el hecho de que las macromoléculas DNA, RNA y proteínas poseen cargas y de esta forma son capaces de moverse en un campo eléctrico.

La tasa de migración o movilidad a través del campo eléctrico depende, de la fuerza de la carga, la carga neta, tamaño y forma de las moléculas, así como también de la fuerza iónica, viscosidad y la temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo. Como herramienta analítica, la electroforesis es simple, rápida y altamente sensitiva.

Técnicas Electroforéticas

Electroforesis capilar en zona o en disolución libre

Método en la que un capilar es recorrido por un electrolito a través de un medio amortiguador ácido (fosfato o citrato) o básico (borato). El flujo electro-osmótico aumenta al aumentar el pH del medio.

Electroforesis capilar electrocinética micelar

Método en que se utiliza un compuesto catiónico o aniónico para formar micelas cargadas, reteniendo compuestos neutros por afinidad hidrofílica-hidrofóbica.

Electroforesis capilar

Método analítico que permite la separación y cuantificación de analitos tan diversos como (iones, péptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, fármacos), consiste en que los grupos silanol de la superficie capilar a pH menor o igual a 3 están ionizados por este motivo la pared capilar tendrá carga negativa. En pared del capilar se formará una capa de cationes que son atraídos por la carga negativa que presenta el capilar y una segunda capa de cationes adyacentes a la capa fina que se distribuyen hasta el centro capilar en donde el número de cationes y aniones son equivalentes. Cuando se aplica un campo eléctrico, los cationes de la capa móvil establecen un flujo neto de migración hacia

el polo negativo, los que genera un flujo electro-osmótico, que se requiere para la migración de la solución amortiguadora. La migración de los analitos está en función de la viscosidad de la solución amortiguador y la constante dieléctrica.

Isoelectroenfoque capilar

Consiste en crear un gradiente de pH lineal en un capilar mediante el tratamiento de la pared con un anfótero. Los compuestos migran y se dirigen al pH que tenga un valor igual a su punto isoeléctrico (carga eléctrica nula). Permite la separación de péptidos con pI con una diferencia de 0.02 unidades de pH.

Electroforesis en gel.

La electroforesis por lo general se realiza en geles que se colocan en tubos o placas de vidrio que están separadas por tiras de teflón de un grosor definido. Los geles pueden utilizarse en forma vertical u horizontal.

En la mayoría de las unidades electroforéticas, el gel es montado entre dos cámaras que contienen los electrodos separados y que se conectan a través una solución amortiguadora.

La electroforesis se desarrolla a partir de la aplicación de dos ecuaciones importantes. La primera es la ley de Ohm ($I = E/R$), en donde la corriente eléctrica (I , amperes) es directamente proporcional al voltaje (E volts) e inversamente proporcional a la resistencia (R , ohms). La segunda enuncia que $P = EI$, en la cual el poder (P , watts), medida de la cantidad de calor producido, es el producto del voltaje y la corriente.

En electroforesis, uno de los siguientes parámetros: eléctrico, corriente, voltaje o poder, deben permanecen constantes. Como la ecuación nos indica, si la resistencia se incrementa durante la corrida, las consecuencias serán las siguientes: en corriente constante, la velocidad será directamente proporcional a la corriente aplicada; la velocidad es mantenida pero se generará calor durante la corrida; a poder constante la velocidad disminuye pero el calor se mantiene constante.

En la actualidad los sistemas de geles están diseñados para mantener constante la corriente o el voltaje. Otra consideración importante es determinar que cualquiera que sea el método elegido, la difusión o la pérdida de la muestra es causada tanto por la presencia de calor como por la prolongación en el tiempo.

Las proteínas son compuestos anfotéricos, que contienen tanto residuos ácidos como básicos. La carga neta está determinada por el pH del medio de disolución lo que ocasiona la ionización de los grupos carboxilo o amino. Por otra parte, los ácidos

nucleicos, a diferencia de las proteínas no son moléculas anfotéricas, pero permanecen negativas debido a que los grupos fosfato que poseen donan protones a valores de pH 7 o en condiciones alcalinas.

Sin embargo, el pH debe ser mantenido de forma constante a fin de conservar la carga y la movilidad de las macromoléculas, por esta razón las soluciones que se utilizan en la electroforesis deben contener amortiguadores.

En cada una de las etapas del proceso de electroforesis la temperatura debe mantenerse constante. Por otra parte, la polimerización de los geles es una reacción exotérmica y si no es regulada pueden formarse irregularidades que afectan la uniformidad del poro. Así mismo, durante la corrida electroforética la temperatura debe permanecer constante, ya que si no se controla, las muestras correrán más velozmente en el centro y más lentamente en los extremos lo que ocasiona un efecto que se conoce como sonrisa. Cuando la temperatura es constante, la separación de la muestra se mantendrá de extremo a extremo, plana.

Por lo general la muestra corre en un soporte compuesto de celulosa, acetato, almidón, agarosa o poliacrilamida. Al final de la corrida la matriz puede ser teñida y usada para su análisis y mantenimiento.

Por otra parte, los geles de agarosa y poliacrilamida, difieren enormemente entre sí, ambos forman matrices porosas, por lo que la dilución que se utilice será crucial para determinar el tamaño del poro. Cuando el poro es grande avanzan con mayor facilidad las moléculas de alto peso molecular y cuando el poro es pequeño avanzan las moléculas de bajo peso molecular.

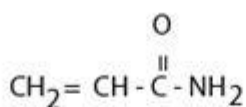
Electroforesis en geles de agarosa.

La agarosa es un polisacárido obtenido del agar, es un polvo que se disuelve en el líquido en ebullición. Permanece en estado líquido hasta que la temperatura baja a unos 40°C. Una vez en estado sólido el gel permanece estable y no se disuelve nuevamente hasta que alcanza temperaturas de superiores a los 100°C. El tamaño del poro se ajusta al variar la concentración de agarosa, alta concentración de agarosa poros más pequeños. Las soluciones de agarosa por lo general se utilizan del 0.4 al 2% p/v. Los geles de agarosa son frágiles por lo que su manipulación debe realizarse con cuidado. La elección del porcentaje está en función del tamaño de la molécula, en altas concentraciones se separan moléculas pequeñas y en baja concentración moléculas grandes.

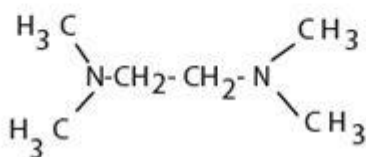
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Para realizar esta técnica con éxito la muestra se coloca en un medio estable que disminuye o elimina convección y que no reacciona con la muestra y que tampoco retarda el movimiento de la muestra. Los geles de poliacrilamida reúnen todas las propiedades señaladas con antelación.

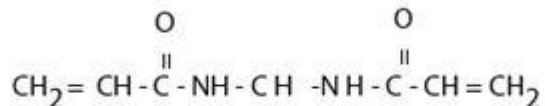
Los compuestos que intervienen en la construcción del gel de acrilamida son: Acrilamida, NN'-metilen-bis acrilamida, TEMED y persulfato de amonio.



ACRILAMIDA



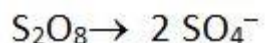
TEMED



N,N'-Metilen-bisacrilamida

FIGURA 6.1 COMPUESTOS UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE GELES DE ACRILAMIDA.

Cuando el persulfato de amonio se disuelve en agua forma radicales libres:



Estos radicales al entrar en contacto con la acrilamida provocan su polimerización como se muestra en la figura 6.2:

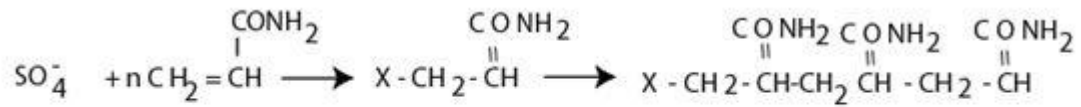


FIGURA 6.2. REACCIONES INVOLUCRADAS EN LA POLIMERIZACIÓN DE LA ACRILAMIDA.

■ Como se muestra en la figura 6.3 el polímero forma cadenas:

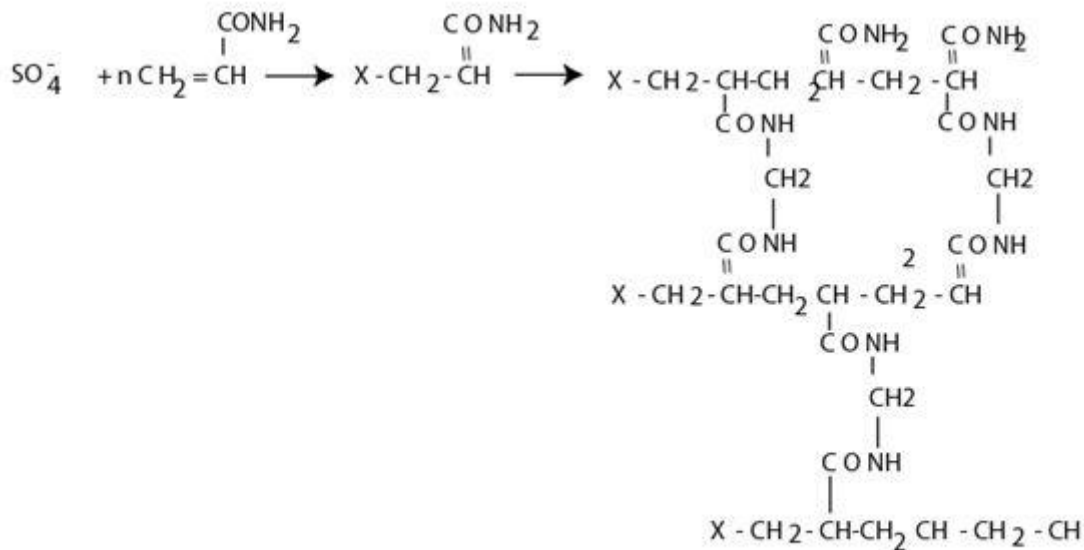


FIGURA 6.3. REACCIONES INVOLUCRADAS EN LA FORMACIÓN DE CADENAS DE ACRILAMIDA.

El grado de entrecruzamiento de la acrilamida depende de la cantidad de volumen de acrilamida adicionada.

Para realizar la electroforesis se requiere solamente dos equipos: 1) Fuente de poder y 2) El sistema de electroforesis que consiste en dos depósitos para el buffer uno inferior para el ánodo y otro superior para el cátodo entre los que se coloca el gel y electrodos de platino para cada depósito de buffer.

Las muestras se aplican en presencia de un colorante de bajo peso molecular (por lo general se utiliza el azul de bromofenol) que permite visualizar la migración de la muestra. Cuando el colorante ha recorrido todo el gel, el sistema se desmonta y el gel queda listo para ser teñido.

Al concluir la corrida los geles pueden ser analizados de varias maneras pueden ser teñidos, transferidos a membranas para ensayos de hibridación DNA/RNA o de proteínas.

Las muestras se mueven del punto de aplicación al borde de la superficie del gel. En los geles que contienen docecil sulfato de sodio (SDS) la migración de las muestras está determinada no por la carga eléctrica intrínseca sino por el peso molecular. El docecil sulfato de sodio es un detergente aniónico que desnaturaliza a las proteínas y les confiere además carga negativa. Esta técnica es muy útil para conocer el peso molecular de las proteínas. Esto se obtiene aplicando el gel un marcador de peso molecular. Se obtendrá una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular y el factor de corrida (Rf). El Rf se obtiene de medir la distancia del punto de aplicación hasta el frente de corrida, esto se realiza para cada una de las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular, lo que permite generar una curva. La curva mostrará el Rf de los estándares de peso molecular contra el Rf. Tal cual se muestra en la figura 6.4 que se presenta a continuación.

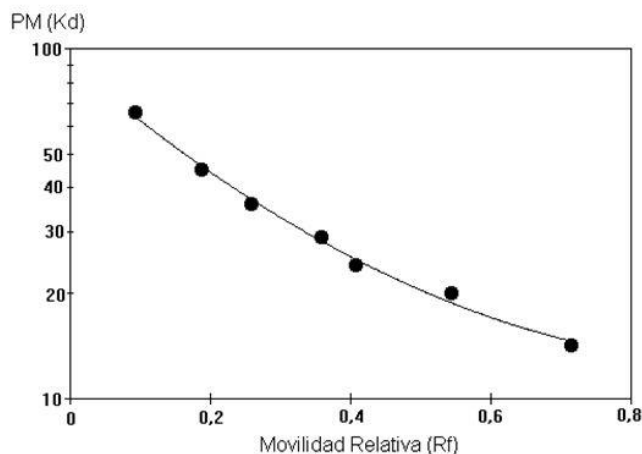


FIGURA 6.4. CURVA ESTÁNDAR DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LOS POLIPÉPTIDOS.
LA CURVA ESTÁNDAR SE GENERA GRAFICANDO EL Rf, DE CADA PROTEÍNA ESTÁNDAR CONTRA EL PESO MOLECULAR.

Bibliografía.

1. Rouessac, F. (2003) *Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. España, McGraw Hill. Págs. 121-133
2. Nelson, D. (2001) *Lehninger Principios de Bioquímica*, 3 ed. España, Omega. Págs. 123-125
3. Wikipedia (2008) *Electrophoresis* en <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis> revisado el viernes 19 de septiembre de 2008.
4. Wikipedia (2008) *Capillary Electrophoresis* en http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis revisado el sábado 20 de septiembre de 2008.

5. Química Orgánica (2008) Aminoácidos: Punto isoeléctrico en <http://www.quimicaorganica.net/quimica-organica/aminoacidos/ph-isoelctrico/aminoacidos-pH-isoelctrico.htm> revisado el viernes 19 de septiembre de 2008.
6. Pontificia Universidad Javeriana (2008) Electroforesis en <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html> revisado el sábado 20 de septiembre de 2008.

CAPÍTULO 7.

CENTRIFUGACIÓN

Una de las técnicas más importantes que ha servido para la separación de los componentes celulares es la centrifugación. La centrifugación tiene el propósito de separar sólidos insolubles (de partículas muy pequeñas difíciles de sedimentar) de una muestra líquida.

Existen infinidad de equipos para realizar la centrifugación, a los que se les denomina centrífugas y que varían en la capacidad de volumen que pueden manejar, abarca de los 0.2 ml. hasta litros y de la magnitud de la fuerza centrífuga. El modelo más sencillo de centrífuga es la que está compuesta de un rotor con perforaciones en donde se coloca el tubo que contiene la muestra y un motor o cronómetro que permite la selección del tiempo y la velocidad.

El principio de la centrifugación se basa en la separación de una muestra a través de la rotación de un objeto en un eje central lo que genera una fuerza denominada centrífuga. Las centrífugas ordinarias operan a rotaciones menores de 10 000 revoluciones por minuto (rpm). Las centrífugas que operan a mayores rpm contienen cámaras refrigeradas y de esta forma se impide que por la fricción con el aire se caliente la muestra.

Tipos de centrifugación.

Centrifugación diferencial: es un método que tiene como principio la diferencia en la densidad de las moléculas. Por lo que moléculas con densidades similares van a presentar sedimentación similar. Es un método preparativo que se utiliza para la separación de componentes dentro de una mezcla como por ejemplo la separación de organelos, núcleos y membranas.

Centrifugación isopícnica: es una técnica en la que las partículas con el mismo

coeficiente de sedimentación se separan por diferencias de densidad, es una técnica muy utilizada en la separación de ácido nucleicos.

Centrifugación zonal: Las partículas se separan por la diferencia en la velocidad de sedimentación a causa de la diferencia de masa de cada una. La muestra se coloca encima de un gradiente de densidad preformado. Por la fuerza centrífuga las partículas sedimentan a distinta velocidad a través del gradiente de densidad según su masa. Se debe tener en cuenta el tiempo de centrifugación ya que si se excede, todas las moléculas podrían sedimentar en el fondo del tubo de ensayo.

Ultracentrifugación: Permite estudiar las características de sedimentación de estructuras subcelulares (lisosomas, ribosomas y microsomas) y biomoléculas. Utiliza rotores (fijos o de columpio) y sistemas de monitoreo. Existen diferentes maneras de monitorear la sedimentación de las partículas en la ultracentrifugación, el más común de ellos mediante luz ultravioleta o interferones.

Durante el manejo de la centrífuga se debe tener cuidado de que :

- Los tubos que se introducen en el rotor de la centrífuga deberán estar en pares con el mismo peso y un enfrente del otro para evitar que no haya desnivel en el peso. Para ajustar el peso lo correcto es utilizar una balanza de 2 brazos y ajustar el peso hasta que sea idéntico.
- El material en donde se deposita la muestra sea el correcto, lo más conveniente es de polipropileno, cuando se utiliza vidrio debe utilizarse un cojinete de hule protector para evitar que se rompa.
- Se debe arrancar gradualmente hasta alcanzar la velocidad requerida.
- Nunca detener la centrífuga de forma manual.

Bibliografía:

- 1.- Harrison, Roger G., Todd, Paul, Rudge, Scott R., Petrides D.P. (2003) *Bioseparations Science and Engineering*. Oxford University Press.
- 2.- Dam, J., Velikovsky, C.A., Mariuzza R.A., et al. *Sedimentation Velocity Analysis of Heterogeneous Protein-Protein Interactions: Lamm Equation Modeling and Sedimentation Coefficient Distributions $c(s)$* . Biophysical Journal, Vol. 89, 2005. pp. 619–634.

CAPÍTULO 8.

INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

La biología molecular es una técnica fundamental en el campo de la investigación biológica y posiblemente se ha convertido en una de las herramientas más poderosas para el desarrollo y la comprensión de las bases que sustentan la vida. Así como para la modificación de especies, lo que ha permitido optimizar el rendimiento y productividad en infinidad de campos como el agrícola y ganadero, consolidando de esta manera, un área nueva en el ámbito de la investigación molecular denominada biotecnología.

De igual manera, la clonación ha aportado información muy valiosa en la identificación de problemas médicos, entre los que se encuentran el cáncer que con el apoyo de técnicas en biología molecular ha sido posible identificar oncogenes o caracterización de mutaciones asociadas con el desarrollo de tumores.

Por otra parte, con la introducción y expresión de genes en células defectuosas, se compensa el daño celular lo que permite la restauración de la actividad normal. Esta estrategia se ha utilizado en el tratamiento de la anemia. Así mismo, la biología molecular se utiliza en la producción de proteínas recombinantes como la insulina, interferon y antibióticos.

En los protocolos que realizaremos en este curso de Bioquímica, se pretende proveer de información básica sobre los procedimientos de aislamiento de plásmidos, insertarlos mediante la técnica de transformación en la bacteria *Escherichia coli* y finalmente se evaluará la expresión de los genes que han sido clonados en el plásmido. Estas actividades las reunimos en tres protocolos de investigación que hemos denominado Aislamiento de plásmidos, Transformación Bacteriana y Expresión de la proteína.

Por lo que de manera muy superficial, hemos de revisar las herramientas y equipos que se requieren para la realización de estos protocolos y mencionaremos algo sobre las medidas de seguridad en el manejo de microorganismos y ácidos nucleicos.

Iniciaremos por revisar las medidas de seguridad que usaremos en el laboratorio que aunque no contamos con toda la infraestructura necesaria, los dispositivos que utilizaremos en el laboratorio son suficientes para lo que pretendemos realizar.

Guantes: Se requieren para protegerse de sustancias químicas irritantes y solventes. Entre los diferentes materiales de los que están elaborados los guantes se encuentran los

realizados a base de neopreno, polivinil y latex, los cuales son adecuados para la protección del uso de ácidos y álcalis diluidos, alcohol, solventes clorinados, cetonas y solo los guantes de neopreno y polivinil protegen del uso de compuestos hidrocarbonados y resinas epóxicas (Fig. 8.1).



FIGURA 8.1 EL USO DE GUANTES ES DE SUMA IMPORTANCIA PARA PROTEGER TUS MANOS Y EVITAR CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS

Luz Ultravioleta: se divide en tres grupos: UV cercana (315 – 400 nm); UV rango medio (280 – 315 nm) y UV extremo (200 – 280 nm). La máxima sensibilidad en humanos es de aproximadamente 280 nm. La exposición directa o indirecta a la luz UV media o lejana puede ocasionar irritación aguda en los ojos seguida de un periodo latente de insensibilidad, después de media a una hora de exposición. Los ojos muestran una sensación arenosa, lagrimeo, sensibilidad a la luz y dificultad en el abrir y cerrar de los ojos. Por lo general los síntomas desaparecen dentro de un periodo de 48 hrs. Sin embargo, los síntomas vienen acompañados de una reducción temporal de la agudeza visual.

La piel también es sensible a la UV, el bronceado provee alguna protección contra exposiciones consecutivas, sin embargo, la luz UV de alcance medio proveniente de la luz solar se considera que es la principal fuente que promueve cambios en la piel y que puede ocasionar cáncer de piel.

En resumen, los ojos y piel deben ser protegidos de la luz UV mediante el uso de lentes o mascarillas diseñados para este propósito.

Para la detección de los ácidos nucleicos unidos a bromuro de etidio, se utilizan fuentes de luz UV ya sea de onda corta o larga. Sin embargo, las lámparas de onda corta ocasionan daños irreversibles en las moléculas de DNA, lo interfiere con clonaciones posteriores.

En la observación de los ácidos nucleicos se utilizan unos aparatos denominados transiluminadores en donde se colocan los geles de agarosa o acrilamida. Estos aparatos funcionan con tres diferentes longitudes de onda entre las que se encuentran 254, 302 y 365 nm. Los transiluminadores de 302 nm se recomiendan para la detección de fragmentos pequeños de DNA sin producir daños.

Fenol: ha sido ampliamente utilizado como desinfectante o germicida. En el siglo XIX se utilizó como antiséptico en cirugías, sin embargo, ocasionaba envenenamiento de los cirujanos y sus asistentes que se exponían a este compuesto. El fenol es un sólido cristalino con un punto de fusión de 41°C. Cuando se oxida adquiere una coloración rosácea. Es un material sumamente tóxico que produce envenenamiento cuando se inhala, ingiere o es absorbido a través de la piel. Entre los efectos ocasionados por su toxicidad se presentan mareos, dolores de cabeza o dificultad al respirar.

Es un compuesto corrosivo que al entrar en contacto con la piel produce un halo blanquecino seguido de una severa quemadura, por sus propiedades anestésicas las quemaduras son insensibles al inicio pero cuando se siente producen quemaduras severas. En caso de que el fenol entre en contacto con la piel deberán utilizarse grandes cantidades de agua.

Cloroformo. Es usado en combinación con el alcohol isoamílico para la extracción de ácidos nucleicos. El cloroformo no es inflamable pero es muy volátil. Es sensible a la luz por lo que debe almacenarse en frascos ámbar. La mezcla de cloroformo con hidrocarburos clorinados puede ocasionar explosiones.

Alcohol isoamílico: también denominado alcohol isopentil, es usado en combinación con el cloroformo para la separación de fases en la extracción de ácidos nucleicos. Presenta un olor desagradable y es miscible en alcohol, benceno y cloroformo. Los vapores son venenosos.

Dietil-pirocarbonato: se utiliza para la inactivación de nucleasas. Es un producto venenoso porque puede formar uretano (un potente carcinógeno) en presencia de amonía.

El dietil-pirocarbonato se descompone rápidamente en etanol y dióxido de carbono cuando se añade al agua pura. Es un compuesto irritante a los ojos, membranas mucosas y la piel.

Compuestos carcinogénicos. Se clasifican en tres categorías. La categoría I incluye a carcinógenos confirmados, se establecen por datos obtenidos en al menos dos especies de mamíferos. Categoría II: contiene compuestos que han sido probados en una especie. Los compuestos carentes de actividad carcinogénica caen en la categoría III.

Es recomendable utilizar ropa de protección y guantes; y se debe identificar el área en la que se manipulan los compuestos tóxicos. Es recomendable utilizar charolas de metal o plástico. Usar protección y llave de seguridad en el uso de mecheros (Fig. 8.2)



FIGURA 8.2 INÓCULO MICROBIANO EN MEDIO SÓLIDO

Bibliografía.

- 1.- Alberts, B., Johnson, D., Lewis, J. et al. (2002) Molecular Biology of the cell 4th Edition. Garland Science. New York.
- 2.- Dole, J. W., y Shantz, M. (2002) From genes to genomes. Concepts and applications of DNA technology. John Wiley & Sons, Ltd.
- 3.- Lander, E. S., et al. (2001) Nature. 409, 860-921.
- 4.- Venter, J. C., et al. (2001) Science. 291,1304-1351.
- 5.- Taillon-Miller, P., Piernot, E. E., y Kwok, P. Y. (1999) Genome Res. 9, 499-505.

CAPÍTULO 9.

ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO

El manejo en la tecnología del DNA, requiere de familiarizarse con una serie de conceptos básicos y de técnicas. Como es la manipulación de *Escherichia coli*, fagos y plásmidos para introducir material genético en una célula.

Escherichia coli es un bacilo que contiene un cromosoma circular de 3 millones de pares de bases y que crece rápidamente en medios mínimos que contienen compuestos de carbono como glucosa, que además de ser la fuente carbonada provee de energía y sales. Sin embargo *Escherichia coli*, crece más rápidamente en medios enriquecidos.

Cuando *E. coli* es inoculado en un medio cultivo líquido, primero entra en una fase que se denomina fase Lag, después del cual la bacteria comienza a dividirse. En medios enriquecidos duplicará su número cada 20 o 30 minutos. Esta fase de crecimiento exponencial se denomina Fase Log. De cualquier forma la densidad celular se incrementará hasta el punto en el que los nutrientes o el oxígeno disminuyen. En este punto, en condiciones normales en un laboratorio, los cultivos alcanzan una densidad de $1-2 \times 10^9$ células/mL y en este punto las células dejan de dividirse rápidamente. En estas condiciones el cultivo está saturado.

Con algunas excepciones derivados de la cepa de *E. coli* K12 son las que se utilizan en las técnicas de DNA recombinante. Los grandes avances en la campo de biología molecular realizados en 1960 provienen de estudios realizados en este microorganismo, en bacteriófagos y en plásmidos.

Por otra parte, los plásmidos bacterianos son frecuentemente utilizados en protocolos de clonación. Estas moléculas de DNA extracromosomal, circular, auto-replicadoras se encuentran naturalmente en *E. coli* y entre sus funciones más importantes se encuentran los que contienen genes que codifican para proteínas que les conferirán resistencia a antibióticos. Por este motivo los plásmidos, son los vectores más comúnmente utilizados en la tecnología del DNA recombinante. Su utilidad se reúne en tres propiedades exclusivas de los plásmidos: replicadores, marcadores selectivos y sitios de clonación.

Los plásmidos pueden ser aislados en grandes cantidades y se introducen en *E. coli* por transformación, por el método de cloruro de calcio, electroporación por choque térmico. Sin embargo cualquiera que sea el método de transformación, se deben emplear células competentes.

A continuación describiré los medios en los que se crecen los microorganismos (medios de cultivo) que contienen el material alimenticio para el desarrollo de los microorganismos y deben ser preparados en condiciones de esterilidad.

Después de que los medios han sido preparados deberán permanecer al menos 16 horas a temperatura ambiente como prueba de esterilidad para posteriormente ser inoculados. Los medios pueden ser líquidos o semisólidos, el agar es el solidificante del medio.



FIGURA 9.1 ALUMNA OBSERVANDO EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN UNA CAJA PETRI QUE CONTIENE MEDIO SÓLIDO (AGAR)

El agar, es un polisacárido de galactosa, sin ramificaciones que se obtiene de la pared celular de microorganismos como las algas rojas de los géneros *Gelidium* o *Euchema*. La palabra agar proviene del malayo y su significado es jalea. Está compuesto por agaropectina y agarosa. Agaropectina contiene derivados ácidos de sulfato y piruvato. Se disuelve en agua caliente y al enfriarse se convierte en un compuesto gelatinoso. El **agar** es el principal agente solidificante utilizado en medios bacteriológicos. Se disuelve completamente a 100°C y se solidifica al enfriarse a 40°C.

Los medios de cultivo se clasifican en tres grandes grupos:

De acuerdo a su consistencia, los medios de cultivo pueden clasificarse en tres grupos:

1. **Líquidos:** Se denominan también caldos de cultivo y no tienen agar en su formulación. Se utilizan para el crecimiento de cultivos puros.
2. **Semisólidos:** contienen aproximadamente agar en un porcentaje del 0.5% en su formulación. En estos medios se realizan estudios de movilidad bacteriana.
3. **Sólidos:** presentan agar a una concentración del 1.5 al 2% en su formulación. En estos medios crecen las células en colonias aisladas y visibles.

De acuerdo a su composición, los medios de cultivo pueden clasificarse en:

1. **Definidos:** es aquél medio de cultivo del cual se conoce su composición exacta. Los **medios mínimos** son medios definidos que únicamente le proporcionan al microorganismo los nutrientes necesarios para crecer, pero no para desarrollarse óptimamente.
2. **Complejos:** es aquél del cual no se conoce la composición exacta del medio. Amenudo, los medios complejos emplean sangre, leche, extracto de levaduras, extracto de cerebro-corazón, extracto de carne u otras sustancias muy nutritivas pero de las cuales se desconoce la composición química exacta. Estos medios son muy utilizados para cultivar bacterias de requerimientos nutricionales muy complejos.

De acuerdo a su función, los medios de cultivo se clasifican como:

1. **Medios selectivos:** Son aquéllos que poseen uno o más componentes añadidos, los cuales inhibirán o prevendrán el crecimiento de ciertos tipos de especies de bacterias y/o promoverán el crecimiento de las especies deseadas. Se pueden ajustar las condiciones físicas de un medio de cultivo como el pH, la temperatura, para hacerlo selectivo para los organismos de interés.
2. **Medios diferenciales:** Permiten al investigador distinguir entre diferentes tipos de bacterias con base en alguna característica observable en su patrón de crecimiento en el medio, ya sea por producción de algún pigmento o por cambios de color en el medio debido a indicadores de pH, o por halos de degradación de algún componente en el medio de cultivo.
3. **Medios enriquecidos:** Se emplean para cultivar microorganismos que requieren un gran número de factores de crecimiento.

Para la preparación de los medios de cultivo se adicionan los ingredientes en agua y colocan en agitación. Posteriormente se colocan en autoclave para su esterilización durante 15 minutos o a 15 lb/in². Dejar enfriar el medio a unos 50°C para la adición de

suplementos adicionales o antibióticos. Si el medio es sólido vaciar de 32 a 40 mil en cajas petri estériles.

Crecimiento en medio líquido.

Para este propósito se transfiere un volumen determinado de medio líquido estéril en tubos de cultivo 16 a 18 mm, se inocula una colonia bacteriana mediante la introducción y agitación de una asa bacteriológica. Se cierra el tubo y se crece a cierta temperatura hasta saturación (aproximadamente 6 h).

El crecimiento debe ser monitoreado, para lo cual se puede realizar el conteo en un hemocitómetro, o bien se puede realizar el seguimiento con un espectrofotómetro hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm. Para calcular la concentración se debe considerar que 0.1 densidad óptica equivale a 10^9 células/mL.



FIGURA 9.2 ESTUDIANTE INOCULANDO UNA CAJA DE 96 POZOS CON MEDIO LÍQUIDO

BIBLIOGRAFÍA.

1. Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (2004) American Society for Microbiolog. pp3.17.10
2. Piau C, Jehan J, Leclercq R, Daurel C. *Catalase negative Staphylococcus aureus strain with point mutations in the katA gene*. J Clin Microbiol 2008; 46:2060-2061.
4. Barrow GI, Feltham RKA, Cowan, Steel's. *Manual for the identification of medical bacteria*. 3 TH Ed. Cambridge. Cambridge University Press, 1993.
5. Gobernado M, López-Hontangas JL. *Identificación bacteriana*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21(Supl2):54-60.
6. Isenberg HD, Ed. (2004) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC. ASM Press.
7. MacFaddin JF, editor. (2000) *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

8. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (2003) *Manual of Clinical Microbiology*. 8TH Ed. WashingtonDC: ASM Press.
9. Prats G, *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, Barcelona 2006.

CAPÍTULO 10.

FUNDAMENTOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Media

En matemáticas y estadística una **media** o **promedio** es una medida de tendencia central que según la Real Academia Española (2001) «[...] resulta al efectuar una serie determinada de operaciones con un conjunto de números y que, en determinadas condiciones, puede representar por sí solo a todo el conjunto». Existen distintos tipos de medias, tales como la media geométrica, la media ponderada y la media armónica aunque en el lenguaje común, el término se refiere generalmente a la media aritmética.

La *media aritmética* es un promedio estándar que a menudo se denomina "promedio".

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Varianza

En teoría de probabilidad, la **varianza** (que suele representarse como σ^2) de una variable aleatoria es una medida de dispersión definida como la esperanza del cuadrado de la desviación de dicha variable respecto a su media.

Si tenemos un conjunto de datos de una misma variable, la varianza se calcula de la siguiente forma:

$$s_n^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i^2 \right) - \bar{X}^2$$

Siendo:

- X_i : cada dato
- n : El número de datos
- \bar{X} : la media aritmética de los datos

Desviación estándar

La **desviación típica** o **desviación estándar** (se expresa con el símbolo σ o s) mide la dispersión para variables de razón (variables cuantitativas o cantidades racionales) y de intervalo. Se calcula como la raíz cuadrada de la varianza de la variable.

En la investigación científica es suficiente tener los datos en su conjunto y las medidas de tendencia central es necesario como es su distribución a partir de la media aritmética, lo que permite conocer como se comportan los datos y poder interpretarlos.

La Desviación Estándar es la raíz cuadrada de la varianza de la distribución de probabilidad discreta:

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Coficiente de variación (C.V.)

Es un análisis que relaciona el tamaño de la media y la variabilidad de la variable. Expresa la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética, mostrando una mejor interpretación porcentual del grado de variabilidad que la desviación estándar. A mayor valor del coeficiente de variación mayor heterogeneidad de los valores de la variable; y a menor C.V., mayor homogeneidad en los valores de la variable.

Se calcula de la siguiente manera:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|}$$

Donde σ es la desviación estándar y se puede es la desviación estándar . Se puede dar en tanto por ciento calculando:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \cdot 100$$

Regresión lineal

En estadística la regresión lineal o ajuste lineal es un método matemático que modela la relación entre una variable dependiente Y y las variables independientes X.

Para poder crear un modelo de regresión lineal es necesario que se cumpla con los siguientes supuestos:

1. Que la relación entre las variables sea lineal.
De acuerdo a la ecuación de la recta: $Y=mx + b$
2. Que los errores en la medición de las variables explicativas sean independientes entre sí.
3. Que los errores tengan varianza constante.
4. Que los errores tengan una esperanza matemática igual a cero (los errores de una misma magnitud y distinto signo son equiprobables).
5. Que el error total sea la suma de todos los errores.

Bibliografía.

1.- Miller, N.J. y Miller, J.C. (2002) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 4 Edición. Prentice Hall.

PARTE EXPERIMENTAL



PRÁCTICA I

INTRODUCCIÓN AL MÉTODO CIENTÍFICO Y PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Objetivos:

- Identificar los pasos para el desarrollo de un protocolo de investigación.
- Determinar los tipos de protocolos que existen y aplicación.

Bibliografía:

- El protocolo de Investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. Ignacio Méndez Ramírez y colaboradores. Ed Trillas. 2000

Introducción:

Por medio de la investigación científica, el hombre ha alcanzado una reconstrucción conceptual del mundo que es cada vez más amplia, profunda y exacta. La ciencia como actividad de investigación, pertenece a la vida social; en cuanto se aplica al mejoramiento de nuestro medio natural y artificial, a la invención y manufactura de bienes materiales y culturales, la ciencia se convierte en tecnología. El método científico no provee de recetas infalibles para encontrar la verdad pero contiene un conjunto de prescripciones falibles (perfectibles) para el planeamiento de observaciones y experimentos, así como para la interpretación de sus resultados y para el planteamiento mismo de los problemas.

Cabe destacar que es importante definir los objetivos a fin de establecer el prototipo de investigación. Se debe establecer el periodo de captura de la información; el fenómeno que va ser estudiado; la comparación entre poblaciones y de acuerdo al fenómeno que se va analizar.

1.- Conseguir información: se clasifica en tres grupos

- a) Retrospectivo: se obtuvo la información con anticipación de forma ajena a la investigación que se va a realizar.
- b) Retrospectivo parcial: cuenta con parte la información y el resto está por obtenerse.
- c) Prospectivo: aún está por obtenerse información.

2.-De acuerdo a la evolución del estudio se clasifica en:

a) Longitudinal: estudio en el que se miden varias veces la variables. Es decir la comparación de variables en diferentes ocasiones.

b) Transversal: se mide en una ocasión o se mide la característica de un grupo en un momento dado.

3.- Comparación entre poblaciones.

a) Descriptivo es un estudio en que se cuenta con una única población y que se estudia en función de las variables.

b) Comparativo es un estudio en que se cuenta con más de una población y se desean comparar variables.

4.- Por la interferencia del investigador.

a) Observacional: el investigador solo puede describir o medir el fenómeno estudiado.

b) Experimental: el investigador modifica una o más variables.

Los estudios experimentales son prospectivo, longitudinal y comparativo. Permite diseñar las variables, permite el cálculo y la comparación de proporción. Una vez definido el problema se elabora un protocolo, se realiza el experimento y se efectúa un reporte de los resultados obtenidos.

Elaboración de Reportes de Investigación

La ciencia tiene el propósito de generar conocimiento a partir de la observación y este conocimiento ha de ser divulgado de forma escrita en reportes científicos. Para este propósito los reportes de investigación deberán ser una práctica cotidiana que permita difundir de forma clara y precisa la síntesis de los resultados de una investigación el contenido básico de la investigación consiste en tres componentes básicos: Título, Estructura de la investigación y Agradecimientos y referencias (Fig. I-1)



Fig I-1 Esqueleto de un Reporte científico.

Título: representa la idea principal del trabajo debe ser redactado de manera clara y precisa, prescindir de abreviaturas, signos de interrogación y debe estar en relación con los objetivos de la investigación.

Resumen de la investigación: es la primera parte del reporte y debe ser tan claro y preciso de tal manera que al lector tenga una idea concisa del contenido de la investigación. Tiene como característica que se escribe a renglón seguido, contiene de 150 a 200 palabras, no se debe utilizar abreviaturas o acrónimos. Puede ser descriptivo, se reporta de manera sencilla el alcance de la investigación y debe contener antecedentes, objetivos, resultados (sin incluir tablas o figuras) y conclusiones.

Palabras Clave: permite identificar el tema del que se trata el estudio, las palabras clave utilizadas deben permitir hacer búsquedas en la base de datos.

Introducción: contiene los antecedentes y objetivos de la investigación, en donde se fundamenta de manera racional el estudio y el propósito de la investigación. Para lo cual debe incluir todas las referencias bibliográficas necesarias a fin de que el lector tenga idea clara sin tener que recurrir a otras fuentes bibliográficas antes de concluir la lectura del reporte.

Hipótesis: deriva del griego “lo que se pone la base de algo” y del latín supposito (suposición). Se puede definir la hipótesis como un intento de explicación o una respuesta

"provisional" a un fenómeno, una forma de predicción que describe de un modo concreto lo que se espera sucederá con determinado objeto de estudio si se cumplen ciertas condiciones.

Materiales y Métodos: en esta sección se incluye información sobre la muestra, recolección de información, procesamiento, análisis de la información.

Resultados: es el reporte de los hechos observados y su análisis. Según los datos obtenidos se apoya de enunciados (3 o menos datos); Figuras (más de 20 datos) y Tablas (4 a 20 datos). Las figuras y tablas se describen y citan en la descripción de los resultados. Se deben incluir análisis estadísticos. Se redactan en tiempo pasado puesto la investigación ya se realizó.

Figuras: incluyen gráficos, fotografías, diagramas. Deben ser fáciles de leer y comprender y comunicar los hechos esenciales. Tablas: es otra forma de presentar resultados, contiene texto y principalmente los resultados de la investigación, se presentan con numeración consecutiva, contener título, encabezado, columna principal, cuerpo y notas de pie.

Discusión: Corresponde a una disertación razonada del contraste de los resultados obtenidos contra los antecedentes bibliográficos (cuerpo de conocimiento existente), así como los puntos de vista fundamentados del autor.

Se buscará obtener algunos de los siguientes puntos:

- 1) Alcanzar conclusiones acerca de la hipótesis inicial.
- 2) Comparar las conclusiones con las de otros autores.
- 3) Identificar fuentes de error, sin llegar al extremo de invalidar el propio trabajo.
- 4) Especular acerca de los significados más amplios de las conclusiones obtenidas.
- 5) Identificar los siguientes pasos en la investigación del problema.
- 6) Sugerir mejoras.

Conclusión: Explica de que forma la investigación contribuye al conocimiento científico y resumen los pasos para una investigación futura.

Referencias Bibliográficas: se deben colocar cada vez que utilice información de un trabajo previamente publicado, se **debe** reconocer la fuente. Así mismo cualquier información que no pertenezca a su experimento y no sea “común de conocimientos” debe ser reconocida por una citación. La presentación de las referencias puede ser estilo Harvard o Vancouver.

Estilo Harvard: Utiliza el nombre del autor y la fecha de publicación en el cuerpo del texto, y la bibliografía se da alfabéticamente por autor

- Aceves, A.B. (2013a) Título del artículo: subtítulo. Título de la revista 46 (Supl. 2), 617-619
- Aldama, A.B. (2000b) Título del libro. Editorial, New York.
- Bracamontes, C.D., Ortega, C.A., Bárcenas, S.T. et al. (2015) Título del artículo. Título de la revista, volumen, páginas.

Estilo Vancouver: utiliza una serie de números para indicar las referencias, se listan en orden numérico de acuerdo a como aparecen en el texto:

1. Zaragoza, A.B. (1983) Título del artículo: subtítulo. Título de la revista 46 (Supl. 2), 617-619.
2. Gutiérrez, D.E. (2000) Título del capítulo. En: Arnold, J.R. & Davies, G.H.B. (eds.) Título del libro, 3ra ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 32-68.
3. Aguilar, W.P., Fernández, M.A., Jiménez, D.L. et al. (1999) Título del artículo. Título de la revista volumen, páginas.

Material:

Artículos científicos

Libros de metodología de la investigación

Procedimiento:

Se recopilará la información sobre un posible protocolo de investigación y se realizarán todos los pasos para el desarrollo del mismo utilizando los artículos científicos y libros de investigación.



Resultados:

1. Desarrollar la hipótesis del protocolo.
2. Determinar el tipo de estudio que se está realizando en la práctica y establecer porque es el más indicado.
3. Elaborar un protocolo de investigación con todos los pasos y lineamientos científicos.
4. Establecer la importancia del conocimiento del método científico, y de los protocolos de investigación.

PRÁCTICA II

PRESENTACIÓN DE EQUIPO

Objetivo:

- Introducir al estudiante en el manejo de equipo de laboratorio.
- Presentar a los estudiantes el equipo con el que trabajarán para desarrollar las prácticas que se muestran a continuación.

Bibliografía:

Harris, D.C. 2007. Análisis químico Cuantitativo. Editorial Reverte , 3ª Edición.

Skoog, A.D., D.M. West y F.J. Höller. 1995. Química Analítica. 6ª Ed, Mc Graw-Hill. Interamericana de México, SA de CV. México .

Introducción:

Una característica importante en la investigación científica es contar con técnicas satisfactorias ya que sin duda alguna, el progreso en la ciencia se ha realizado de forma paralela a los avances tecnológicos. En ocasiones la experimentación se dificulta por falta de comprensión del material y equipo de trabajo.

La Bioquímica aborda procedimientos sencillos que requieren de material y equipo básico por lo que se abordará sobre el equipo e instrumental indispensable. Y para su uso el analista deberá realizar un manejo seguro y ético.

Para este propósito es indispensable el uso de lentes de seguridad con protectores laterales (Fig II-1).



Fig. II.1 Lentes de seguridad con protectores laterales que se deben utilizar siempre en el laboratorio, con la finalidad de proteger los ojos de impacto por vidrios, líquidos y no se recomienda su uso ante materiales corrosivos.

De igual manera, se recomienda usar bata de laboratorio y abotonarla y emplear guantes (Fig. II.2)



Fig. II.1 Equipo de protección personal

Balanzas.

Entre los equipos de laboratorio más ampliamente utilizados se encuentran las balanzas electrónicas que constan de un electroimán que permite equilibrar la carga depositada. Varían en cuanto a sensibilidad van de 100 a 200 gramos hasta de 0.0001 a 0.1 mg. El procedimiento para su uso consiste colocar un recipiente limpio que se lleva a carga cero con el dispositivo de TARA y posteriormente se procede a colocar en el recipiente el reactivo para obtener su masa. Nunca se debe depositar ningún reactivo sobre el platillo.



Fig. II.2 Balanza analítica

Bureta

Es un tubo de vidrio fabricado con precisión que mide volúmenes vertiendo el líquido bajo el control de una llave que se encuentra en la parte inferior. La numeración aumenta de arriba hacia abajo y la marca de 0.0 mL se encuentra en el extremo superior (Fig. II.3). Las buretas clase A son las más exactas y cumplen con altos niveles de tolerancia de ± 0.05 mL y están certificadas por el fabricante.

Para leer el nivel de líquido en una bureta, el ojo debe estar a la misma altura porque si no se está al mismo nivel se produce un error de paralaje, es decir si el ojo está por encima de la lectura el líquido parece estar más alto y cuando el ojo está por debajo el líquido parece estar más bajo.

Cuando se deposita el líquido en la bureta se produce un menisco cóncavo. Las divisiones de la bureta tienen un grosor no despreciable que es equivalente a 0.02 mL. La llave de la bureta se debe abrir con cuidado a fin de tener control del volumen liberado:



Fig. II.3 Bureta de 50 mL.

Esta bureta tiene divisiones de 0.1 mL por lo que la lectura se estima en 0.01 mL.

El líquido debe fluir continuamente. Sin embargo, la tendencia de un líquido sobre el vidrio es a adherirse formando pequeñas gotas, en caso de quedarse las gotas atrapadas en el cristal se debe lavar cuidadosamente con un detergente y un cepillo destinado para ese propósito. Para limpieza más exhaustiva se recomienda el uso de una solución partes iguales ácido sulfúrico-peróxido disulfato, solución que debe manejarse con cuidado porque es corrosiva cuando entra en contacto con la piel o la ropa. No es recomendable el uso de hidróxido de sodio porque una solución al 5% a 95°C disuelve el material Pyrex a una velocidad de 9 $\mu\text{m}/\text{hora}$.

Toda vez que se vertido líquido para realizar la titulación, es importante observar que no queden burbujas atrapadas en la punta de la bureta, por lo que deben eliminar abriendo la llave y posteriormente se debe llenar nuevamente la bureta hasta la marca 0.0 mL (Fig II.3).



Fig. II.4 Funcionamiento de la llave de la bureta

Se sugiere que las buretas se laven con disoluciones nuevas, eliminar las burbujas, verter el líquido con suavidad, cerca del punto final solo verter gotas, leer la parte baja del menisco cóncavo, evitar los errores de paralaje y estimar las rayas de división al hacer la lectura.

Matraz Aforado (volumétrico)

Es un recipiente que está calibrado para contener un volumen conocido de disolución a 20°C, cuando la base del menisco toca el centro de la marca del esmeril o nivel del cuello la solución contiene el volumen deseado.

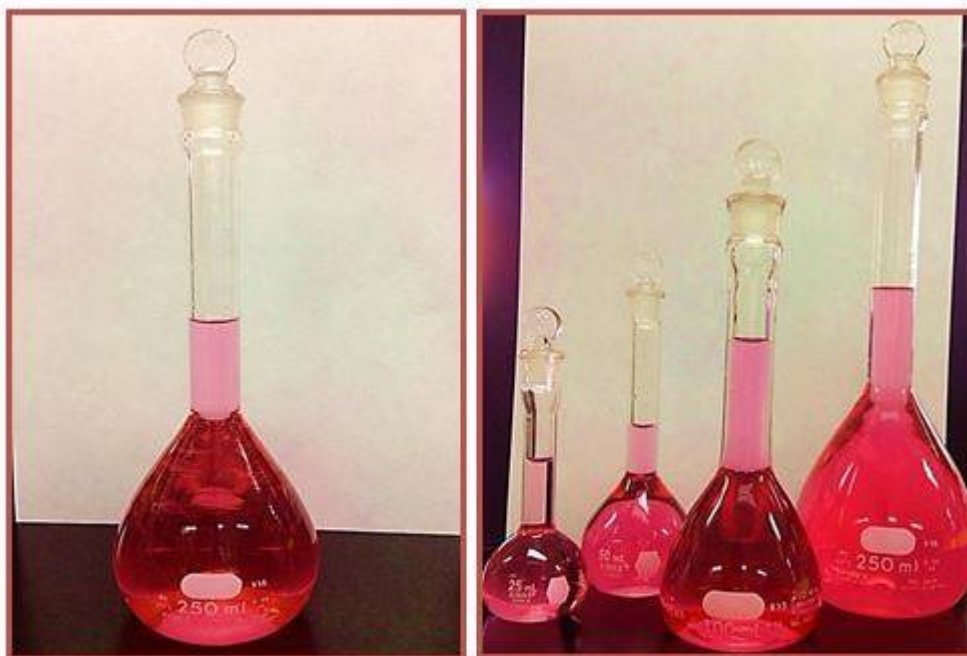


Fig. II.4 Matraces volumétricos clase A de diferentes capacidades.

En la imagen de la izquierda se muestra la posición adecuada del menisco

En cuanto se está próximo a llegar al esmeril se recomienda agregar el volumen por goteo y una vez que se alcanza la marca se tapa el matraz y se homogeniza la solución por inversión.

Tolerancia de la Buretas clase A

VOLUMEN DE LA BURETA	GRADUACIÓN MINIMA EN ML	TOLERANCIA (ML)
5	0.01	± 0.01
10	0.05	± 0.02
25	0.1	± 0.03
50	0.1	± 0.05
100	0.2	± 0.10

Cuando se está próximo a llegar al esmeril se recomienda agregar gotas y una vez que se alcanza la marca se tapa el matraz y se homogeniza la solución por inversión.

Pipetas:

Material que vacía volúmenes conocidos de líquido, existen pipetas aforadas que están calibradas para verter volumen fijo. Las pipetas graduadas están calibradas y se usan para evacuar volumen variable.

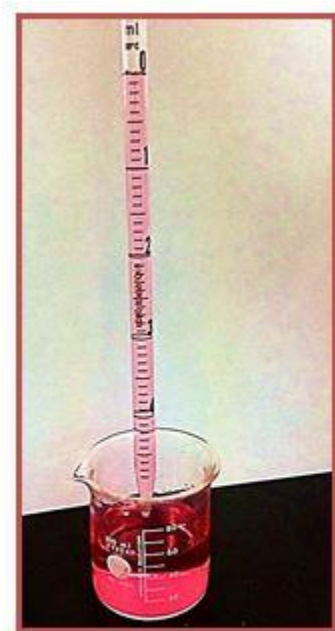


Fig II. 5 Pipeta graduada de 10 mL

Micropipetas:

Vacían volúmenes desde 1 a 5000 μL , el líquido se va alojar en una punta plástica, removible y desechable. Las puntas de propileno son estables a la mayoría de las disoluciones acuosas y disolventes orgánicos. No son resistentes al ácido nítrico y sulfúrico concentrados.

Para el uso de micropipetas se debe unir a la base la punta que por lo general se guardan en cajas. Posteriormente se ajusta el volumen que se desea tomar y se aprieta el émbolo hasta el primer tope, que corresponde al volumen deseado y se sumerge en la solución de la que se va a tomar el volumen de forma vertical y se libera el émbolo; se transfiere al recipiente receptor del volumen y se aprieta el émbolo hasta el segundo tope.

Las puntas se pueden desechar o lavar para volverse a usar, pudiéndose esterilizar en autoclave.



**



Factor de dilución:

En ocasiones se requieren cantidades [concentraciones] muy pequeñas y no se pueden medir debido a que son muy pequeñas, en estas condiciones se recurre a preparar soluciones de concentraciones que puedan ser medidas con precisión a las que se les denomina solución madre o “stock” y a partir de estas se les realizan diluciones sucesivas. Entre las más socorridas se encuentran al décimo, centésimo o milésimo. Las diluciones se pueden preparar de manera seriada. Por ejemplo: las diluciones seriadas de 1/10, en este caso el volumen final de cada tubo será de 1 mL, para lo cual se toman 900 μL de agua y 100 μL de la disolución madre en esta caso el factor de dilución de 10 y si se repite este procedimiento de forma sucesiva se tendrán factores de dilución 1/100; 1/1000, es decir 10^{-2} , 10^{-3} , de igual manera la cantidad total en cada tubo, dependerá del volumen que se necesite.

PARTE EXPERIMENTAL



Material:

Buretas.
Gradillas.

Pipetas.
Probetas.
Tubos de ensaye.
Vaso de precipitados

Equipo:

Balanza
Cámara de electroforesis
Centrífuga.
Espectrofotómetro.
Potenciómetro.

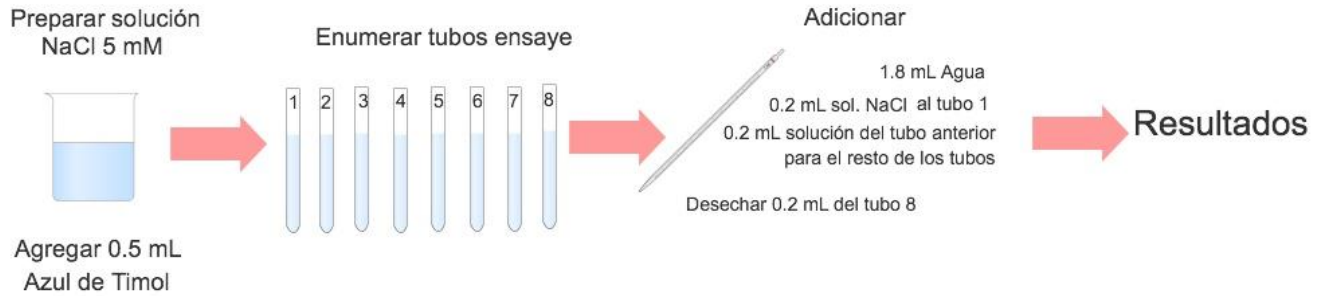
Material para realizar diluciones: 1:10; 1:100; 1:1000

Gradilla.
8 tubos de ensaye.
1 pipeta de 1 mL
1 pipeta de 10 mL

Procedimiento:

- Preparar 50 mL de cloruro de sodio (NaCl) 5 mM y adicionar 0.5 mL de azul de timol (5 %).
- Enumerar los tubos de ensaye del 1-8.
- Adicionar 1.8 mL de agua.
- Adicionar 0.2 mL de la solución de NaCl al tubo 1.
- Agitar el tubo 1 se toman 0.2 mL de NaCl del tubo 1 y se adiciona 0.2 mL del tubo 1 al tubo 2.
- Agitar el tubo 2, se toman 0.2 mL de NaCl del tubo 2 y se adiciona 0.2 mL al tubo 3
- Repetir este procedimiento hasta completar los 8 tubos.
- Desechar 0.2 mL de tubo 8 al final de las diluciones para que todos los tubos tengan el mismo volumen

Diagrama de Flujo:



Resultados:

- 1.- Esquematizar los equipos que se mostraron y señalar 5 funciones de cada uno.
- 2.- Esquematizar el material y describir sus funciones.
- 3.- Describir lo observado en la práctica.
- 4.- Calcular y tabular la concentración del cloruro de sodio y del indicador en cada una de las diluciones.
- 5.- ¿Cuál es el factor de dilución de cada tubo?

NOTAS:

*Imagen obtenida el 2 de marzo de 2015 en: <http://www.definicionabc.com/tecnologia/balanza-analitica.php>

** Imagen obtenida el 2 de marzo de 2015 en: <http://accumaximum.en.ecplaza.net/>

*** Imagen obtenida el 2 de marzo de 2015 en: <http://labnetinternational.com/products/labnet-biofree-pipette-tips>

PRÁCTICA III

TITULACIÓN ÁCIDO-BASE

Objetivos:

- Aprender a preparar disoluciones.
- Comprender los fundamentos de las curvas de valoración.
- Determinar experimental la concentración de un ácido fuerte y un ácido débil.
- Conocer el punto de equivalencia en una titulación ácido – base.
- Utilizar estequiometría de una reacción.
- Determinar la concentración de una disolución a partir de otra de concentración conocida.

Bibliografía:

Ralph A. Burns. (2002) Fundamentos de Química, Prentice- Hispanoamericana, S.A. p.p. 491 – 499.

Introducción:

La mayoría de las reacciones que ocurren en los seres vivos se encuentran profundamente influenciadas por la concentración el ión hidrógeno. Esta característica es tan importante que los organismos multicelulares han desarrollado una gran variedad de métodos sofisticados para mantener la concentración del ión hidrógeno. Los ácidos y bases han sido clasificados como fuertes o débiles dependiendo hasta cierto punto de la propiedad de ionizarse.

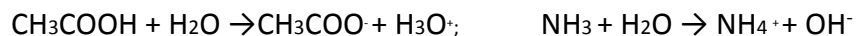
En el año de 1663, Boyle introdujo el concepto de ácido y base y posteriormente von Liebig en 1853, clasificó a los ácidos por composición molecular. A finales del siglo XVIII Lavoisier propuso una teoría sobre los ácidos considerando que “El oxígeno es un agente acidificante, debido a que convierte a los elementos del carbono, nitrógeno y azufre en ácido carbónico, ácido nítrico y sulfúrico respectivamente”. No obstante, posteriormente se demostró que muchos ácidos no contenían oxígeno, como por ejemplo, el ácido clorhídrico (HCl), ácido fluorhídrico (HF), por este motivo se llegó a la conclusión de que el elemento acidificante era el hidrógeno y no el oxígeno. Consecutivamente, Gay Lussac determinó que los ácidos y las bases no pueden definirse individualmente sino por una relación mutua. Liebig en 1938, formuló a los ácidos

orgánicos a partir de la observación de que el hidrógeno de los ácidos puede ser sustituido por metales y determinó que las bases son sustancias que al reaccionar con ácidos forman sales. Arrhenius (1884) presentó una definición de ácido y base que predomina en la actualidad, su hallazgo lo realizó mediante la observación de que cuando el ácido clorhídrico se disuelve en agua se disocia completamente en estructuras iónicas, como se muestra a continuación: $\text{HCl} \rightarrow \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{Cl}^- (\text{aq})$, este mismo comportamiento lo presentaban otros ácidos, por lo que concluyó que los ácidos se disocian completamente en disolución, con lo que señaló que un ácido (HA) es un compuesto que en disolución acuosa produce protones (H^+) y una base (B^-) es una sustancia que en agua produce aniones en forma de iones hidroxilo (OH^-). Formando los siguientes equilibrios químicos $\text{HA} \rightarrow \text{A}^- + \text{H}^+$ y/o $\text{BOH} \rightarrow \text{B}^- + \text{OH}^-$, encontrando que estas reacciones se presentaban en ácidos o bases fuertes. Así mismo, la reacción que se produce al mezclar un ácido con una base se denomina NEUTRALIZACIÓN, como se muestra en la reacción que se presenta a continuación: ácido + base \rightarrow sal + agua. Por este motivo al mezclar ácido clorhídrico con hidróxido de sodio, se produce la siguiente reacción $\text{HCl} (\text{aq}) + \text{NaOH} (\text{s}) \rightarrow \text{NaCl} (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}$. Según lo propuesto por Arrhenius, la neutralización se produce por la unión de los protones cedidos por el ácido con los hidroxilos cedidos por la base dando agua. Si la concentración de la base es suficiente para los protones contenidos en la solución se produce la neutralización y cuando se excede la concentración de hidroxilo la solución adquiere un carácter alcalino. Por otra parte, entre las limitaciones a lo propuesto por Arrhenius, se encontró que los protones en disolución acuosa no permanecen libres porque como el agua es una molécula dipolar, el protón se une al agua formando el ión hidronio (H_3O^+) como se muestra a continuación: $\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+$

De igual manera, definió a las bases como sustancias capaces de ceder iones hidroxilo en disolución. Sin embargo, otras sustancias como el amoníaco (NH_3) que actúa como una base no tiene en su fórmula hidroxilos y en solución acuosa conducen la corriente eléctrica. Posteriormente Brønstead y Lowry propusieron que un ácido es una sustancia capaz de ceder uno o más protones a otra molécula y a una base como una molécula capaz de aceptar protones. Así mismo, propusieron que a todo ácido le corresponde una base conjugada con la que está equilibrio y toda base tiene un ácido conjugado como se muestra a continuación: $\text{Acido}_1 \rightarrow \text{Base}_1 + \text{H}^+$ $\text{Base}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Acido}_2$, este comportamiento lo presentan el ácido acético (CH_3COOH) y el amoníaco que producen los siguientes equilibrios químicos: $\text{CH}_3\text{COOH} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$ y $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$

En consecuencia, para que un ácido pueda transformarse en su base cediendo un protón debe existir de forma simultánea una base, formando otro sistema ácido-base, que

acepte los protones transformándose en su ácido conjugado. En la formación de ácido-base conjugada interviene el agua formando el siguiente equilibrio ácido-base:



El agua es una molécula bipolar que se disocia en pequeña proporción formando el siguiente equilibrio químico $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$ y que de forma simplificada se expresa de la siguiente manera: $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$. El agua puede actuar como una base aceptando protones para convertirse en el ión hidronio (H_3O^+) y también puede actuar como un ácido cediendo los protones a otra molécula de agua para convertirse en hidroxilo (OH^-) y como el agua puede actuar como base o como ácido se considera que el agua es una molécula anfótera.

Los estudios cuantitativos de las reacciones con una estequiometría conocida se analizan por un método denominado valoración. En este tipo de ensayos se utiliza una disolución de concentración conocida a la que se le denomina **reactivo valorante** que se va agregar de manera gradual y de volumen conocido a una disolución de concentración desconocida designada **reactivo a valorar**, y concluye hasta que se complete la reacción entre estas especies químicas. Se puede efectuar la valoración de una disolución de composición desconocida midiendo el volumen necesario para que efectúe la reacción con una cantidad de reactivo valorante y posteriormente midiendo el volumen de disolución de composición desconocida en la que se va a producir la reacción completa.

Para la valoración del reactivo de concentración desconocida, es necesario elaborar con un alto grado de precisión al reactivo valorante y a estos reactivos se les denominan patrones primarios. De manera convencional se utiliza hidróxido de sodio (NaOH), a pesar de que no es un buen reactivo valorante porque es higroscópico y se carbonata fácilmente en contacto con el dióxido de carbono, es más conveniente el uso de ftalato de sodio. Se considera que una valoración se ha completado cuando los reactivos valorante y valorado han reaccionado completamente a esta reacción se le denomina **punto de equivalencia** y es en este punto cuando la valoración ha alcanzado su punto final. Con el propósito de evaluar el punto de equivalencia es necesario el uso de indicadores de pH llamados indicadores ácido – base. Son compuestos orgánicos que actúan como ácidos – bases débiles y las formas conjugadas presentan diferentes colores y para conocer con certeza el valor de pH en el que se alcanza el punto de equivalencia es necesario el uso de potenciómetros y realizar los cálculos que se muestran a continuación.

Ejemplo.

¿Cuál es el volumen de ácido clorhídrico HCl 0.7 N que se requiere para neutralizar 10 ml de una solución 0.5 N de hidróxido de sodio NaOH?

Datos.

N HCl = 0.7 eq. / L

V HCl = ?

V NaOH = 10 ml

N NaOH = 0.5 eq. / L

$$V_a = \frac{V_b \times N_b}{N_a}$$

Fórmula:

$$V_a \times N_a = V_b \times N_b$$

Despeje

$$V_{HCl} = 7.14 \text{ ml}$$

Sustitución

$$V_{HCl} = \frac{10 \text{ mL} \times 0.5 \text{ eq. / L}}{0.7 \text{ eq. / L}}$$

Donde:

Va = Volumen del ácido

Vb = Volumen de la base

Na = Concentración del ácido

Nb = Concentración de la base.

Material por equipo:

- 1 Bureta.
- 1 Embudo
- 1 Matraz aforado de 100 mL
- 1 Soporte Universal
- 1 Varilla vidrio
- 1 Vaso de precipitados de 100 mL

Equipo:

Potenciómetro.

Reactivos:

- Preparar 25 mL de una solución de ácido acético.
- Preparar 200 mL de una solución 0.1 M de NaOH.
- Preparar 25 mL de una solución de ácido clorhídrico.
- Solución indicadora de azul de bromotimol al 1 %.

Procedimiento:

- 1.- Utilizar guantes
- 2.- Añadir 50 mL de 1 M de hidróxido de sodio (NaOH) a un vaso de precipitados de 250 mL.

- 3.- Colocar la bureta de 50 mL en un soporte universal usando una abrazadera para fijar la bureta al soporte.
 - 4.- Colocar el embudo en la parte superior de la bureta.
 - 5.- Verter la disolución de NaOH llenar por encima de 0.00 mL.
 - 6.- Drenar una pequeña cantidad de NaOH a un vaso de precipitados con el propósito de que quede llena la punta de la bureta.
 - 7.- Dejar el nivel de NaOH a 0.00
 - 8.- Conectar el potenciómetro.
- OJO: La solución de hidróxido de sodio es caústica.**

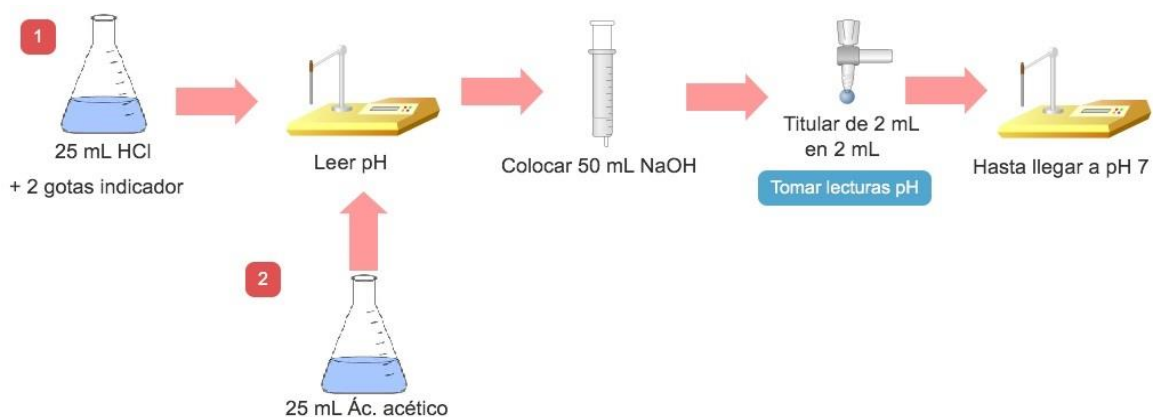
I. Titulación del Ácido clorhídrico.

- 1.- Adicionar 25 mL de ácido clorhídrico a un matraz de 250 mL
- 2.- Agregar dos gotas de la solución indicadora y agitar.
- 3.- Tomar la lectura inicial de pH y anotarla.
- 4.- Revisar que la llave de la bureta esté cerrada.
- 5.- Adicionar 50 mL de NaOH en la bureta.
- 6.- Añadir volúmenes de 2 mL de hidróxido de sodio y tomar la lectura de pH a cada volumen agregado.
- 7.- Continuar añadiendo NaOH hasta concluir la titulación.

II. Titulación de Ácido acético.

- 1.- Se toman 25 mL de ácido acético y se colocan en un vaso de precipitados y se agregan 2 gotas del indicador azul de timol 1%.
- 2.- Colocar 50 mL de NaOH en la bureta.
- 3.- Se toma la lectura inicial de pH.
- 4.- Se toma la lectura de pH al adicionar volúmenes de NaOH.
- 5.- Se continúa de esta manera hasta concluir la titulación.

Diagrama de Flujo



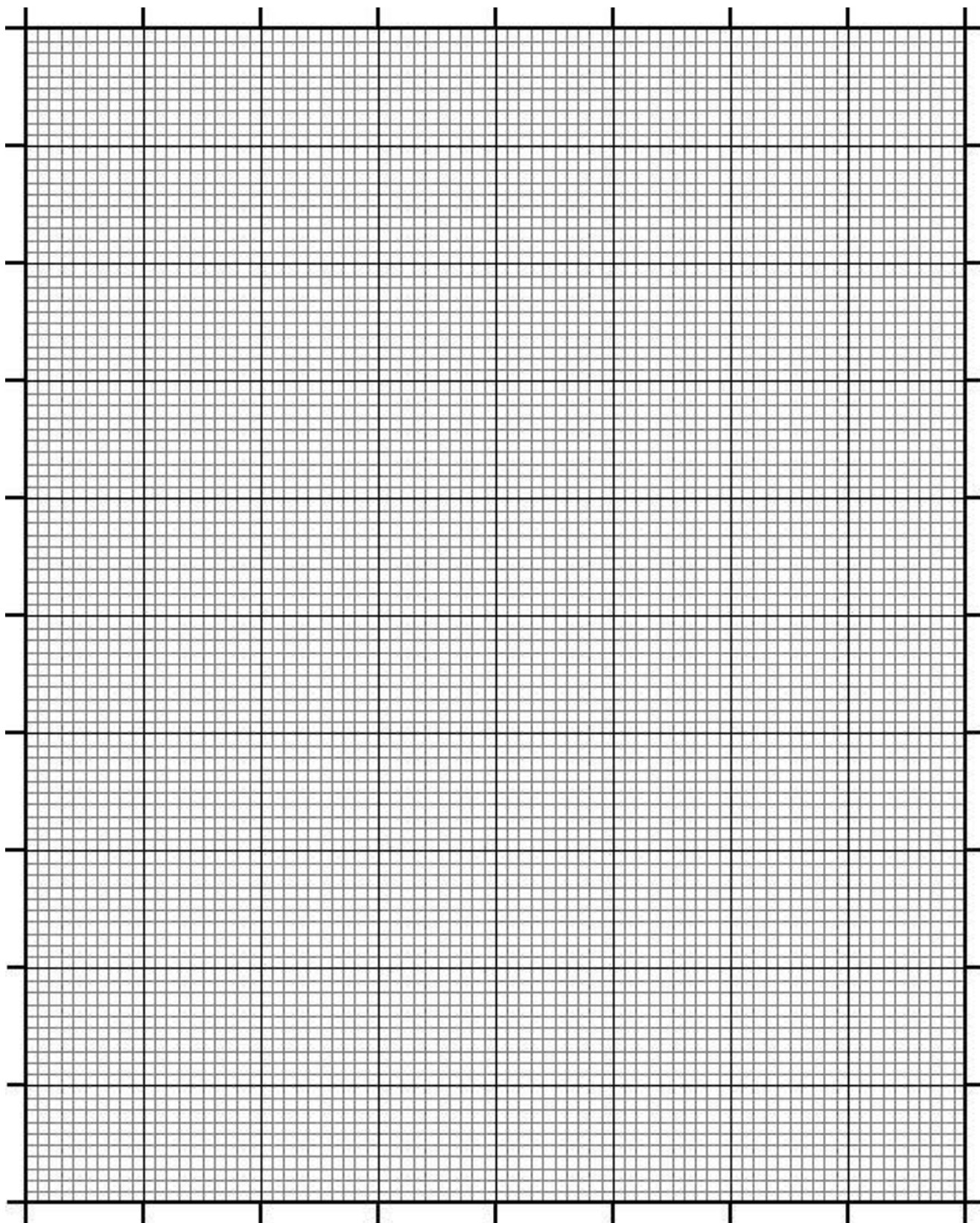
Resultados:

- Graficar en la ordenada al origen las lecturas de pH y en la abscisa los equivalentes de NaOH adicionados.
- Calcular la concentración del ácido clorhídrico.
- Analizar y comparar el comportamiento de los ácidos titulados.
- Comparar y discutir los resultados obtenidos con los teóricos.
- Calcular el punto de equivalencia por el método de Bisección, de las Tangentes o de los círculos.

Cuestionario:

- 1.- ¿En qué consiste una curva de titulación?
- 2.- Definir ácido y base fuerte y débil.
- 3.- ¿Qué se entiende por amortiguador?
- 4.- Importancia fisiológica de los amortiguadores.
- 5.- Utilidad de los indicadores.

II. Graficar los resultados obtenidos con cada uno de los ácidos.



PRÁCTICA IV

TITULACIÓN Y CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS

Objetivo:

- Separación de los 20 aminoácidos por cromatografía en placa fina.
- Identificación de los aminoácidos

Bibliografía:

- Nelson D.L., Cox M., Lehninger W.M. (2005). Principios de Bioquímica. 4ª Edición. Ed. Omega.

Introducción:

Los aminoácidos constituyen, quizá, uno de los capítulos más intensos en el estudio de la bioquímica general. Se trata, de moléculas versátiles, precursoras famosas de las macromoléculas de la vida y cuyas propiedades irremplazables las han convertido en la piedra de toque de acontecimientos biológicos tan espectaculares como el mensaje genético, la síntesis de proteínas y la especificidad de la catálisis enzimática.

La importancia descomunal de los procesos que se han señalado en el párrafo anterior hace imperativo el aprendizaje de las técnicas elementales para que el estudiante se halle en posibilidad de aislar los aminoácidos esenciales para el sostenimiento de la vida así como los procedimientos para caracterizarlos, separarlos por cromatografía y teñirlos mediante el empleo del reactivo de ninhidrina.

Material por grupo:

- Cámara de Cromatografía.
- Estufa.

Material por equipo:

- Papel Whatman número 3 de un tamaño de 7 cms. x 10 cms.

Reactivos:

- Acetona.
- Ácido acético.

- Aminoácidos
- Butanol.
- Ninhidrina al 1 % en etanol.
- Solución de problema 1 y 2

Procedimiento:

I Cámara de Cromatografía.

Saturar la cámara de cromatografía una hora antes de comenzar la práctica con una mezcla de butanol: Ácido acético y agua (4 : 1 : 5)

II Procedimiento para la corrida de muestras.

- 1.- Aplicar la muestras a un centímetro y medio de distancia de la orilla, de los aminoácidos, de los problemas y de saliva.
- 2.- Introducir el papel en la cámara.
- 3.- Dejar correr aproximadamente 20 minutos.
- 4.- Sacar el papel de la cámara y dejar secar.
- 5.- Rociar con ninhidrina y revelar en la estufa a 90°C por 5 minutos.

Diagrama de Flujo:



Resultados:

- 1.- Medir la distancia que recorrió el solvente.
- 2.- Medir la distancia que recorrió cada muestra.
- 3.- Calcular el factor de corrimiento.

$R_f = \text{distancia recorrida por la muestra} / \text{distancia que recorrió el solvente.}$

- 4.- De acuerdo a las propiedades químicas de los aminoácidos, señalar el patrón de corrimiento de cada uno.

5.- Señalar la coloración que se obtiene con cada aminoácido.

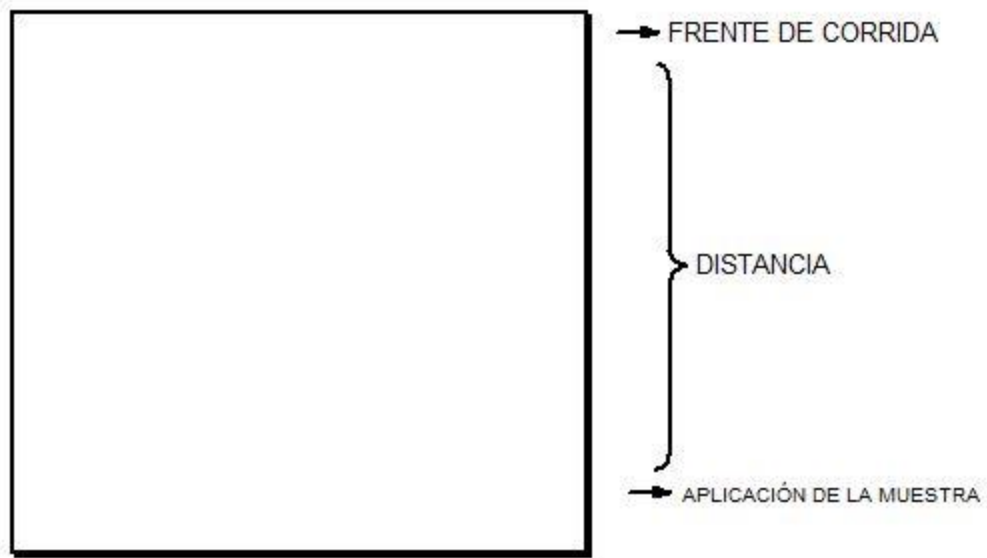
6.- Identificar los aminoácidos de la solución problema.

Cuestionario:

1.- Explicar en que consiste la reacción de ninhidrina.

2.- Explicar la técnica de cromatografía de capa fina y alguna otra cromatografía.

3.- ¿Por qué se presentan aminoácidos en la saliva?



PRÁCTICA IV

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SALIVA.

Objetivo:

- Cuantificar proteínas de saliva.

Bibliografía:

- Suelter CH (1985): A Practical guide to enzymology, Editorial, John Wiley & Sons, New York.

Introducción:

Las proteínas, que son polímeros de aminoácidos que intervienen en una infinidad de procesos biológicos, algunos de ellos tan decisivos para el mantenimiento de la vida como el soporte celular, la tensión y la flexibilidad de los órganos, la estructura del sistema inmune y las reacciones enzimáticas. Se caracterizan también por disponer de grupos cargados que les confieren puntos isoeléctricos específicos, los que pueden ser aprovechados para someterlas a técnicas de aislamiento y purificación. Para estos análisis es indispensable contar con herramientas que permitan su cuantificación por lo que diversos investigadores han desarrollado diferentes técnicas para su cuantificación, quizá la más ampliamente utilizada sea la metodología de Lowry que involucra la formación de un complejo proteína cobre en solución alcalina. Este complejo reduce a una mezcla de fosfomolibdeno-fosfotungstato lo que promueve el desarrollo de una coloración azul, en esta práctica se va a utilizar la técnica de Biuret cuyo fundamento químico se deberá investigar.

Existen además otros procedimientos en la cuantificación de proteínas, algunos emplean la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz UV, o bien mediante la formación de derivados químicos o la capacidad para unir determinados colorantes. Cada método varía en la sensibilidad y tienen sus ventajas y desventajas.

Método del ácido bicinónico:

La reacción se efectúa mediante la formación de un complejo púrpura de iones cobre con ácido bicinónico en un medio alcalino. Es un método que alta estabilidad, sencillo, rápido y muy sensible (0.5 – 10 µg)

Método Biuret:

Se realiza en un medio básico y consiste en la formación de un complejo coloreado en el cobre (Cu^+) y los grupos amino (NH) de los enlaces peptídicos. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas, es una reacción muy específica, es recomendable su uso para soluciones enriquecidas en proteínas (rango de sensibilidad de 100 a 10000 μg).

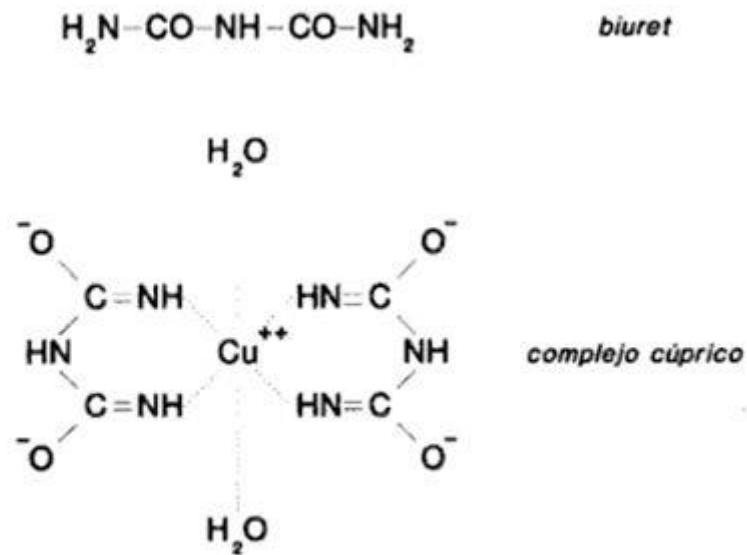


Fig. IV-1 Mecanismo de Reacción del Método de Biuret.

Es una reacción coloreada violeta, por la formación de un complejo de cobre en medio alcalino con el enlace peptídico de las proteínas.

Método Bradford:

Formación de complejo entre el colorante Coomassie Blue G-250 con las proteína en medio ácido. Es un método sensible (1 – 15 μg), es un método sencillo, rápido, barato y pocas sustancias interfieren con el reactivo.

Método Lowry:

Es la cuantificación de una proteína en medio alcalino con iones de cobre $^{2+}$, en presencia de tartrato para evitar la precipitación y consiste en la formación de un complejo de coordinación entre el cobre y grupo amino del enlace peptídico. Utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (ácido fosfomolibdotungstico), que se reduce por medio de

los grupos fenol (y en menor medida imidazol e indol) presentes en la proteína, lo que deriva en la formación de un color azul, cuya intensidad variará en función de la concentración de proteína presente en la solución, absorbe a dos longitudes de onda 560 y 680 nm.

Equipo:

- Celdas para espectrofotómetro.
- 2 centrifugas clínicas.
- 10 Espectrofotómetros.

Material:

- 1 gradilla
- 1 vaso de precipitados de 250 mL
- 2 pipetas graduadas de 10 mL
- 2 pipetas graduadas de 5 mL
- 3 tubos de centrifuga con tapa.
- 4 pipetas graduadas de 1 mL
- 9 tubos de ensaye de 15x 150 mm.

Material biológico:

- Obtención de 10 mL de saliva.

Se realizará la cuantificación de proteínas mediante el ensayo de Biuret que fue una de las primeras metodologías colorimétricas desarrolladas y que se utiliza hoy en día a menudo en procedimientos que exigen rapidez.

Reactivos:

- Solución salina al 0.38%
- Suero Albúmina Bovina stock 10 mg/mL
- Reactivo de Biuret.
- Agua desionizada.

Preparar el reactivo de Biuret.

Disolver 1.50g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.0 g de Tartrato de sodio-potasio $(\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O})_4$ en 500 mL, de agua desionizada. Adicionar 300 mL, de NaOH al 10 % y aforar a 1 L con agua desionizada.

Método:

I Obtención de la muestra de saliva.

- 1.- Tomar 10 mL, de saliva (se etiquetará el tubo como "T").
- 2.- Guardar 5 mL, de saliva y los otro cinco se centrifugarán y se guardará el sobrenadante (se etiquetará como "S-1").
- 3.- La pastilla se disolverá en 1.5 mL, de solución salina al 0.38% (se etiquetará como "P-1").

II Cuantificación de proteína.

La cuantificación de las muestras se determinará por reactivo de Biuret y se prepararán los tubos de acuerdo a como se señala en la siguiente tabla y se adicionarán en el mismo orden.

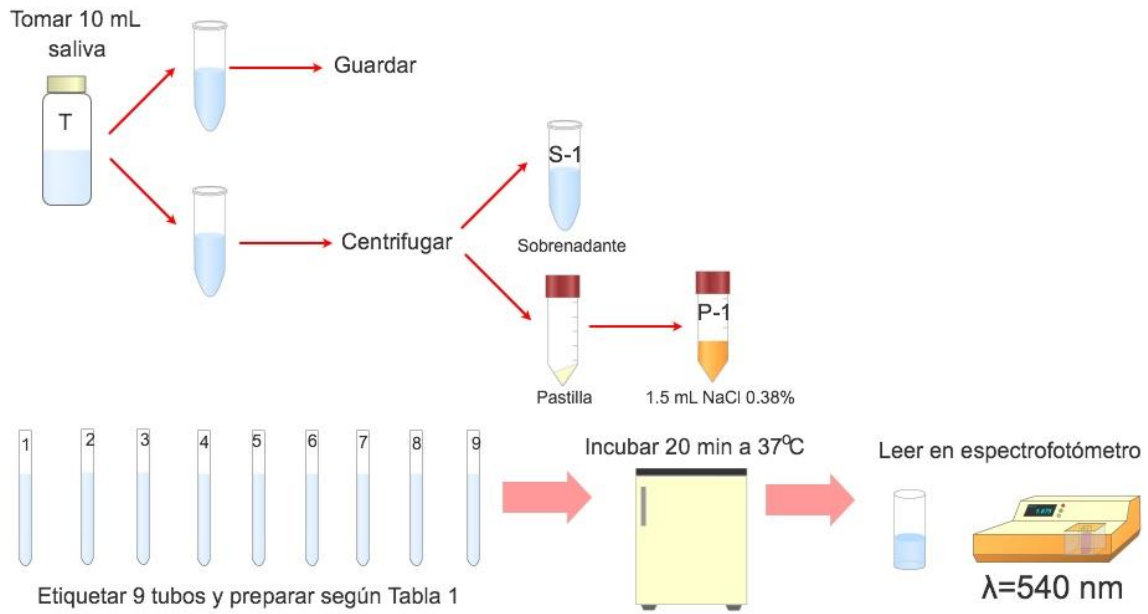
TUBOS DE ENSAYE	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VOLUMEN DE REACTIVOS (mL)									
ALBÚMINA BOVINA SÉRICA (10 mg/mL)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0			
AGUA	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0	0.5	0.5	0.5
SALIVA (T)							0.5		
SOBRENADANTE (S-1)								0.5	
PASTILLA RESUSPENDIDA (P-1)									0.5
REACTIVO DE BIURET	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Incubar 20 minutos a 37°C									
LEER A 540 nm									

Después de haber colocado todos los reactivos deberá tenerse un volumen total en cada tubo de 5 mL

Los tubos se incubarán 20 minutos a 37°C.

Terminada la incubación se realizará la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm.

Diagrama de Flujo



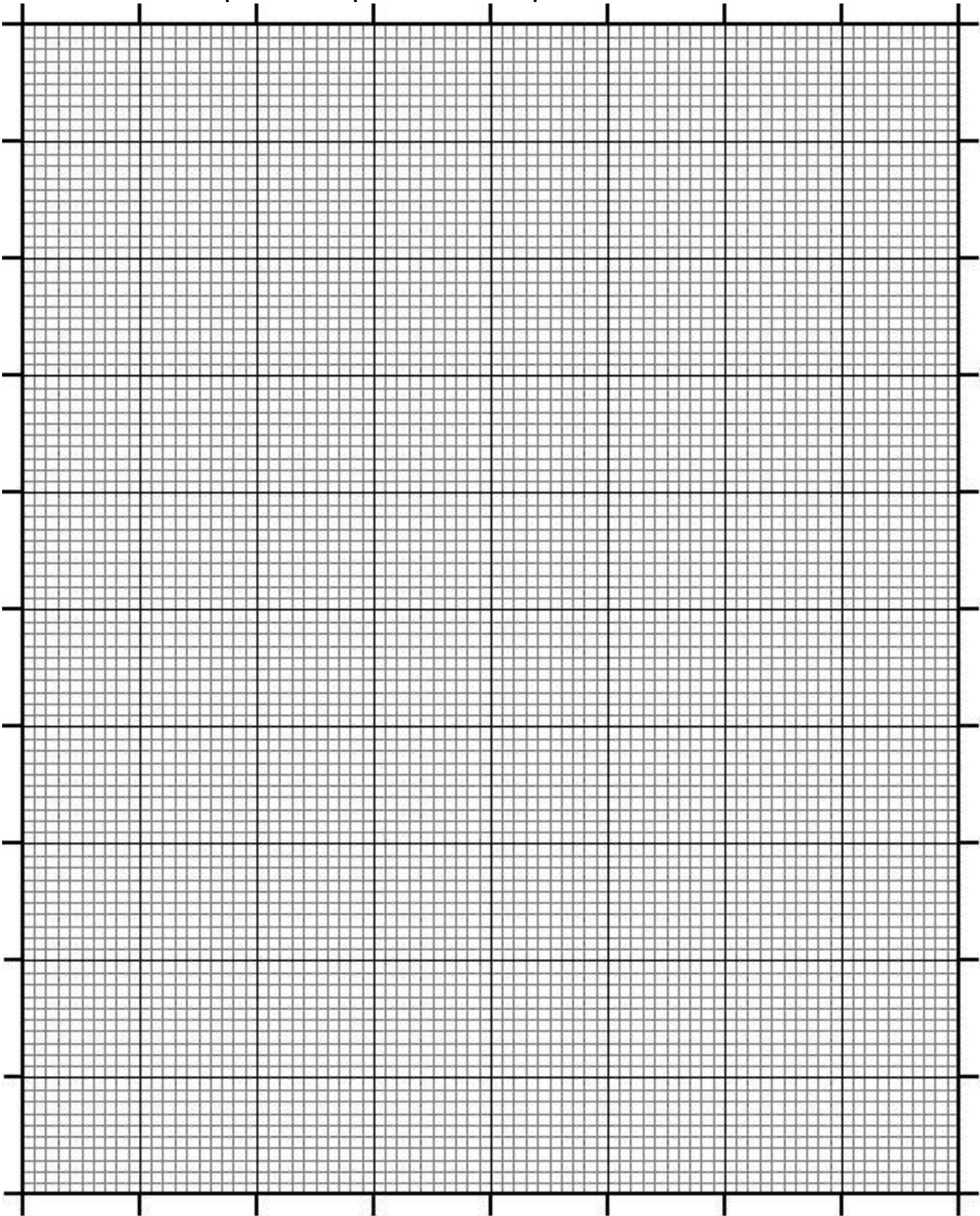
Resultados:

- I. Colocar los valores de absorbancia y concentración obtenidos en cada una de las lecturas efectuadas.

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ABS 540nm									
CONCENTRACIÓN (mg/mL)									

- II. Realizar los cálculos para determinar las concentraciones.

Graficar la curva patrón e interpolar las muestras problema



Cuestionario:

- 1.- Definición de proteína.
- 2.- Mencionar las proteínas que componen la saliva y su función.
- 3.- Definición de curva patrón.
- 4.- Mencionar otras técnicas para cuantificación de proteínas. (Bradford, Lowry, lectura a 280 nm)
- 5.- ¿Qué diferencias se presentan entre esta técnicas en cuanto a sensibilidad.
- 6.- Explicar la ley de Lambert & Beer.
- 7.- Explicar la función de una centrifuga y espectrofotómetro.

PRÁCTICA VI

ACTIVIDAD DE LA AMILASA SALIVAL.

Objetivo:

- Estudiar las características cinéticas de la amilasa salival.
- Determinar experimentalmente los parámetros cinéticos de la amilasa.
- Realizar la representación gráfica de velocidad inicial frente a sustrato de la enzima amilasa salival

Bibliografía:

Lehninger, A. et. al. Principios de Bioquímica. 2a. edición. Ed. Omega. (2005).

Blanco A. Química Biológica. 5ª. edición. Ed. Ateneo (1991)

Introducción:

En la ingesta de alimentos el proceso digestivo es necesario para que el cuerpo pueda utilizar los nutrientes. Se efectúa en el tracto buco-gastro-intestinal en donde actúan enzimas hidrolíticas transformando a los nutrientes en moléculas más sencillas. Por ejemplo, el almidón que consumimos se hidroliza en glucosa. La enzima responsable de realizar esta degradación se designa *α -amilasa salival*, que como mencionamos anteriormente degrada el almidón a una mezcla de hidratos de carbono más sencillos (según el nivel de actividad y el tiempo de actuación, pueden llegar a maltosa e incluso glucosa libre) y un resto, inatacable por ella, llamado dextrina límite. Esta enzima está presente en saliva y en el páncreas. El contenido de la *α -amilasa* en saliva es variable, y puede ir desde 0 a 3 mg/mL. En ocasiones algunas personas no poseen esta actividad en saliva, lo cual no supone ningún problema ya que disponemos de *α -amilasa pancreática*.

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa con dos componentes; uno, mayoritario, llamado amilosa, de estructura lineal (las unidades están unidas, exclusivamente, por enlaces α -1,4-glucosídicos), y otro, minoritario, amilopectina, de estructura ramificada (cada cierto número de eslabones lineales hay una ramificación, que encabeza una glucosa unida mediante enlace α -1,6-glucosídico a una de las glucosas

de la estructura lineal). En esta práctica se va a seguir la degradación del almidón por la enzima *α-amilasa salival*, ya que el almidón forma un complejo azul con iodo, cosa que no pueden hacer los productos de su degradación.

Propiedades Generales.

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas. Además de la proteína pueden requerir de algún otro compuesto como los iones metálicos o grupos prostéticos. Las enzimas se regeneran durante la reacción y funcionan a concentraciones muy bajas.

Al igual que las proteínas, la actividad de las enzimas varía por cambios en la temperatura produciéndose un aumento en actividad enzimática al incrementar la temperatura, hasta que a temperaturas superiores a los 50°C en donde las enzimas en su mayoría se desnaturalizan y pierden su actividad. Sin embargo, algunas enzimas son termoestables. Otro parámetro que afecta la catálisis el pH.

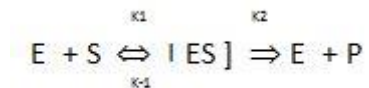
Cinética Enzimática.

Estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Así mismo los factores que afectan la actividad enzimática como la concentración del sustrato, la fuerza iónica, la temperatura o el pH.

Cinética de Michaelis-Menten.

En el año de 1913, Leonor Michaelis y Maud Menden desarrollaron un modelo que permitiera explicar el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática. Propusieron un modelo de velocidad que se denomina “Ecuación de Michaelis-Menten”.

En este modelo exponen que la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato $[S]_0$ se efectúa en dos etapas. En la primera se forma el complejo Enzima-Sustrato y en la segunda se crea el producto y la enzima queda libre y en posibilidad de catalizar nuevas reacciones. El equilibrio químico, para enzimas que utilizan un sustrato, se expresa de la siguiente manera:



Donde:

k representa a las constantes de velocidad.

A partir de este equilibrio químico Michaelis – Menten obtuvieron la ecuación que lleva su nombre.

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

Ecuación de Michaelis – Menten.

Representación gráfica de la Ecuación de Michaelis – Menten.

La representación de la velocidad inicial frente a la concentración de sustrato da lugar a una curva hiperbólica (Fig. VI.1). En sistemas biológicos este tipo de gráficos se obtiene al estudiar otra serie de eventos, como el transporte de moléculas a través de membranas y en la unión de ligandos a sus receptores.

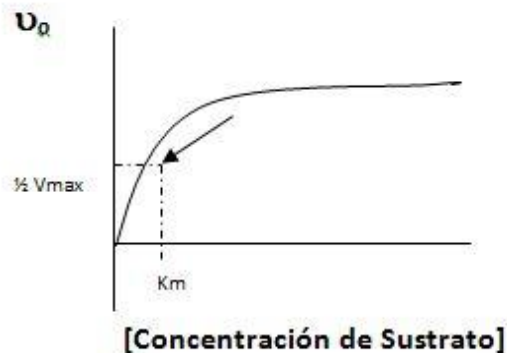


Fig VI.1 Representación Gráfica de velocidad inicial frente a concentración de sustrato.

El análisis del gráfico permite la obtención del valor numérico de la constante de Michaelis (K_m). Este valor es de gran utilidad por nos permite conocer la concentración intracelular del sustrato, este valor numérico nos permite conocer el funcionamiento de una enzima en diferentes especies o tejidos o analizar el efecto de fármacos sobre el funcionamiento de la enzima. Por otra parte, el análisis gráfico permite determinar la afinidad de la enzima por el sustrato, a valor más pequeños de K_m mayor afinidad de la enzima por el sustrato.

Enzimas como marcadores de utilidad diagnóstica.

Muchas enzimas son de utilidad clínica porque en ocasiones como consecuencia de la destrucción de tejidos son liberadas al torrente sanguíneo. Pacientes con hepatitis aguda liberan aminotransferasas al torrente sanguíneo y su actividad. Algunas horas después de un infarto agudo de miocardio se liberan al torrente sanguíneo la aspartato aminotransferasa y creatina cinasa.

Obtención experimental de las gráficas de Michaelis – Menten.

La adición de la enzima a un sustrato cataliza la conversión de éste en producto. Para estudiar el progreso de la reacción enzimática se pueden utilizar diversas herramientas experimentales como la formación de compuestos coloridos, utilización de radionucleótidos o bien detección mediante luz ultravioleta. Con estas herramientas se puede estudiar la actividad enzimática midiendo la formación de producto o la desaparición del sustrato. En la gráfica (Fig. VI.2) que se presenta a continuación se muestran los gráficos de tiempo frente a concentración de producto o sustrato.

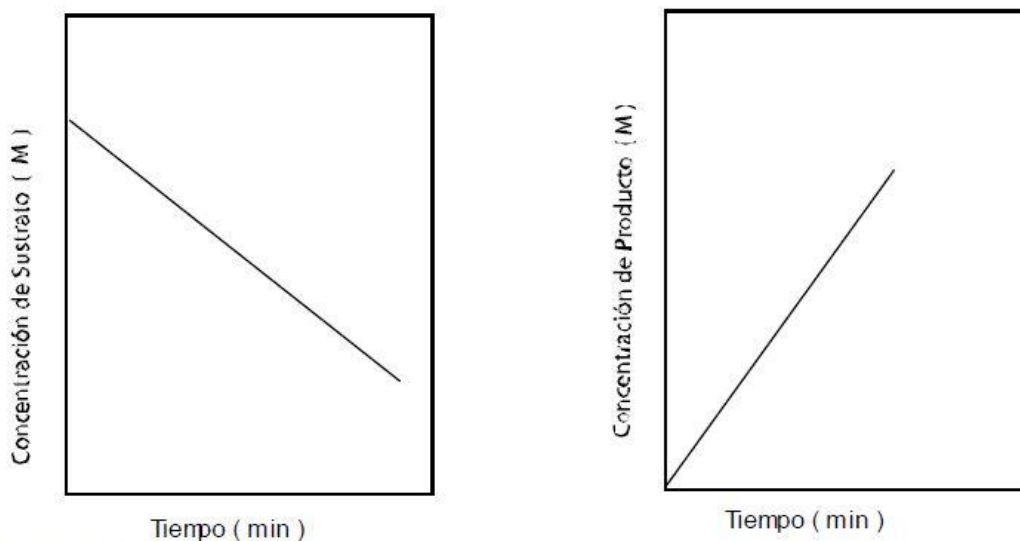


Fig. VI.2 Representación gráfica de concentración de sustrato contra tiempo.

Como podemos observar en los gráficos anteriores si se mide la concentración de sustrato observamos que en el transcurso del tiempo este desaparece por lo que la pendiente será negativa y en cuanto a la concentración de producto este aparece y por tanto la pendiente será positiva.

La velocidad inicial se calcula a partir de los valores de la pendiente del gráfico. El resultado representa un punto en el gráfico de Michaelis – Menten. Para la obtención de la gráfica de Michaelis-Menten se deben realizar los mismos gráficos variando la concentración del sustrato como se muestra en la gráfica que se presenta a continuación. En donde observamos que cada gráfico corresponde a un punto de la gráfica de Michaelis – Menten.

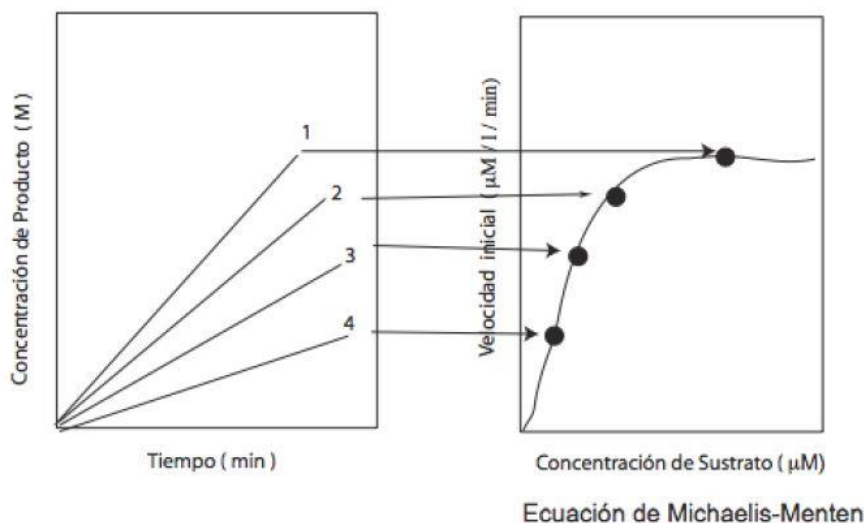


Fig. VI.3 Gráfico de concentración de producto contra tiempo y el análisis de Michaelis – Menten.

En el esquema de la izquierda se muestra el gráfico de la concentración de producto en función del tiempo y en el gráfico de la derecha el análisis de la pendiente de cada uno de los trazos (izq) y su conversión en velocidad inicial en función de la concentración de sustrato.

Material:

- Gradilla para tubos de ensaye.
- Micropipeta de 200 a 1000 microlitros.
- Pipeta de 5 mL
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm.
- Vaso de precipitados.

Aparatos por equipo:

- Baño de temperatura constante.
- Celdas para espectrofotómetro.
- Cronómetro.
- Espectrofotómetro.
- Termómetro.

Reactivos.

- Lugol
 - 1 gr de yodo + 2 gr. de yoduro de potasio disueltos en 300 mL de agua destilada y filtrados.

➤ **Sustrato:**

Suspensión de almidón:

100 mg /mL

50 mg./mL

25 mg/mL

10 mg/mL

5 mg/mL

METODOLOGÍA.

1. Colocar agua en ebullición en un vaso de precipitados.
2. El alumno que aportará la muestra de saliva no deberá consumir alimentos al menos dos horas antes de la práctica.
3. Numerar los tubos de ensaye (1-5).
4. Obtener por cada equipo 1.0 mL de saliva y colocarla en un tubo.
5. Preparar los tubos de ensaye de acuerdo a la tabla que se presenta a continuación.
6. **NOTA SE TOMARÁN LAS LECTURAS DE CADA TUBO Y HASTA QUE SE CONCLUYA CON LAS LECTURAS DEL TUBO 1 SE PREPARA EL TUBO 2.**

TUBOS		1	2	3	4	5
VOLUMEN (mL)	SALIVA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	AGUA	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	LUGOL	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	ALMIDÓN	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Del STOCK:	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL

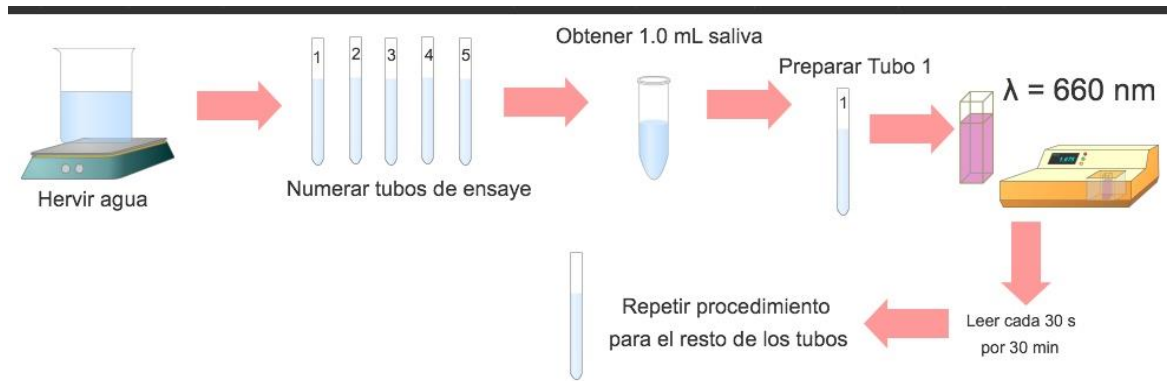
Ajustar el espectrofotómetro $\lambda = 660 \text{ nm}$

7. Para la lectura de cada tubo se procede de la siguiente manera:

Por ejemplo tubo 1. Preparar el tubo e introducirlo en el espectrofotómetro, tomar la lectura inmediatamente (esto representa el tiempo cero) y después cada 30 segundos hasta completar 3 minutos por lo que de cada tubo se tendrán las siguientes lecturas: 0, 30, 60, 90, 120, 180 segundos

8. En este procedimiento no se requiere la utilización del blanco, ni ajusta el espectrofotómetro con absorbencia de cero y transmitancia de 100% porque se van a tomar lecturas absolutas.
9. Se repite el procedimiento para los tubos 2 – 5.

DIAGRAMA DE FLUJO



CÁLCULOS PARA LOS RESULTADOS.

1. Calcular la concentración de almidón de cada uno de los cinco tubos de la tabla anterior (se puede utilizar la siguiente fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$)
2. Cada uno de los tubos va a representar un punto en la gráfica de Michaelis Menten.
3. Para el análisis de los datos se puede utilizar el programa Excel.
4. Tabular los datos en la primera columna colocar los tiempos y en la demás las lecturas de absorbencia obtenidas.
5. Seleccionar las celdas con el botón del mouse y selección la gráfica XY dispersión.
6. Cada gráfico obtenido se seleccionará para agregar la línea de tendencia y obtener la ecuación de la gráfica ($y = mx + b$)
7. Obtener el calor de cada pendiente (en total son 5), cada pendiente representa el ΔA (diferencia de absorbencia), los valores de las pendientes van a ser negativos pero nosotros vamos a considerar los valores absolutos es decir sin signo.
8. Posteriormente vamos a calcular la concentración de almidón residual de cada tubo para este propósito se utiliza el coeficiente de extinción molar (ϵ) del almidón mediante la relación: $[C] = A / l \epsilon$. ($\epsilon = 7.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para obtener la concentración de almidón residual se multiplica la pendiente de cada tubo (en

total se tienen 5 tubos por tanto se obtienen cinco valores diferentes) por el coeficiente de extinción molar el valor que se obtiene tiene las siguientes unidades: $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

9. Para eliminar cm^{-1} se dividen cada uno de los cinco valores entre 1 cm (esta división se realiza porque el ancho de la celda que usó en el espectrofotómetro es de 1 cm) con esta división se eliminan los centímetros y el resultado queda en mM^{-1} .
10. El siguiente paso consiste en dividir los cinco resultados entre el volumen de saliva utilizado (0.5 mL) por lo tanto los resultados quedarán $\text{mM}^{-1} \cdot \text{mL}$
11. Se multiplican por el factor de dilución 0.1 y los resultados continúan con las mismas unidades anteriores $\text{mM}^{-1} \cdot \text{mL}$
12. Finalmente los valores se dividen entre 3 que fue el tiempo de incubación para la toma de lecturas por lo que los resultados quedan en las siguientes unidades: $\text{mM}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.
13. Se tabulan y se realiza la gráfica para la obtención de una cinética de Michaelis – Menten.

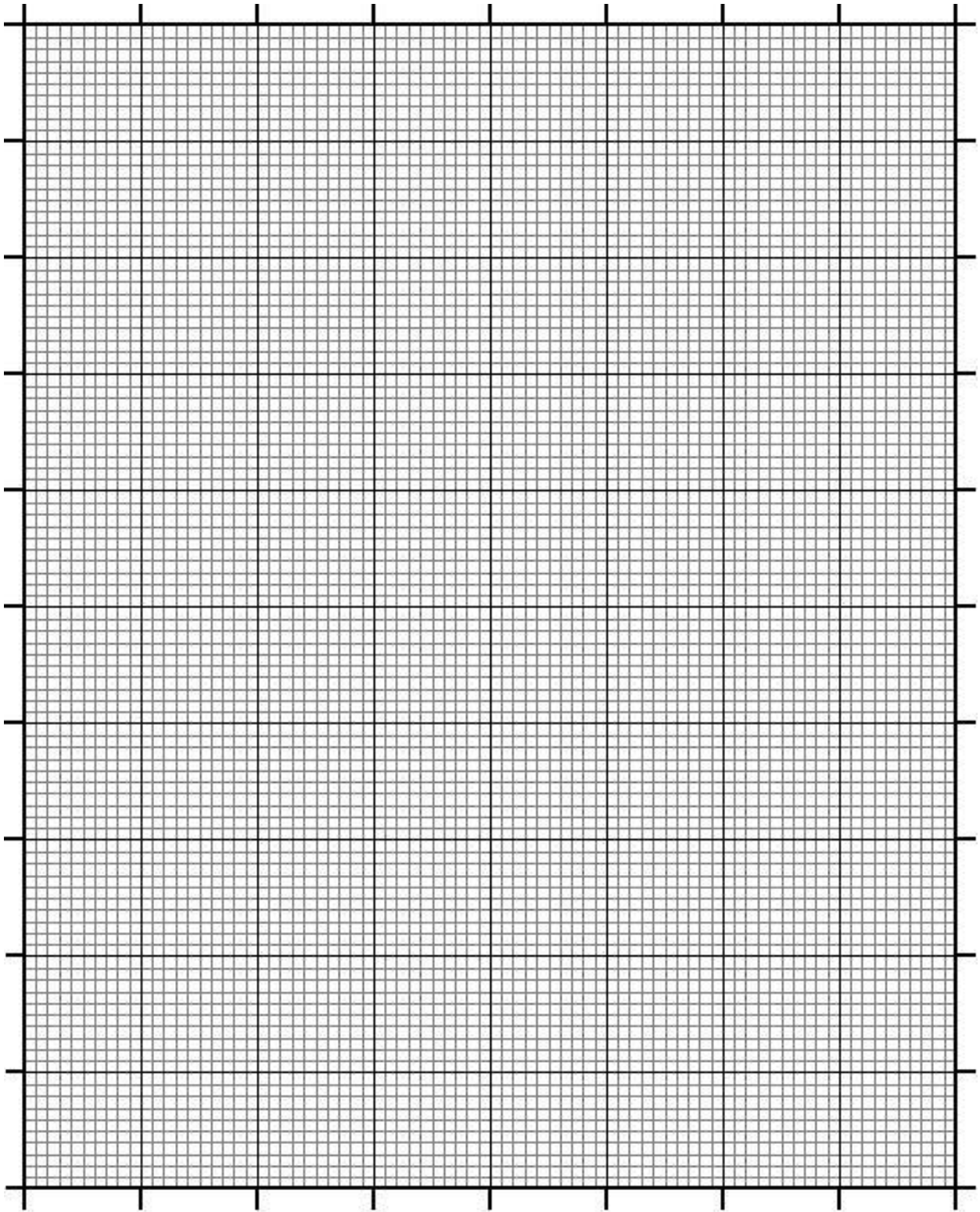
Resultados:

- Graficar la velocidad de catálisis vs la concentración de sustrato inicial.
- Reportar los valores de K_m y V_{max} experimentales de esta enzima y compararlas en la discusión con los valores bibliográficos.

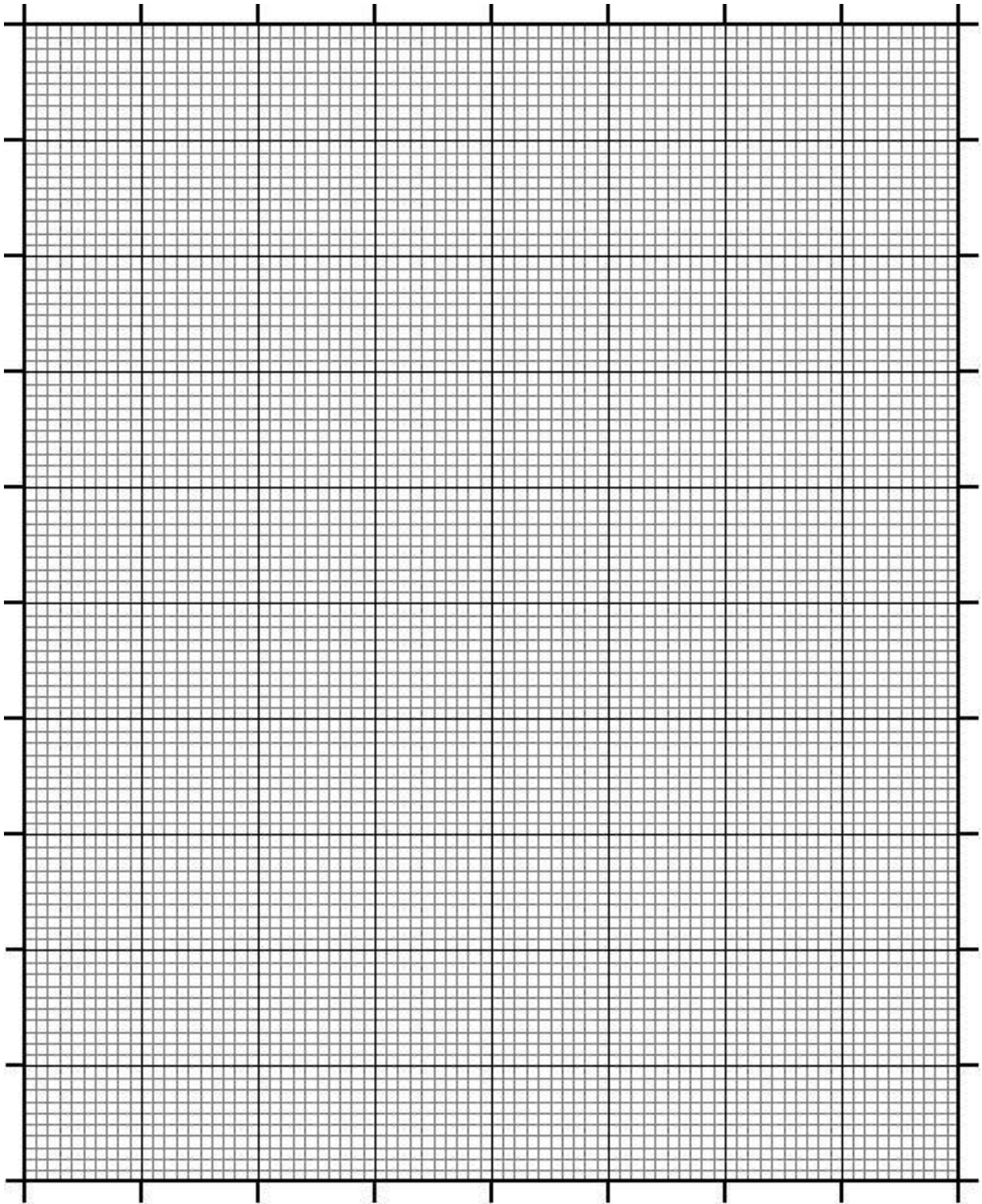
Cuestionario:

1. ¿Cuál es la reacción que cataliza la amilasa?
2. Importancia de la amilasa como componente de la saliva.
3. ¿Para qué se calienta parte de muestra de saliva?
4. Considerando la concentración de amilasa que existe en la saliva y los parámetros cinéticos que obtuviste. ¿Cuál es el número de recambio de esta enzima? (Discutir)
5. ¿Qué importancia tienen las determinaciones cinéticas en la odontología y en la bioquímica?

Graficar las cinéticas obtenidas:



Graficar la Cinética de la amilasa y calcular la V_{max} y K_M



PRÁCTICA VII

VELOCIDAD DE RECAMBIO SALIVAL Y CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS.

Protocolo financiado por PAPIME-EN205403

Introducción.

La alimentación consiste en proporcionar alimentos de forma consciente y voluntaria al cuerpo e ingerirlos y la nutrición es el conjunto de los procesos fisiológicos en los que el organismo recibe y transforma y utiliza componentes de los alimentos, es un proceso inconsciente que depende de eventos como es la digestión, la absorción y transporte. La salud depende de los nutrientes que consumimos y esta ingesta está influenciada por factores sociales y culturales. Los nutrientes se agrupan en dos categorías los macronutrientes (son los que ocupan la mayor proporción) y los micronutrientes (están presentes en muy pequeña proporción).

Los macronutrientes están formados por proteínas, carbohidratos y lípidos. De estas moléculas se obtiene energía cuando son oxidados o cuando el consumo es superior a las necesidades calóricas se almacenan como glucógeno o triglicéridos. Por otra parte los micronutrientes son los minerales y vitaminas y participan en favorecer el metabolismo celular.

La alimentación y la nutrición son importantes en las fases de desarrollo, erupción y conservación de los dientes. Una vez que han brotado los dientes, la dieta y la ingesta de alimentos influyen en el desarrollo y mineralización de los dientes. Sin embargo, el consumo de carbohidratos fermentables y la frecuencia de las comidas son los factores que regulan la producción de ácidos por las bacterias presentes en la placa dentobacteriana lo que provoca la desmineralización del esmalte y que en última instancia conduce al desarrollo de la caries. La caries dental es una enfermedad infecciosa ocasionada por microorganismos que producen ácidos como resultado de la fermentación de los carbohidratos que están presentes en la boca.

Para que ocurra la caries se requiere de la presencia simultánea de 4 factores: 1) Huésped o superficie dental susceptible; 2) Microorganismos cariogénicos como *Streptococcus mutans* presentes en la placa dental o en el medio bucal; 3) Dieta rica en carbohidratos fermentables que se utilizan como sustratos para el metabolismo bacteriano; 4) Tiempo en el que las bacterias transportan los carbohidratos al citoplasma y los fermentan para la producción de ácidos, que al ser liberados provocan la disminución el pH de saliva inferior a 5.5 (valor en el que se produce la disolución de los cristales de hidroxapatita y se establece el proceso carioso). (Fig. 1).

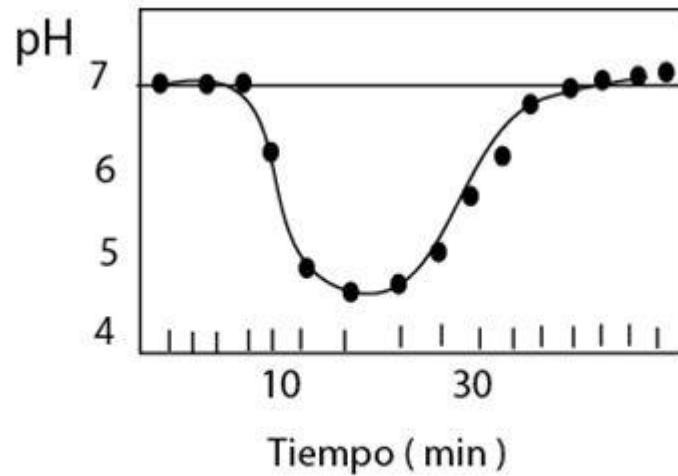


Fig. 1 Curva de Stephan. En la figura se muestra la acidificación del pH salival al ingerir carbohidratos.

Como resultado de la masticación de los alimentos y por el efecto del enjuague de la saliva se eliminan los azúcares y componentes de las comidas. Sin embargo factores individuales que están relacionados con la dieta y la fisiología de los individuos afectan el recambio de carbohidratos como: Edad; proporción del flujo de saliva y viscosidad; la actividad muscular y coordinación psicomotriz; la anatomía del diente y boca; la ingesta de comidas pegajosas y la concentración alta de azúcar en la comida.

Durante la noche se produce una disminución en la secreción salival, por este motivo es poco recomendable la ingestión de carbohidratos en las noches. Las comidas que requieren de una masticación activa aumentan la secreción de saliva y la capacidad amortiguadora, de esta forma disminuye su viscosidad y retorna a un pH normal.

Los hidratos de carbono son la principal fuente en la obtención de energía y pueden reducir el pH salival a niveles críticos como se muestra en la tabla I.

Tabla I. Efecto del metabolismo bacteriano sobre la ingesta de diferentes hidratos de carbono y su efecto sobre el desarrollo de la caries.

HIDRATOS DE CARBONO	CLASIFICACION	METABOLISMO BACTERIANO		CARIOGENICIDAD
		VÍA	PRODUCTO	
GLUCOSA	ALDOHEXOSA	GLUCÓLISIS ANAERÓBICA	ÁCIDO LÁCTICO	+
FRUCTOSA	CETOHEXOSA	GLUCÓLISIS ANAERÓBICA	ÁCIDO LÁCTICO	+
SACAROSA	DISACÁRIDO (Glucosa + Fructosa)	GLUCÓLISIS PARA: <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de polímeros extracelulares. • Síntesis de polímeros intracelulares. 	ÁCIDO LÁCTICO GLUCANO EXTRACELULAR O FRUCTANO	+++
ALMIDÓN	POLISACÁRIDO	DESCONOCIDO	GLUCOSA Y ACIDO LACTICO	+
CELULOSA	POLISACÁRIDO	DESCONOCIDO	DESCONOCIDO	-

Los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos son sustratos de las bacterias presentes en la placa dentobacteriana los cuales son utilizados y fermentados en forma ácidos los promueve el desarrollo de la caries.

Objetivo

Como hemos señalado en las líneas anteriores existen evidencias experimentales que señalan que la saliva influye en el desarrollo de la caries. Entre las evidencias experimentales se demostró que animales a los que se les extirpó quirúrgicamente las glándulas salivales y se les suministró una dieta rica en carbohidratos como la sacarosa (disacárido compuesto de glucosa y fructosa) desarrollaron más caries en comparación con los animales que no habían sufrido ningún tratamiento.

Se ha demostrado que existe otro parámetro importante como la diferencia entre el consumo de alimentos y la ingesta de agua; el tiempo que dedicamos al consumo de alimentos; el tiempo de retención de los mismos y otros factores como la composición del placa dentobacteriana y la maduración del esmalte.

-Analizar la capacidad de recambio salival en los alumnos que realizarán la práctica.

Materiales y Métodos.

Alumnos.

Materiales:

- Agua desionizada.
- 3 Canicas.
- 1 Caramelo.
- 1 Celda para espectrofotómetro.
- 1 Espectrofotómetro.
- 3 pipetas. (2 de 1 mL y 1 de 5 mL)
- 1 Propipeta
- 3 Tubos con tapa.
- 3 Tubos ensaye.

Reactivos.

1. Reactivo de arsenomolibdato.
2. Reactivo de Cobre mezclado.
3. Agua desionizada.

- Reactivo de sulfato de cobre:

Disolver 28 g de Na_2HPO_4 anhidro y 4 g de tartrato de sodio y potasio en aproximadamente 700 mL de agua destilada. Agregar 100 mL de NaOH 1N agitando, y luego 80 mL de CuSO_4 10% (p/v). Cuando se disolvió todo agregar 180 g de Na_2SO_4 anhidro y diluir a 1 litro. Dejar descansar un día y luego decantar el sobrenadante claro. Este reactivo se puede guardar indefinidamente.

- Reactivo de arsenomolibdato:

Disolver 25 g de molibdato de amonio en 450 mL de agua destilada, agregar 21 mL de H_2SO_4 conc. y mezclar. Luego agregar 3 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 25 mL de agua dest. Mezclar e incubar a 37°C por 24-48 hs. Guardar en frasco color caramelo, preferiblemente en un armario.

- Glucosa estándar:

Solución stock de glucosa 200 microgramos por mL

Determinación:

Se debe hacer un blanco y una curva de calibración con cada serie de muestras. La reacción se lleva a cabo en tubos de ensayo (16 mm x 150 mm) con tapones de vidrio o bolitas de vidrio. Colocar en sendos tubos 2 mL de reactivo de cobre y 2 mL de solución a ensayar. Poner los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Enfriar 5 min. en agua corriente. Agregar 1 mL de reactivo arsenomolibdato, mezclar y llevar a un volumen definido entre 10 y 25 mL, dependiendo de la intensidad del color. Medir absorbancia a 520 nm.

Nota: El color es muy estable.

Equipo:

Agitador de 90° Vari-mix.
Agitador magnético de temperatura controlada.
Espectrofotómetro.
Máquina de hielo.

Profesor.

6 tubos.
2 Pipetas de 1 mL .
2 Pipetas de 5 mL

Procedimiento experimental.

Alumnos.

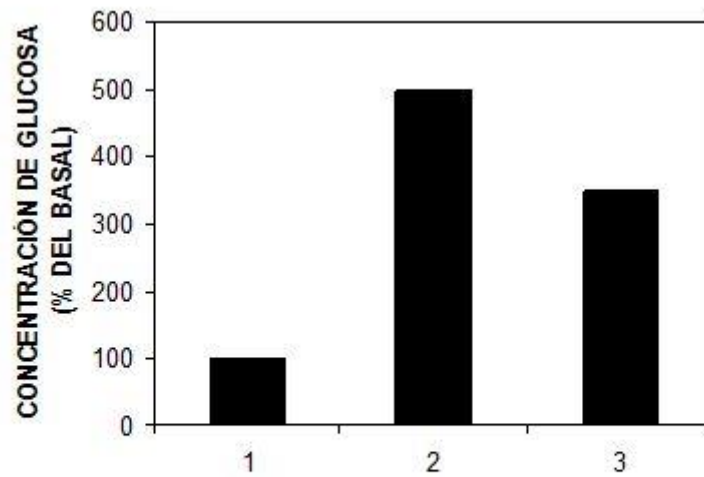
1. Estimular la salivación con trozo de parafina
2. Colectar 1 mL de saliva y depositar en un tubo que se marcará como. "Tubo 1".
3. Incubar durante 5 minutos la saliva a temperatura ambiente en agitación a 90°.
4. Posteriormente colocar el tubo en hielo.
5. Ingerir un dulce por 5 minutos.
6. Inmediatamente salivar 1 mL
7. Depositar la saliva en un tubo y etiquetar como "Tubo 2".
8. Incubar en agitación de 90° durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Dejar la muestra de saliva en baño con hielo.
10. Esperar 10 minutos y salivar 1 mL nuevamente y etiquetar el tubo como "tubo 3".
11. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente en agitación de 90°
12. Colocar la muestra de saliva en baño con hielo.

PROFESOR.

CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS						
TUBOS	1	2	3	4	5	6
Muestra (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Agua (ml)	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5
Reactivo de cobre mezclado (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
MEZCLAR BIEN, COLOCAR LOS TUBOS EN AGUA HIRVIENDO DURANTE 10 MINUTOS. ENFRIAR EN HIELO, MEZCLAR BIEN						
Arsenomolibdato (ml)	2	2	2	2	2	2
Agua (ml)	4	4	4	4	4	4
LEER A 520 nm EN CELDA DE 1 CM						

Análisis de Resultados.

- 1.- Calcular la concentración de glucosa ($200 \mu\text{g/ml}$) de la curva patrón que realizó el profesor.
- 2.- Realizar la gráfica.
- 3.- Interpolar los resultados de los problemas (tubos 1,2,3) en la gráfica de la curva patrón y calcular la concentración de glucosa por ml de saliva en cada tubo.
- 4.- Calcular la concentración de glucosa mediante la regresión lineal obtenida de la curva patrón.
- 5.- Tabular estos resultados.
- 6.- Realizar un histograma como se muestra a continuación y analizar los resultados, en cuanto a la capacidad que tiene la saliva del donador en depurar el carbohidrato ingerido.



- 1: Corresponde al tubo 1**
- 2. Corresponde al tubo 2**
- 3. Corresponde al tubo 3**

7.- Investigar la concentración de glucosa en saliva no estimulada.

8.- Investigar el papel que tiene la saliva en el control de la caries y la enfermedad periodontal.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Newburn E. (1994) Cariología. Ed. Limusa. Colocación en la biblioteca de la Facultad de Odontología. Clasif. RK331/N4718.

PRÁCTICA VIII

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Objetivo:

- Conocer la técnica de electroforesis.
- Separación de proteínas de saliva en un gel de poliacrilamida.
- Conocer el sistema de electroforesis vertical para separación de proteínas
- Aplicar los conceptos de desnaturalización.
- Relacionar el pH con la carga de macromoléculas
- Conocer los métodos de tinción de proteínas.

Bibliografía.

- Laemmli (1970), Nature, 277, p. 680.
- Sambrook, J., Fritschh, and Maniatis, T. Molecular cloning a Laboratory. 2daEdition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Hames, BD.& Rickwood, D. Gel electroforesis of protein, a practical approach.IRL. Perss. Oxford. Washington D.C. 1983

Introducción:

Electroforesis significa transporte de electricidad, fenómeno que permite el desplazamiento de una partícula con carga a través de un medio en el que se aplica corriente eléctrica. La carga de la partícula dependerá de factores tales como: pH, fuerza iónica, gradiente de voltaje y las interacción con el soporte. La muestra se desplazará al polo positivo o negativo en función de la carga que presente.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida se denomina comunmente como PAGE “polyacrilamide gel electrophoresis”, es una de las herramientas más ampliamente utilizada para el análisis de proteínas. Presenta un conjunto de bondades, entre las que se encuentran que es un método rápido, económico y de alta sensibilidad.

La electroforesis de poliacrilamida es la más ampliamente utilizada para analizar mezclas de proteínas. Es una técnica muy útil para la determinación de la masa molecular relativa de las proteínas. Una vez que las muestras son aplicadas, se pasa corriente a través del gel. Las muestras correrán de forma inicial en un gel denominado concentrador (4% acrilamida) de poro muy ancho que tendrá el propósito de permitir que las proteínas se agrupen en una línea antes de entrar al gel separador. Se utiliza el azul de bromofenol con la finalidad de observar el frente de corrida, toda vez que el colorante ha llegado al otro extremo del gel, la corriente se apaga y los geles son removidos para ser teñidos en

solución Azul de Coomassie. Los pesos moleculares de las proteínas serán determinados comparando la movilidad con la de proteínas estándar de peso molecular conocido. Se analizan los pesos realizando una gráfica de distancia de migración contra el peso molecular de las proteínas estándar. Esta gráfica servirá para interpolar los datos obtenidos con las proteínas de peso molecular desconocido.

Geles de Poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE es una técnica que se utiliza con frecuencia en los laboratorios de investigación, fue descrita por primera ocasión por el investigador Laemmli y en términos generales es una electroforesis desnaturizante porque las muestras son sometidas al calor y en presencia de β -mercaptoetanol que es un agente reductor que actúa reduciendo los puentes disulfuro de las proteínas y se le adiciona docecil-sulfato de sodio (SDS) que desnaturiza y recubre a la proteína con cargas negativas. SDS-PAGE emplea dos amortiguadores. La concentración de la muestra se produce en el gel concentrador y en el gel separador las muestras se separan de acuerdo al peso molecular.

El rango efectivo de separación de los geles está en función de la concentración de poliacrilamida y la cantidad de radicales libres entre los dos polímeros. El tamaño del poro disminuye cuando se incrementa la concentración de acrilamida. (Tabla VIII.1)

Tabla VIII.1 Intervalo de separación de proteínas	
Concentración de Acrilamida. (%)	Intervalo de Separación (kDaltons)
5	55 – 212
7.5	39 – 94
10	16 – 68
15	12 – 43

Reactivos:

Acrilamida.

Azul de Bromofenol.

Azul de Coomasie G250.

Bis acrilamida.

Dodecil sulfato de sodio.

Glicerol.

Marcadores de peso molecular.

Persulfato de Amonio.

Temed.

Tris.

Soluciones para electroforesis de proteínas.

Solución de Acrilamida al 30% Bis acrilamida al 0.8 % (NOTA: LA ACRILAMIDA ES NEUROTÓXICA)

30 g de Acrilamida (PM71.08)

0.8 g de Bisacrilamida

Disolver en 30 mL de agua y posteriormente aforar a 100 mL

NOTA: LA ACRILAMIDA ES NEUROTÓXICA POR LO QUE DEBE SER MANIPULADA UTILIZANDO GUANTES Y CUBREBOCA.

Solución amortiguadores de Tris 1.5 M pH 8.8 (AMORTIGUADOR QUE SE UTILIZA PARA EL GEL SEPARADOR)

36.3 g Tris (PM 121.1)

Añadir 150 mL de agua

Ajustar el pH 8.8 con HCl y aforar a 200 mL

Almacenar la solución hasta 3 meses a 4°C en la oscuridad.

Solución amortiguadora de Tris 0.5 M pH 6.8 (AMORTIGUADOR PARA EL GEL CONCENTRADOR)

3.0 g Tris (PM 121.1 g/mol)

Anadir 40 mL de agua

Ajustar a pH 6.8 con HCl

Almacenar hasta 3 meses a 4°C en la oscuridad.

Solución de corrimiento Tris - Glicina pH 8.3

Tris. 12.13 g

Glicina 57.63 g

Dodecil sulfato de sodio 4.0 g

Ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1 L

Persulfato de Amonio al 10%

TEMED

Solución amortiguadora para las muestras 5x

Tris	0.151 g
Glicerol	2.5 mL
Azul de Bromofenol 0.25%	1.0 mL
Aforar a 5 mL	

Solución teñidora de proteínas

Preparar una solución de azul de coomasie G250 al 0.2% p/v. Se le agrega el mismo volumen de ácido sulfúrico, se mezcla y se deja reposar.

LA SOLUCIÓN SE FILTRA CON PAPEL WHATMAN NO 1, SE MIDE EL VOLUMEN FILTRADO Y SE LE AGREGA 1/9 DEL VOLUMEN DE KOH 10N LA SOLUCIÓN VIRA A UN COLOR PÚRPURA OSCURO. SE AGREGA TCA 100% P/V A QUE QUEDE EN UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE 12% P/V. LA SOLUCIÓN AZUL ESTÁ LISTA PARA USARSE.

PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA AL 10 %

REACTIVO	GEL SEPARADOR
Solución de Acrilamida	1666 microlitros.
Trisma base pH 8.8	1875 microlitros.
Agua	1425 microlitros.
TEMED	5 microlitros.
Persulfato de amonio	25 microlitros.
Dodecil sulfato de sodio	150 microlitros.

REACTIVO	GEL CONCENTRADOR
Solución de Acrilamida	1250 microlitros.
Trisma base pH 6.8	1875 microlitros.
Agua	4200 microlitros.
TEMED	7.5 microlitros.
Persulfato de amonio	25 microlitros.
Dodecil sulfato de sodio	750 microlitros.

Procedimiento:

Elaborar el gel separador y la solución se adiciona al sistema de electroforesis dejando un espacio de 3 cm

Esperar a que la solución cambie del estado líquido a gel .

Proceder a preparar el gel concentrador.

Insertar los peines entre las placas de vidrio y se vierte el gel concentrador se espera a que forme el gel para retirar los peines.

Adicionar la solución amortiguadora de corrimiento en la cámara superior e inferior del equipo de electroforesis.

Cuantificación de las muestras: se cuantificarán de acuerdo a la técnica de Bradford. Se tomarán 50 microgramos de la muestra y se mezclarán con la solución amortiguadora para muestras (5x) hasta completar un volumen de 6 microlitros.

Añadir solución amortiguadora de muestra (5X), la proteína guarda una relación de 4:1, es decir si de la solución de la proteína se requiere tomar 24 μL entonces se tomarán 6 μL de solución amortiguadora de muestra.

Incubar las muestras durante 5 minutos a 100°C , centrifugar las muestras (un pulso a 5000 rpm) para concentrar las muestras en el fondo del tubo eppendorf.

Aplicar las muestras y los patrones de peso molecular en cada pocillo utilizando micropipetas con punta fina.

Tapar las cámara de electroforesis y conectar los cables a una fuente de corriente continua y verificar la polaridad: rojo (+) y negro (-)

Encender la fuente y aplicar 80V hasta que el frente corrida entre al gel separador y posteriormente cambiar la corriente a 120V.

Cuando el frente corrida alcance la parte inferior del gel, apagar la fuente, desconectar los cables y desmontar la cámara.

Separar las placas de vidrio y retirar el gel.

Colocar el gel en solución teñidora durante 1 hora.

Posteriormente pasar el gel a solución desteñidora y colocar esponjas para que absorban el colorante.

Calcular el factor de corrimiento ó movilidad relativa (R_f) se calcula dividiendo la distancia en mm recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el frente de corrida que corresponde al colorante azul de bromofenol.

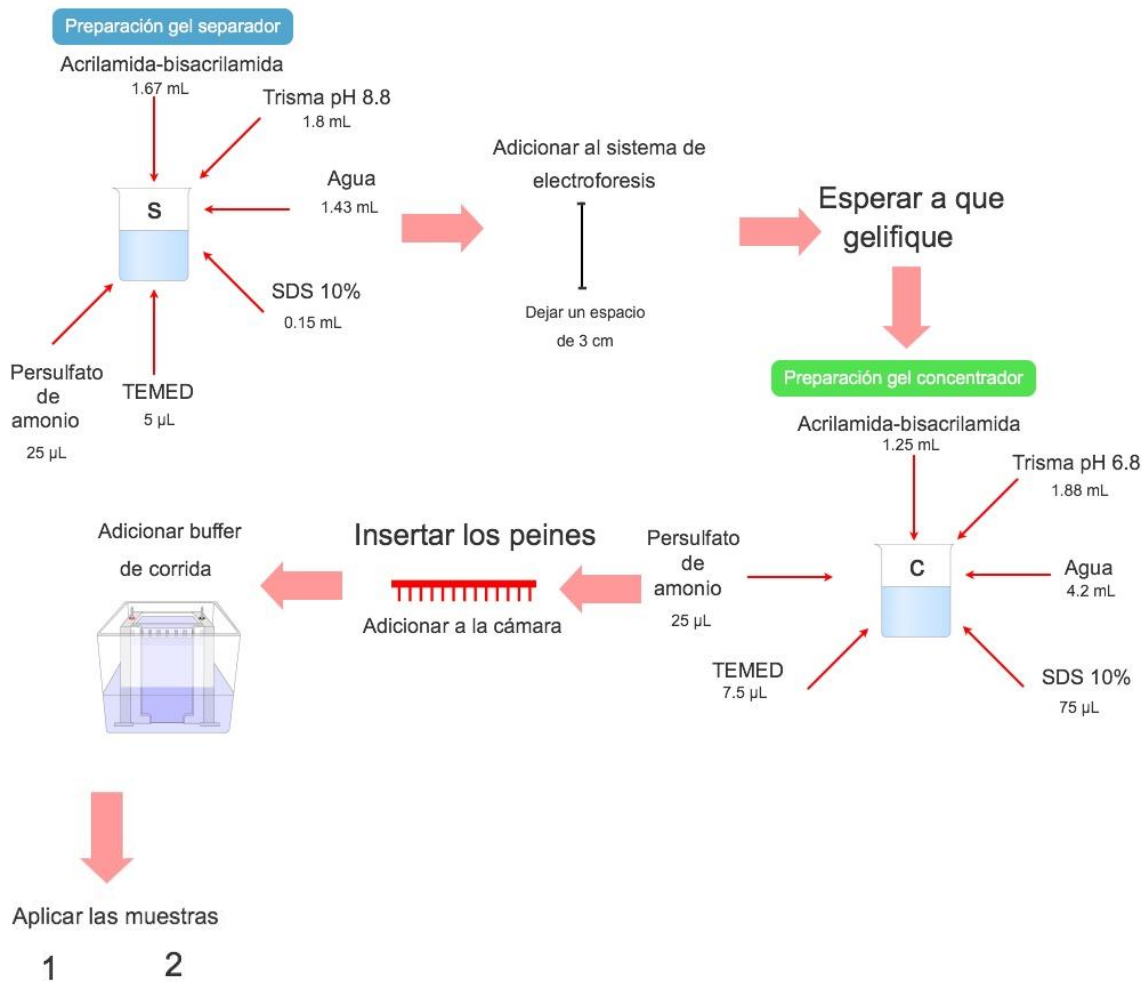
Se grafica el logaritmo del peso molecular de los marcadores contra la movilidad relativa.

Calcular el peso molecular de las proteínas incógnita interpolando en el gráfico de curva de referencia para la estimación de peso molecular de las proteínas.

Aplicación de las muestras: Carriles

1	2	3	4	5	6
Marcadores de peso molecular.	Muestra de saliva total.	Muestra de sobrenadante de saliva.	Muestra de la pastilla de saliva.	Muestra de raspado bucal.	Muestra de fluido crevicular.

Diagrama de flujo:



Cuestionario:

1. Explicar en qué consiste la electroforesis.
2. ¿Por qué la electroforesis que se realizará en esta práctica se denomina electroforesis desnaturalizante?
3. Explicar que otros tipos de electroforesis se utilizan en la investigación Bioquímica.
4. ¿Qué proteínas presentarán mayor movilidad y cuáles menor movilidad?
5. ¿Qué reactivo se utiliza como frente de corrida?
6. Calcular el factor de corrimiento (R_f).
7. De acuerdo a las muestras que se correrán se esperan diferencias y porque.
8. Calcular el peso molecular de las muestras problema.

PRÁCTICA IX

AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Objetivo:

Aislar DNA de hígado de pollo.

Bibliografía:

- Lehninger, Principios de Bioquímica.
- Rendina. Técnicas de Bioquímica Aplicada. Ed. Interamericana.

Introducción:

Los ácidos nucleicos: el ribonucleico (RNA) y desoxirribonucleico (DNA) son las moléculas responsables de la herencia en los organismos y de los virus. Tienen como función primordial replicarse durante la división celular. Los ácidos nucleicos son polímeros lineales de nucleótidos que se unen entre sí a través de puentes fosfodiéster 3', 5' a los residuos azúcar. El DNA tiene números iguales de adenina y timina y de guanina y citosina.

Los ácidos nucleicos se encuentran asociados a proteínas, cuando se mezclan en soluciones con fenol o alcohol isoamílico se logra la precipitación de las proteínas mismas que son removidas por centrifugación.

El estudio de los ácidos nucleicos es la disciplina predominante en el campo de las Ciencias Biológicas. Su estudio es de tal impacto debido a que los ácidos nucleicos son las estructuras bioquímicas responsables de **ALMACENAR, TRANSMITIR Y EXPRESAR LA INFORMACIÓN GENÉTICA DE LOS SERES VIVOS**. El estudio sobre su caracterización y funcionamiento se remonta hasta 1869 en donde el químico suizo Johann Friedrich Miescher logró aislar el núcleo celular de los leucocitos y lo caracterizó como una sustancia nitrogenada rica en fosfatos y soluble en soluciones alcalinas a la que llamó nucleína.

Tuvieron que transcurrir tres décadas para que el químico alemán Richard Altmann (1899) desarrollara un protocolo que permitía la separación del compuesto rico en fosfatos de las proteínas y propuso que se cambiara el nombre de nucleína a ácido nucleico.

En el siglo XX es donde se desarrolló la gran explosión sobre la estructura y funcionamiento de los ácido nucleicos. Iniciando en 1920 con las investigaciones realizadas por Phoebus Aaron Theodor Levene quien analizó los componentes del ácido desoxirribonucleico llegando a la conclusión de que estaba compuesto de cuatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citocina y timina, además de un azúcar la desoxirribosa y el grupo fosfato; moléculas que en su conjunto se denominaron **nucleótidos** (base nitrogenada, azúcar y grupo fosfato). Así mismo y de forma errónea, concluyó que las cuatro bases nitrogenadas se encontraban en cantidades iguales y postuló una teoría denominada Tetra-nucleótido que consideraba que el DNA era una molécula repetitiva y que no tenía la capacidad de actuar como material genético.

Unos años después en 1928 Frederick Griffith descubrió la capacidad de transformación en cepas patógenas de *Streptococcus pneumoniae* y haciendo uso de restos de cepas patógenas pero muertas por calentamiento propuso la existencia de un factor transformador presente en estos microorganismos y en el año de 1944 Oswald Theodore Avery, Colin M MacLeod y Maclyn Mc Carty, destruyen de manera gradual diferentes macromoléculas y llegan a la conclusión de que el material transformante era el ácido desoxirribonucleico (DNA).

A mediados del siglo pasado Erwin Chargaff (1953) descubren el principio de equivalencia en el DNA llegando a la conclusión de [Adenina] = [Timina] y [Citosina] = [Guanina] y que la relación era de una purina = pirimidina y de esta manera aporta información sobre la estructura del DNA y de sus variaciones entre las especies.

Paralelamente, en el año de 1951 logró la cristalización del DNA y mediante ensayos de difracción de rayo X descubre las diferentes formas del DNA denominadas DNA-A y DNA-B y con los experimentos de Martha Chase realizando investigaciones de infecciones virales se demuestra que el DNA es el material responsable de la información genética.

En 1953 James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick proponen la complementaridad de las bases nitrogenadas, haciendo uso de los datos de Chargaff y Franklin, con lo que postulan el modelo de la doble hélice del DNA.

En 1958 Matthew Meselson y Frankllin Stahl demuestran que la replicación del DNA es semiconservativa y en 1961 Jacques Monod y Francis Jacob publican una serie de artículos en donde demuestran la regulación de la síntesis de proteínas y proponen el modelo del Operon. De igual manera, Marshall Nirenberg, Heinrich Matthaei, Har Gobin Khoran y Severo Ochoa descifran el Código Genético y en 1974 Sung-Hou Kim y Alexander Rich determinan la estructura tridimensional del tRNA.

En la Universidad de Cambridge en el año de 1977 el grupo de Frederick Sanger secuenció el DNA de cadena simple del virus $\phi\chi$ 174. Realizando sus investigaciones Phil Sharp en MIT y Rich Roberts en Cold Spring Harbor (1974), descubren las secuencias codificantes en eucariontes a las que denominaron intrones.

En 1981 Thomas R Cech descubre la actividad de autohidrólisis del intron I del RNA del protozoo Tetrahymena thermophila y en 1983 Altman reporta la actividad catalítica del RNA de la ribonucleasa P.

En 1987 inicia el proyecto del genoma humano y el siglo XXI inicia con la publicación del Genoma Humano y con estas investigaciones se busca con esperanza una era en donde predominará el estudio de la Biología Molecular, motivada para combatir todos los eventos socio-económicos que afectan a la humanidad como la hambruna, las enfermedades degenerativas y el desarrollo de nuevos fármacos que permitan una vida más sana y autónoma.

Definición

Los ácidos nucleicos son macromoléculas formadas por polímeros lineales de nucleótidos unidos entre sí por enlace fosfodiéster. Se clasifican en dos grandes grupos ácidos ribonucleicos y ácidos desoxirribonucleicos. A valor de pH 7.0 los grupos fosfatos están ionizados con carga negativa, las hebras de DNA se separan al ser calentadas.

Material:

- Gasas
- Licuadora.
- Pipetas de 10 mL.
- Varilla para agitar
- Vasos de precipitados

Material biológico:

Hígado de pollo.

Reactivos:

- β -mercaptoetanol.
- Citrato de sodio.
- Cloruro de Magnesio.
- Cloruro de sodio.
- EDTA
- Etanol.

- Lauril sulfato de sodio
- Sacarosa.
- Tris.

Soluciones:

- Solución SAS:
- Tris 0.01 M
- Sacarosa 0.3M
- Cloruro de magnesio 0.005 M
- Solución de resuspensión
- Tris 0.4 M pH 8.5
- EDTA salino pH 8.5
- EDTA 0.1 M
- NaCl 0.15 M
- Solución CSC
- Citrato de sodio 0.15M
- Cloruro de Sodio 1.5M

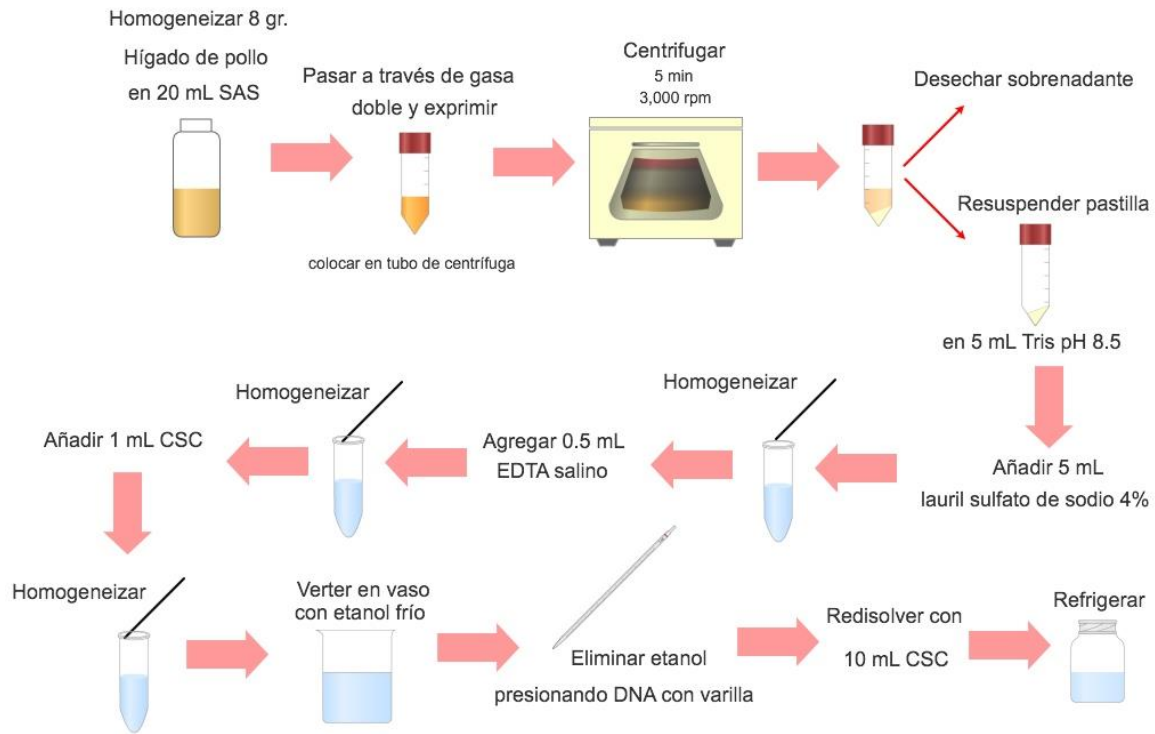
Método:

Aislamiento de DNA.

- 1.- Homogenizar 8 gr. de hígado de pollo en 20 mL de SAS (Tris 0.01M, Sacarosa 0.3 M, cloruro de magnesio 0.005 M, β -mercaptoetanol 0.005 M)
- 2.- Pasar el homogenizado a través de gasa doble y exprimir.
- 3.- Centrifugar durante 5 min. a 3 000 rpm.
- 4.- Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 mL de Tris 0.4 M pH 8.5
- 5.- Anadir 5 mL de lauril sulfato de sodio al 4% y homogenizar con una varilla de vidrio.
- 6.- Agregar 0.5 mL de EDTA salino. (EDTA 0.1 M / NaCl 0.15 M pH 8.0) y homogenizar.
- 7.- Añadir 1 mL de solución CSC (Citrato de sodio 0.15 M y cloruro de sodio 1.5 M) y homogenizar.
- 8.- Verter el contenido del tubo lentamente a un vaso de precipitado con etanol frío. El DNA asciende como nata blanca.

9.- Sacar el DNA con una varilla de vidrio eliminando el etanol al presionar con la pared del vaso. Redisolver con 10 mL de CSC y guardar en el refrigerador.

Diagrama de flujo:



Resultados:

Describir y explicar porque se realiza cada paso durante el aislamiento.

Explicar la utilidad de cada reactivo para la extracción.

Cuestionario:

- 1.- Describir las propiedades físico-químicas del DNA.
- 2.- Describir los experimentos que llevaron a la conclusión del que el DNA es el material genético.
- 3.- Describir la estructura del DNA.

PRÁCTICA X

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS.

Protocolo Financiado por PAPIME: PE203810

Objetivos.

En este protocolo experimental el alumno manejará las técnicas de crecimiento de microorganismos.

Comprenderá la utilidad de los plásmidos en las técnicas de DNA recombinante

Comprenderá el manejo de células competentes y su transformación.

Bibliografía:

Chen I, Christie PJ, Dubnau D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science*. 2005;310:1456–1460.

Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:241–249.

Canosi U, Morelli G, Trautner TA. The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol Gen Genet*.1978;166:259–267.

Dubnau D, Contente S, Gryczan TJ. On the use of plasmids for study of genetic transformation in *Bacillus subtilis*. In: Zandrazil S, Sponar J, editors. *DNA-recombination interactions and repair*. New York: Pergamon Press Oxford; 1980. pp. 365–386.

Kidane D, Graumann PL. Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell*. 2005;122:73–84.

Introducción:

Transformación bacteriana es un proceso en el que células eucariontes capturan material genético exógeno del entorno, alterando de esta forma su fenotipo y el de sus descendientes. La eficiencia con la que la célula receptora toma el DNA varía dependiendo de las propiedades físico-químicas del DNA como son tamaño, composición y grado de enrollamiento y varía además de acuerdo las diferencias inherentes de las cepas que se estén utilizando. Las células deben ser pre-tratadas para que tomen el DNA el tratamiento que reciben las células las convierte en células competentes.

La cantidad de células transformadas por cada microgramo de DNA exógenos es denominada eficiencia de la transformación. Se deben utilizar de 50 a 100 nanogramos de DNA porque un excedente puede inhibir el proceso de la transformación.

Factores que deben ser considerados cuando se desea realizar una transformación.

1.- **Tamaño del DNA** – Funciona mejor el DNA de doble cadena de al menos 5×10^5 daltones. Por tanto, la transformación es sensible a las nucleasas del medio ambiente.

2.- **Competencia de la célula receptora** – Algunas bacterias son capaces de incorporar DNA en forma natural. Sin embargo, estas bacterias solo toman al DNA en una etapa particular de su ciclo celular, cuando producen una proteína específica llamada factor de competencia. Cuando la bacteria se encuentra en este estadio se dice que es competente. Otras bacterias no son capaces de incorporar el DNA naturalmente, sin embargo en estas bacterias la competencia puede ser inducida in vitro mediante tratamiento con sustancias químicas (ej. CaCl_2).

Pasos en la transformación.

Incorporación de DNA: La incorporación de DNA en bacterias Gram positivas o Gram negativas es diferentes. Las bacterias Gram positivas el DNA se introduce en forma de moléculas de cadena sencilla y la cadena complementaria se sintetiza dentro de la célula receptora. Por el contrario las bacterias Gram negativas introducen el DNA de cadena doble.

En el laboratorio se utilizará el procedimiento de transformación en la bacteria *E. coli C41* con el plásmido pIVEX (que describe en la práctica de aislamiento de plásmidos) clonado con un gene que codifica para una proteína fluorescente de color verde (GFP). Este gene ha sido extraído de una medusa o “agua viva” que es fluorescente y bioluminiscente, su nombre: *Aequorea victoria*. La proteína fluorescente verdosa causa que la medusa florezca y brille en la oscuridad. Seguido del proceso de transformación, la bacteria expresa el gene de medusa adquirido y produce la proteína fluorescente, la cual causa que la colonia brille de un verde brillante bajo la luz ultravioleta.

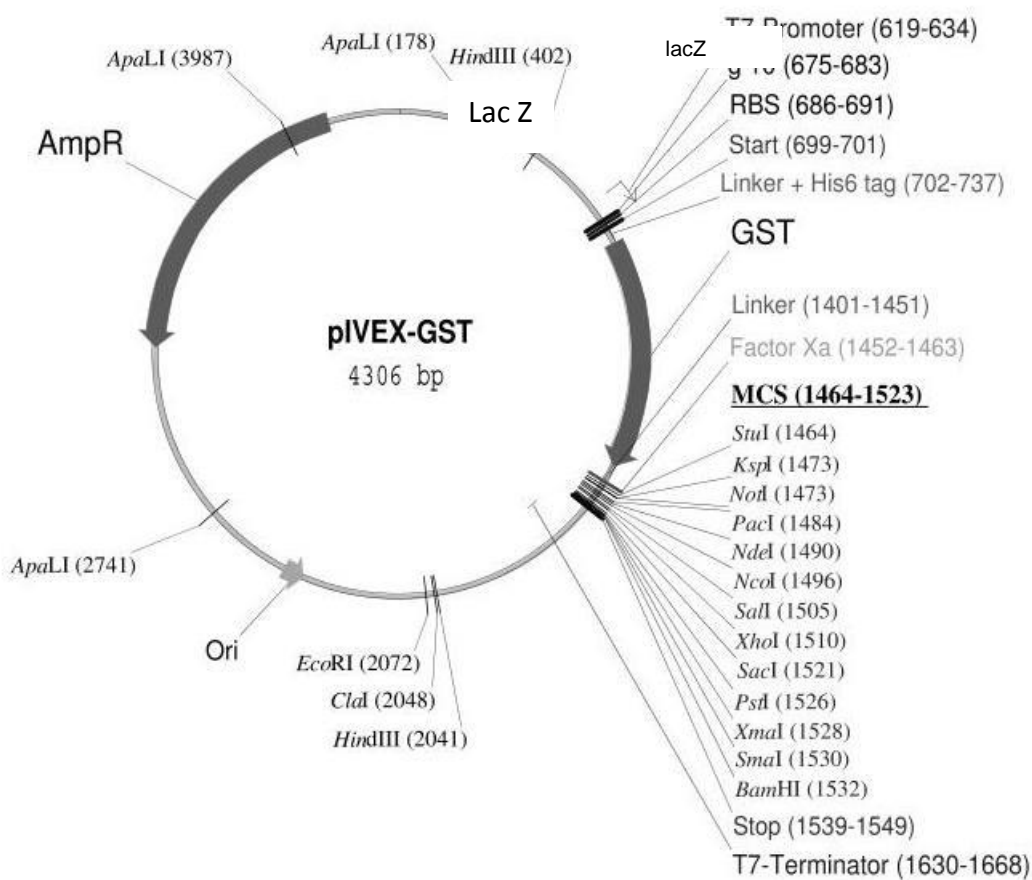
En esta actividad se aprenderá el proceso de transferir un gene de un organismo a otro con la ayuda de un plásmido. Las bacteria además de poseer un cromosoma grande, comúnmente poseen pequeños pedazos circulares de DNA llamados plásmidos (uno o más de estos). El ADN del plásmido usualmente contiene genes para una o más características que pueden favorecer la sobrevivencia de la bacteria. En la naturaleza las bacterias pueden transferir plásmidos entre ellas permitiendo así compartir genes beneficiosos. Este mecanismo en la naturaleza le permite a las bacterias adaptarse a nuevos ambientes. En este ejercicio se utilizará el plásmido pIVEX que contiene el gene para hacer la GFP. Se introducirá el pIVEX a la bacteria *E. coli*. A este procedimiento se le denomina transformación bacterial.

Los plásmidos pIVEX contienen de igual forma un gene de resistencia al antibiótico ampicilina (amp). El pIVEX también incorpora un sistema especial de regulación genética. Este sistema puede ser usado para el control de la expresión de la proteína fluorescente en células transformadas. El gene para GFP puede ser activado o prendido en células transformadas al añadir IPTG (isopropil-1-tio- β -galactósido) al medio de cultivo donde crecen las células.

La expresión de la proteína verde fluorescente está bajo el control del promotor Lac. Por este motivo GFP se induce al adicionar al medio de cultivo IPTG que se utiliza como un inductor del operón lac, ya que este análogo no hidrolizable, se capaz de unirse al represor LACI y de esta forma se inducirá la expresión de GFP.

Luego de realizar la transformación se crecen las células en medio LB y en presencia de ampicilina. La ampicilina evita que bacterias no transformadas crezcan en el plato de cultivo. Las colonias de células transformadas aparecen de color blanco en los platos que contienen medio LB y ampicilina. Para inducir la expresión del gene de GFP tenemos que crecer las bacterias en presencia de IPTG. Las bacterias crecidas en LB con IPTG y con ampicilina se verán fluorescentes de color verde en lugar de blancas.

4.3 Vector map



Material

Baño de temperatura controlada con agitación,
Cajas Petri.
Espectrofotómetro.
Micropipetas.
Mecheros.
Tubos eppendorf
Varilla de vidrio.

Material Biológico.

**El material biológico fue generosamente donado por la Dra. Nuria Sánchez Puig.
Investigadora del Instituto de Química del UNAM.**

Cepa *E. coli* C41
Plásmido PIVEX

Soluciones.

Ampicilina solución stock 4 mg/mL concentración final 50 µg/mL

Cloruro de Calcio 50 mM

Glicerol 100%

IPTG 10 mM

Medio Luria – Bertani (LB) g/litro.

10g de triptona.

5 gr de Extracto de levadura

5 g de cloruro de sodio.

1mL 1N NaOH

Medio LB sólido (por litro)

10 g de triptona

5 g de Extracto de levadura

5 g de cloruro de sodio

1 m 1N NaOH

15 g de Agar.

Etapas del proceso.

I PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES CON CLORURO DE CALCIO.

1. Descongelar un vial de glicerol de la cepa *E. coli* C41, adicionarlo a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contiene 50 mL de medio LB e incubarlo a 37 °C en un baño de agua durante una hora sin agitación. Posteriormente incubarlo de 2 a 3 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm. La densidad óptica del cultivo no debe sobrepasar 0.8 en el momento de la cosecha.

2. Transfiera 40 mL del cultivo a un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL y colecte las células por centrifugación a 5000 rpm durante 8 minutos a 4 °C en una centrífuga con un rotor JA20 o similar.

3. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en la mitad del volumen (20 mL) de cloruro de calcio 50 mM frío, incubar durante 20 minutos en baño de hielo, centrifugarlo como anteriormente.

4. Decantar el sobrenadante con mucho cuidado y resuspender el botón en la décima parte del volumen inicial (4 mL) de cloruro de calcio 50 mM frío, esto nos dará la suspensión de células competentes.

II PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES PARA ALMACENAMIENTO POR CONGELACIÓN

1. Transferir 166 μL de las células competentes en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril.
2. Adicionar 34 μL de glicerol 100% v/v estéril a las alícuotas de 166 μL de la solución de células competentes, dando una concentración final de 17% de glicerol.
3. Las células competentes se colocan a -70°C y pueden guardarse indefinidamente.
4. Para usarse, sacar del congelador y dejar descongelar por algunos minutos a 37°C . Seguir la técnica de transformación.

III TRANSFORMACIÓN.

Etiquetar dos tubos eppendorf estériles como control (C) y transformante (T).

Tomar 100 μL de células competentes y colocarlo en el tubo marcado con $^{\circ}\text{C}$ control.

Tomar 100 μL de células competentes y colocarlo en el tubo marcado con T transformantes a estas células añadir 10 μL de plásmido (50 nanogramos).

Homogenizar la mezcla por inversión.

Incubar en hielo 30 minutos.

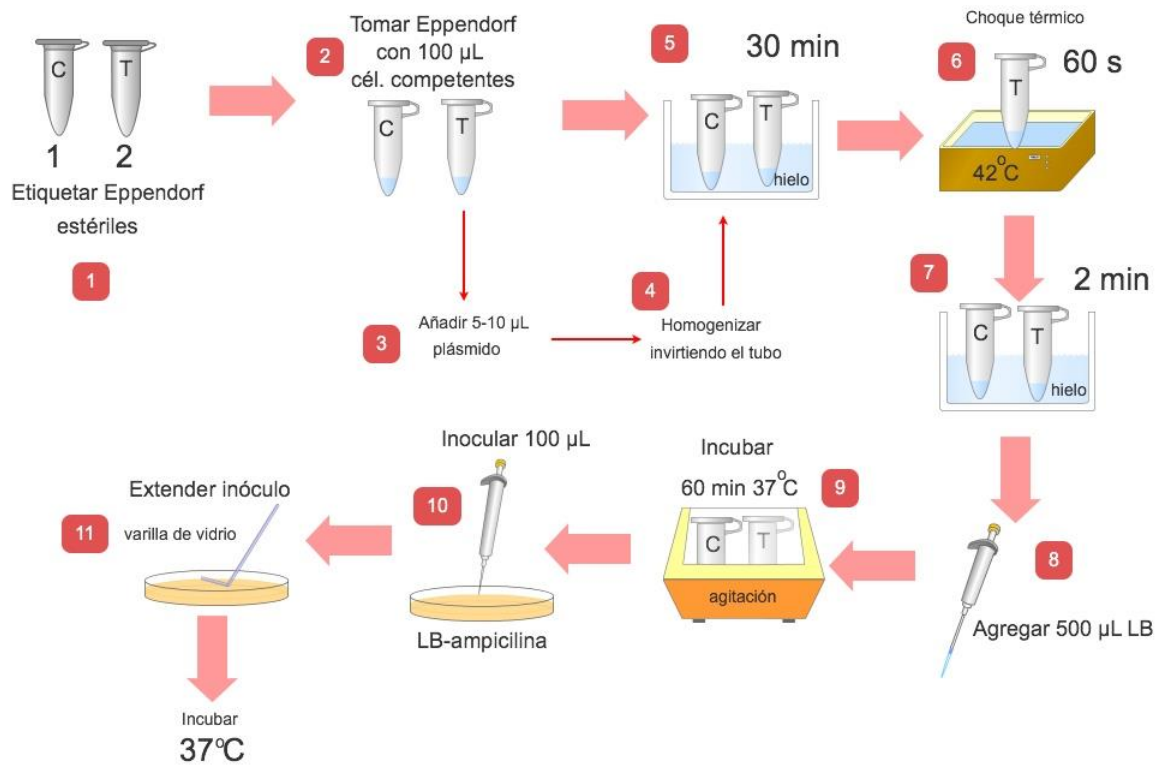
Incubar a 42°C durante 60 segundos.

Agregar adicionar 500 μL de medio LB y agitar por 45 minutos a 37°C .

Tomar 100 μL y colocarlos en caja petri con medio LB-ampicilina. Extender el inóculo ayudado con una varilla de vidrio.

Incubar a 37°C toda la noche.

Diagrama de Flujo



RESULTADOS

Llene la siguiente tabla.

	Control (C)			Transformantes (T)		
	# colonias	Factor de dilución	Células suspendidas (cels/ml)	# colonias	Factor de dilución	Células suspendidas (cels/ml)
LB (dilución 10^{-4})		$[1/(0.1)] * 10^4$			$[1/(0.1)] * 10^4$	
LB-ampicilina		1-0.1			1-0.1	

Calcular la proporción del control de células transformadas (#células no transformadas / total de células = _____

Calcule la proporción de células transformadas ($\# \text{células transformadas} / \text{total de células} = \underline{\hspace{2cm}}$)

Cuestionario.

- 1.- Describir las diferencias entre conjugación, transformación y transducción
- 2.- Esquematizar los componentes de un plásmido
- 3.- Indicar la utilidad de la proteínas recombinantes.
- 4.- Explicar que la competencia y porque las bacterias deben estar competentes para su transformación.

PRÁCTICA XI

AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS.

Proyecto financiado por PAPIIME: PE203810

Objetivos:

Conocer la importancia de los plásmidos en las técnicas de DNA recombinante.

Bibliografía.

- Chang AC, Cohen SN. Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of Staphylococcus plasmid genes in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Apr;**71**(4):1030–1034.
- Clewell DB, Helinski DR. Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 Apr;**62**(4):1159–1166
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). Protein Expr Purif. 2004 Sep 37 (1) 203-206.
- Olins PO, Rangwala SH. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1989;**264**:16973–16976.
- Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986;**189**:113–130. doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli* : a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). Prot Expr Purif. 2004;**37**:203–206. doi: 10.1016/j.pep.2004.04.025.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 1990;**185**:60–89.

Introducción.

Los plásmidos están presentes en las bacterias y mediante transfección en células de eucariontes. Contienen secuencias de DNA que sirven como sitio de origen de la replicación, lo que les permite replicarse de manera autónoma. Presentan un tamaño que oscila de 1 a 250 kilopares de bases (kpb), contienen de 2 a 30 genes. El número de plásmidos presentes en una célula varía enormemente. Los plásmidos que se utilizan experimentalmente contienen tres estructuras básicas: el gen clonado, el gen de resistencia a antibiótico y el origen de replicación.

Los plásmidos resultan sumamente interesantes en los estudios de biología molecular, porque son vectores que permiten introducir en una célula un fragmento de DNA que se desea clonar y en la célula anfitriona actúa de forma tal que se replica y expresa el producto resultante, a ésta estrategia metodológica se le denomina DNA recombinante.

El desarrollo en sistemas libres de células, es una estrategia muy novedosa para la producción de proteínas recombinantes. Estos sistemas utilizan la RNA polimerasa T7 de bacteriófago para promover la transcripción, mientras que los extractos enriquecidos en *E. coli* S30 aportan todas las enzimas necesarias para llevar a cabo la traducción. Para que los sistemas libres de células funcionen es necesario clonar el gen de interés en el vector. La clonación debe realizarse por debajo del gene del promotor T7. Para este propósito la familia de plásmidos pIVEX ha sido mejorada para ser utilizada en estudios *in vitro*, ya que además de tener el promotor T7, contiene el potenciador de traducción 10 del gene T7, la secuencia Shine-Dalgarno, colocada a distancia del codón de inicio, un sitio múltiple de clonación y al terminador T7 que evita de esta manera la degradación exonucleolítica 3'-terminal. En la figura que se muestra a continuación se indican los sitios funcionales de pIVEX.

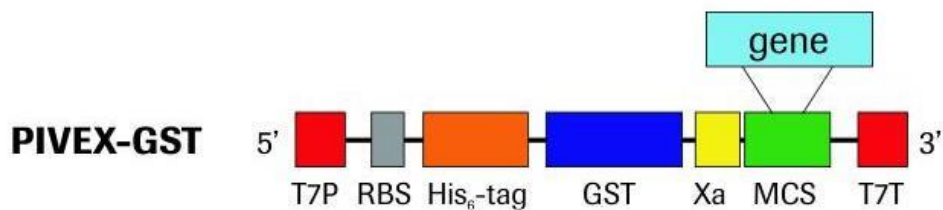
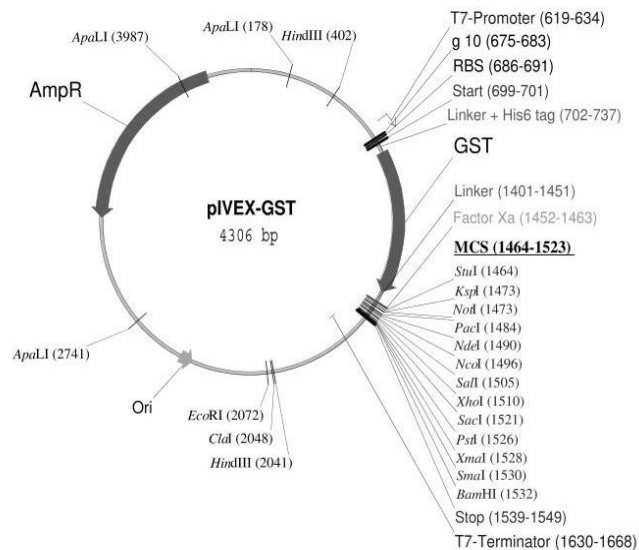


Fig. 1: Functional elements of pIVEX-GST.

Abreviaturas: T7P: promotor T7; RBS: sitio de unión del ribosoma; GST: proteína glutatión-S transferasa. Xa: factor Xa sitio de ruptura de proteasa, MCS: sitio múltiple de clonación.



En el laboratorio se utilizará pIVEX clonado con un gene que codifica para una proteína fluorescente de color verde (GFP). Este gene ha sido extraído de una medusa o “agua viva” que es fluorescente y bioluminiscente, su nombre científico es *Aequorea victoria*. La proteína fluorescente verdosa causa que la medusa florezca y brille en la oscuridad.

A continuación del proceso de transformación, la bacteria expresa el gene adquirido de la medusa para que se produzca la proteína verde fluorescente, la cual causa que la colonia brille de color verde brillante bajo la luz ultravioleta.

Material:

- Autoclave.
- Baño temperatura controlada con agitación.
- Estufa de temperatura controlada.
- Microcentrífuga.
- Transiluminador UV
- Vortex
- Tubos Eppendorf estériles.

Material Biológico.

La cepa *E. coli* C41 y el plásmido pIVEX, fue generosamente donado por la Dra. Nuria Sánchez Puig. Investigadora del Instituto de Química de la UNAM

E. coli C41

Plásmido pIVEX

Reactivos.

Amortiguador TE

10 mM Tris-Cl pH 7.5
1mM EDTA pH 8.0

Etanol 70%.

70 mL etanol absoluto
30 mL de agua desionizada

Medio LB + Ampicilina (100 mL).

1.0 g. de triptona.
0.5 g de extracto de levadura
0.5 g de cloruro de sodio

Solución de Acetato de Potasio pH 4.8

29.5 mL de ácido acético
Pastillas de KOH hasta ajustar el pH 4.8
Aforar con agua a 100 mL
Almacenar a temperatura ambiente no autoclavar.

Solución GTE (Glucosa/ Tris/ EDTA)

50 mM Glucosa
25 mM Tris-Cl pH 8.0
10 mM EDTA

Procedimiento Experimental.

INOCULAR 5 ML DE MEDIO LB ESTÉRIL CON UNA COLONIA DE BACTERIAS Y CRECER HASTA 0.4 DE DENSIDADES ÓPTICAS A 37°C.

Centrifugar 1.5 mL de las células y resuspender en 100 µL de solución GTE, incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Adicionar 200 µL de solución NaOH/SDS e incubar durante 5 minutos en hielo.

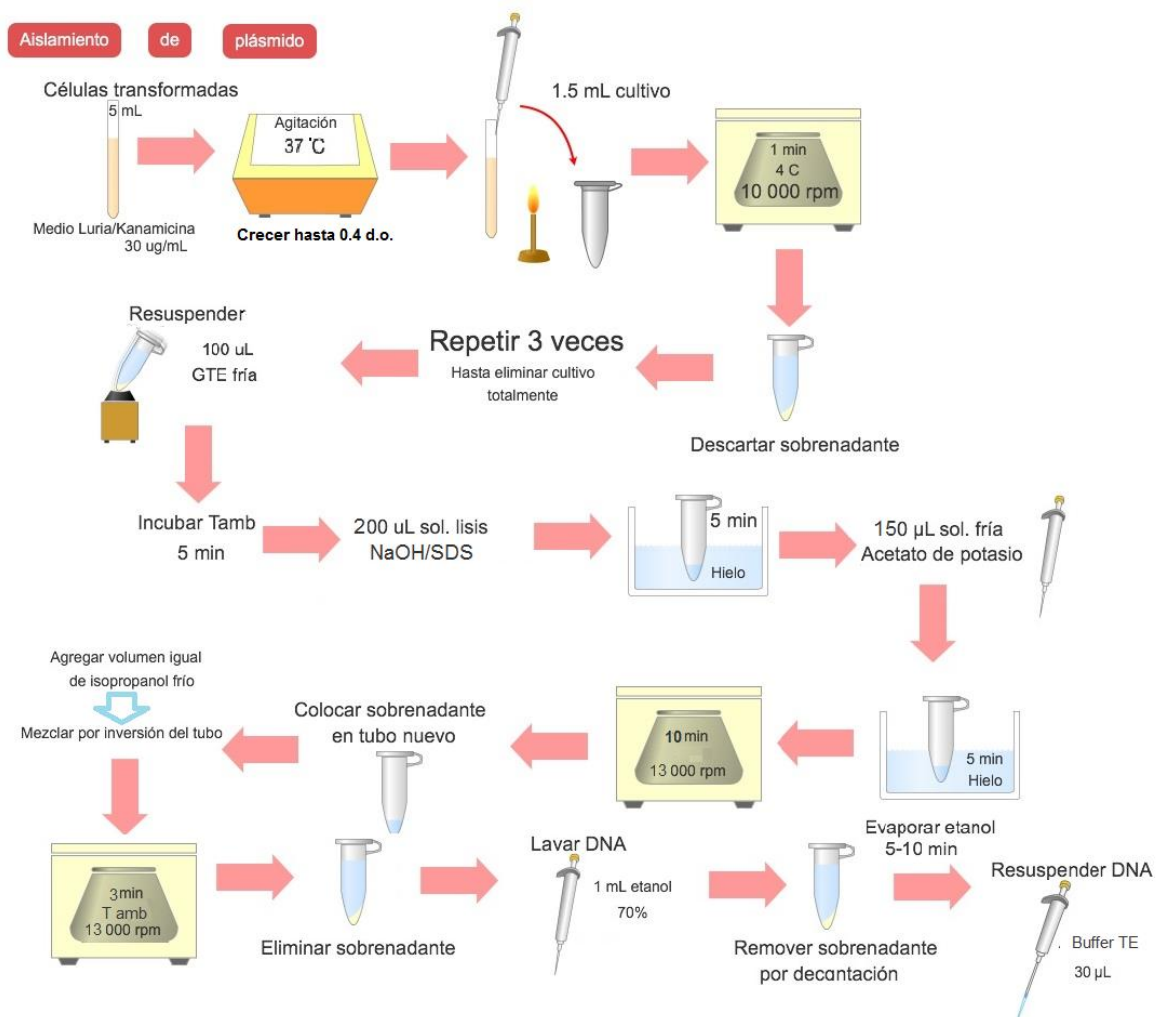
Adicionar 150 µL de la solución de acetato de potasio y agitar en vortex por 2 segundos y dejar en hielo durante 5 minutos.

Centrifugar 3 minutos a temperatura ambiente lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%.

Dejar que seque y resuspender la pastilla en 30 μ L de buffer TE.

Se requieren 5 μ L para la digestión con las enzimas de restricción.

DIAGRAMA DE FLUJO



Cuestionario:

Describir de donde se obtuvo la cepa C41 y su utilidad en la investigación.

Definir un plásmido y describir las propiedades de PIVEX.

Describir el procedimiento de Transformación.

Describir los métodos que existen para la transformación de bacterias.

PRÁCTICA XII

DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Proyecto Financiado por PAPIME PE203810

Objetivo:

Analizar las dos conformaciones del plásmido intacto, relajada y superenrollada.

Bibliografía.

Pingoud A, Wilson GG, Wende W. Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul;42(12):7489-527.

Wijshake T, Baker DJ, van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Oct;1842(10):1942-1950

Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:409-39

Introducción.

Las endonucleasas de restricción (“tijeras del DNA”) son enzimas que reconocen secuencias específicas en el DNA de doble hebra (de 4 a 8 nucleótidos) y cortan ambas hebras de la molécula.

Estas enzimas son utilizadas comúnmente por las bacterias como sistema de defensa frente a los bacteriófagos: el DNA propio de la bacteria no se corta, porque las secuencias que reconocen las endonucleasas de restricción están metiladas y, por tanto, protegidas del corte.

Se ha clasificado en tres grupos de estas las tipo II son ampliamente utilizadas en los laboratorios que realizan investigación en biología molecular debido a que reconocen secuencias palindrómicas.

También conocidas como endonucleasas, cortan los enlaces fosfodiéster a partir de una secuencia que reconocen.

La secuencia que reconocen es una secuencia palindrómica (secuencia que se lee igual en ambas direcciones).

Son extraídas de bacterias, donde actúan como mecanismo de defensa para degradar material genético extraño que entre en la célula.

Las enzimas, toman el nombre de las bacterias que la producen:

EcoRI: E = Género *Escherichia*.

co = especie *coli*

R = cepa RV 13

I = primera endonucleasa aislada de esta cepa

Los cortes que realizan estas enzimas pueden dejar extremos romo “rasurados” o extremos cohesivos “escalonados”. Las enzimas que realizan cortes romo no dejan bases desapareadas y las que dejan extremos escalonados dejan de 2 a 4 nucleótidos desapareados. Este último tipo de corte es muy útil porque permite unir fácilmente dos fragmentos de DNA de orígenes distintos, siempre que hayan sido cortados con la misma enzima de restricción. Con esta estrategia se permite crear moléculas híbridas y es la base de los estudios en Ingeniería genética.

Corte con distintas enzimas de restricción:

Pvu II (extremos romos): 5'...CAG CTG...3'

3'...GTC GAT...5'

Bam HI (extremos cohesivos con saliente.

5'...G GATCC...3'

3'...CCTAG G...5`

Eco RI (extremos cohesivos con saliente

5'): 5'...G AATTC...3'

3'...CTTAA G...5'

Hind III (extremos cohesivos con saliente

5'): 5'...A AGCTT...3'

3'...TTCGA A...5'

Pst I (extremos cohesivos con saliente

3'): 5'...CTGCA G...3'

3'...G ACGTC...5'

La digestión generada por las enzimas de restricción se evalúan en geles de agarosa en una cámara de electroforesis horizontal. El método se basa en que a pH neutro o alcalino, los grupos fosfato del DNA confieren a las moléculas una carga neta negativa y uniformemente distribuida. Así, para moléculas de DNA de la misma conformación sometidas a unas mismas condiciones electroforéticas, la velocidad de migración sólo va a depender de su tamaño, puesto que las moléculas más grandes tendrán más dificultad para atravesar los poros del gel que las más pequeñas.

Un plásmido no tratado con enzimas de restricción es una molécula circular de DNA y debido a esta característica, puede presentarse en dos conformaciones, principalmente: una forma superenrollada y una forma relajada. Aunque las dos tienen la misma masa molecular, migran de forma diferente debido a su forma o disposición espacial. La movilidad relativa de las dos formas depende principalmente del porcentaje de agarosa en el gel, aunque también influyen la corriente aplicada, la fuerza iónica del tampón y el grado de enrollamiento de la forma superenrollada. Bajo las mismas condiciones la forma superenrollada, más compacta, migra más deprisa que la forma relajada.

Para su observación los geles más comunmente utilizados son los de agarosa o poliacrilamida. Los geles de agarosa consisten en un polisacárido extraído de algas, que no es tóxico. Entre sus limitaciones se encuentra que tiene poco poder de resolución pero alto grado de separación. Separa fragmentos de DNA de 200 a 50,000 pares de bases (pb). Por otra parte, los geles de polímero de acrilamida son tóxicos y presentan un menor grado de separación pero alto poder de resolución. Es muy usado para fragmentos de DNA de 500 pb. Usado para separar mezclas de proteínas.

En los geles de agarosa se pueden utilizar concentraciones de ésta desde un 0.1%, válida para separar fragmentos grandes (800 000 pb), hasta un 3%, para separar fragmentos más pequeños (70 pb). Cuanto mayor es la concentración de agarosa menor es el tamaño de poro, por lo que la capacidad resolutive del gel permitirá separar fragmentos de masa molecular más pequeña.

MATERIAL

Agua estéril
Cámara de electroforesis
Hielo
Micropipetas.
Transiluminador UV.
Tubos eppendorf.

REACTIVOS:

- Albúmina bovina (BSA) stock: 1 mg/mL

- Agarosa 1% + 0.001 microgramo de bromuro de etidio
Pesar un 1 gramo de agarosa por cada 100 mL de solución tampón TBE calentar en horno microondas o autoclave hasta su disolución.

- Azul de bromofenol 0.25%

- Disolución de tinción: Bromuro de etidio 1.0 µg/mL en agua

- *EcoRI* 10 unidades (U) /µL en un medio de conservación que contiene 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM β-mercaptoetanol, 0,2 mg/mL BSA, 0,15% Triton-X100, 50% glicerol.

NOTA: 1 U se define como la actividad capaz de digerir en 1 h a 37°C, 1 mg de DNA del fago I en 50 mL

- Tampón de restricción para *EcoRI* (Tampón O+ 10x)

- 500 mM Tris-HCl, pH=7,5

- 100 mM MgCl₂

- 1M NaCl

- Patrones de masa molecular

- Tampón TBE (para la cámara de electroforesis) 10X

- Tris base 108 g

Ácido bórico 55 g.
40 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0
Aforar a 1 litro.

- Tampón de muestras 5x

-Glicerol 50% en TBE 1X

Procedimiento Experimental.

Digestión con endonucleasas de restricción

Preparar 4 tubos eppendorf con 10 µg de DNA cada uno.

Numeralos:

- 1.- Plásmido total sin digerir.
- 2.- Digestión con Eco R1.
- 3.- Digestión con BamH1.
- 4.- Digestión con Eco R1 y Bam H1.

Digestión con la enzima Eco R1 o BamH1 o ambas.

Según las especificaciones del proveedor adicionar la cantidad de enzima recomendada por cada microgramo de DNA.

El volumen final de la reacción será de 20 microlitros. El volumen se completa con agua.

Incubar a 37°C durante 1 h

Parar la reacción colocando los tubos en hielo.

Tomar 10 microlitros de la digestión y 3 microlitros de solución de muestra.

Preparar los geles.

Preparar durante la digestión enzimática.

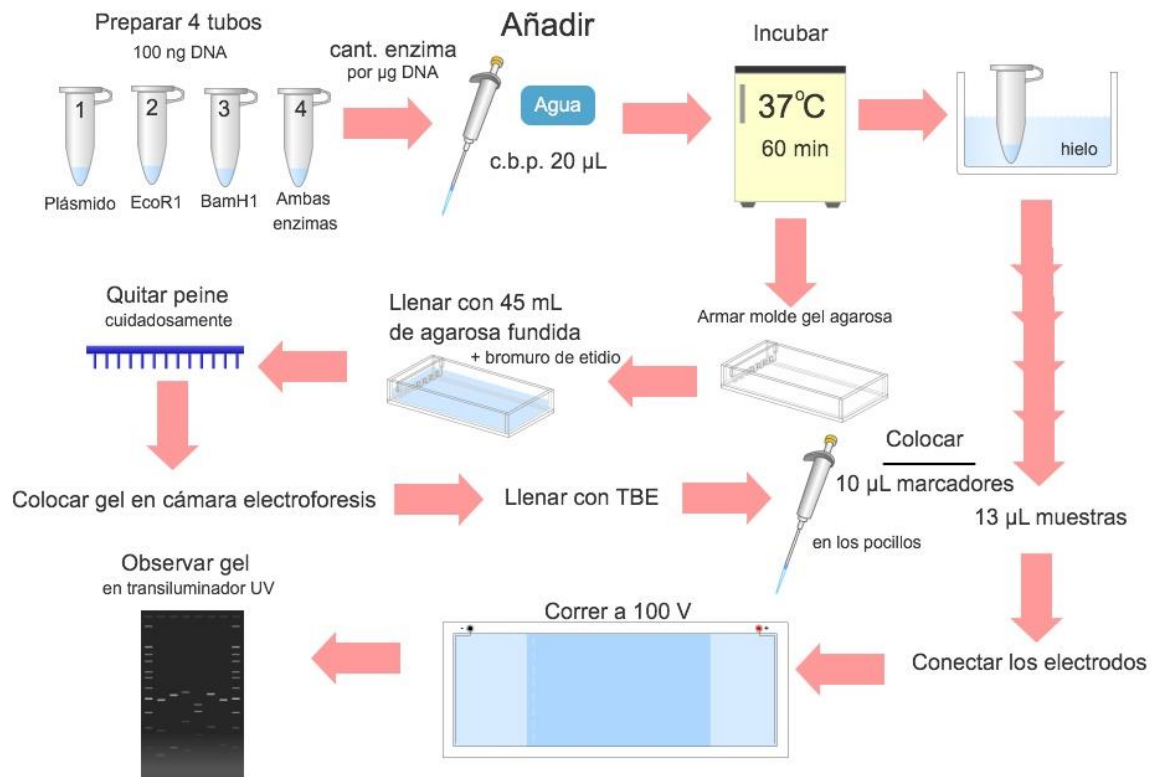
Preparar la cubeta de electroforesis y el molde donde se va a formar el gel. Ajustar el "peine", que formará los pozos de muestra, de modo que no toque el costado ni el fondo y quede a 1-2 mm de éste. Las muestras se correrán en geles de agarosa al 1% en TBE.

1. Colocar un volumen de 45 mL de la disolución de agarosa (en un matraz Erlenmeyer), y calentar a ebullición (en el horno microondas).
2. Una vez que se ha enfriado un poco (hasta 50-55°C, temperatura que se resiste sin problema con la mano), se vierte en el molde, hasta alcanzar una altura (grosor del gel) de unos 5 mm. Se introduce el "peine" en la disolución, cerca de uno de los extremos del gel y paralelo a él.
3. Un poco antes de que termine la reacción de digestión, con la agarosa ya solidificada, se quita el "peine" cuidadosamente para evitar deformar o romper los pozos, y el soporte con el gel se coloca en la cubeta de electroforesis, situando los pocillos en el lado del cátodo (–, negro).
4. Se llenan los dos compartimentos con amortiguador TBE hasta cubrir totalmente el gel

Electroforesis

1. Para cada gel de agarosa, se depositan con micropipeta (puntas pequeñas, de color blanco) en el pozo 10 µL de los marcadores de peso molecular o patrones, y en el resto de pozo 13µL de las muestras (plásmido digerido y sin digerir). Debe tenerse mucho cuidado de no desgarrar el fondo de los pocillos con la punta de pipeta.
2. Conectar los electrodos a la fuente de alimentación y se aplica una corriente constante de 100 volts por cada gel. Se mantiene la corriente hasta que el frente llegue al límite del gel.
3. Observación del gel, tomar el gel con guantes y colocarlo sobre un transiluminador que emite radiación ultravioleta de 300 nm de longitud de onda, observando las bandas de DNA formadas y se fotografía.

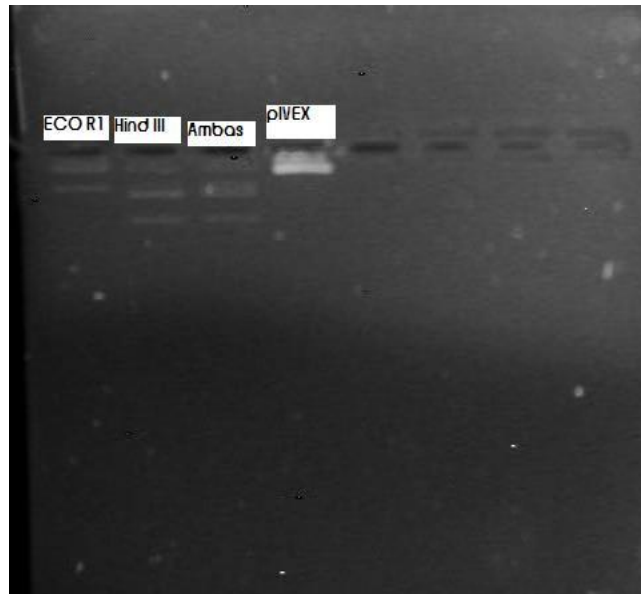
Diagrama de flujo:



Resultados.

- 1.- Elabora un dibujo de lo observado en la digestión.
- 2.- Describir que patrón de corrida de un plásmido de acuerdo al grado de enrollamiento.
- 3.- Explicar cómo sería el corrimiento de la muestra a pH ácido
- 4.- ¿Por qué se utiliza un gel de agarosa para ácidos nucleicos?
- 5.- ¿Qué procedimiento se efectuó para la visualización de ácidos nucleicos?
- 6.- Explicar en qué consiste el revelado por luz ultravioleta.
- 7.- Explicar que es un plásmido.
- 8.- Explicar en qué consiste un mapeo de restricción de un plásmido.

Resultados esperados.



PRÁCTICA XIII

TITULACIÓN DE SALIVA.

Objetivo:

Estudiar la capacidad amortiguadora de la saliva por ácido láctico.

Bibliografía:

- Newburn, E. Cariología. Noriega Ed. (1994).

Introducción:

Como resultado de la investigación dental se han desarrollado un gran número de pruebas de susceptibilidad a caries. Estas pruebas pueden ser utilizadas en el consultorio. La caries es una enfermedad de origen multifactorial ocasionada principalmente por tres factores importantes: el huésped, la microbiota y el sustrato, para el desarrollo de la caries se requiere de placa microbiana adecuada, un huésped susceptible y el sustrato integrado por de carbohidratos fermentables.

Una prueba utilizada en el control de caries es la determinación de la capacidad amortiguadora de la saliva para lo cual se utiliza ácido láctico 0.05N e hidróxido de sodio 0.05 N.

Material por equipo:

- Potenciómetro.
- Dos vasos de precipitados de 10 mL

Reactivos:

- Acido láctico 0.05N
- Azul de Bromotimol 10%
- Hidróxido de sodio 0.05 N

Material Biológico:

10 mL de saliva.

Procedimiento:

- 1.- Dos integrantes de un equipo aportarán cada uno 10 mL de saliva.
- 2.- Uno de ellos se realizará exhaustiva higiene bucal un día antes de la práctica.
- 3.- El otro donador de saliva deberá ingerir alimentos al menos una hora antes de realizar la práctica.
- 4.- Cada donante estimulará la salivación, masticando un trozo de parafina.
- 5.- De los diez mililitros obtenidos, se repartirán 5mL de saliva en dos frascos
- 6.- Adicionar a cada frasco una gota de la solución indicadora.
- 7.- Se tendrá un total de 4 frascos, dos corresponden al paciente que realizó la higiene bucal y dos pacientes que comieron.
- 8.- Numerar los frascos 1,2, 3 y 4.
- 9.- El frasco 1 y 2 corresponderá al donador que realizó la higiene bucal y el 3 y 4 al donador que consumió alimentos previo a la práctica.
- 10.- Los frascos 1 y 3 serán titulados con ácido láctico 0.05N y 2 y 4 con NaOH.
- 11.- Se adicionará 1 mL del ácido a los frascos y se tomará la lectura de pH hasta concluir con la titulación.

Donador 1		Donador 2	
TITULACIÓN CON ACIDO LÁCTICO 0.05 N			
Volumen	pH	Volumen	pH
TITULACIÓN CON NaOH 0.05 N			

Resultados:

- 1.- Graficar la curva de titulación obtenida.
- 2.- Calcular el número de equivalentes de ácido láctico para la disminución del pH de 7 a 6.

Cuestionario:

- 1.- ¿Por qué se utilizó ácido láctico en la titulación de Saliva?
- 2.- ¿De qué forma pueden ayudar los datos obtenidos para distinguir entre los hábitos de higiene en los pacientes?
- 3.- ¿Por qué la acidez ocasiona lesiones cariosas?
- 4.- Describir con que frecuencia se deben realizar aplicaciones tópicas de flúor

PRÁCTICA XIV

CINÉTICA DE LA LISOZIMA SALIVAL

Protocolo financiado por: PAPIME-EN205403

Objetivos:

Evaluar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la lisozima.

Determinar experimentalmente la cinética de la lisozima.

Bibliografía:

- Hernández , L.R.. Bioquímica Experimental. Manual de Experimentos de Bioquímica. De. LIMUSA (1979)

Introducción:

La enzima bacteriolítica lisozima fue descubierta en lágrimas y secreciones nasales por Fleming. Se ha reportado su presencia en la saliva y su función es hidrolizar las uniones β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa, de los peptidoglucanos presentes en la pared celular de las bacterias, por esta razón es una enzima que presenta acciones antibióticas. La mayoría de las bacterias son sensibles a esta enzima aunque la sensibilidad varía de acuerdo a la forma en que esté expuesto el sustrato. La lisozima tiene un punto isoeléctrico de 10.5 y es una proteína de bajo peso molecular.

Material:

7 tubos de ensaye.

3 Pipetas de 5 mL

3 Pipetas de 10 mL

Gradilla para tubos de ensaye.

Matraz Erlenmeyer.

Equipo:

Celdas para espectrofotómetro.

Cronómetro.

Espectrofotómetro.

Incubadora o estufa a 37°C

Sonicador.

Muestra biológica.

Suspensión de bacterias que se sonicán a 30V por 1 minuto. (Serie de diluciones desde un stock de 0.3 mg/ml. a factores de dilución de:

Dilución	Tubo
CONCENTRADO	1
1.5	2
2	3
2.5	4
3	5
4	6

Reactivos:

Amortiguador de fosfato 0.1 M pH 7.4

NaCl 0.15 M

Lisozima.

Metodología:

Preparar las diluciones de las bacterias con el amortiguador de fosfatos pH 7.0 de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación.

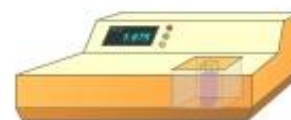
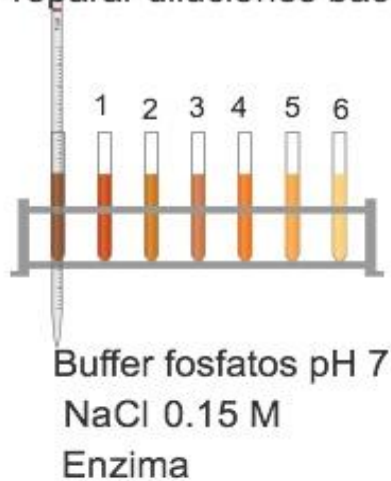
Preparar las muestras de acuerdo con el siguiente cuadro agregando primero los reactivos A, B y C.

REACTIVOS	TUBO NÚMERO					
	1	2	3	4	5	6
A) Suspensión de bacterias en amortiguador de fosfatos	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
B) Amortiguador de fosfatos	5.8	6.2	6.6	7.0	7.4	7.81
C) NaCl 0.15 M (mL)	1	1	1	1	1	1
D) Enzima (mL)	---	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

3. La reacción empieza al agregar la enzima (D), después se toma la lectura de absorbencia a 450 nm durante uno a dos minutos cada 15 segundos.

Diagrama de flujo

Preparar diluciones bacterias



Leer $A_{450 \text{ nm}}$
1-2 min
Durante 15 s

RESULTADOS:

Calcular la velocidad inicial.

Hacer una gráfica de velocidad en función de concentración de sustrato y calcular K_m empleando la curvas de velocidad en función de $[S]$, $1/v$ en función de $1/[S]$ y V en función de V/S . Presentar los resultados en un cuadro y establecer la gráfica que parece dar el mejor resultado.

Calcular la velocidad inicial.

Hacer una gráfica de velocidad en función de concentración de sustrato y calcular K_m empleando la curvas de velocidad en función de $[S]$, $1/v$ en función de $1/[S]$ y V en función

de V/S. Presentar los resultados en un cuadro y establecer la gráfica que parece dar el mejor resultado.

PRÁCTICA XV

PRUEBA DE SNYDER DE SUSCEPTIBILIDAD A LA CARIES.

Objetivo:

Utilizar la prueba Snyder como un indicativo de control de placa y caries.

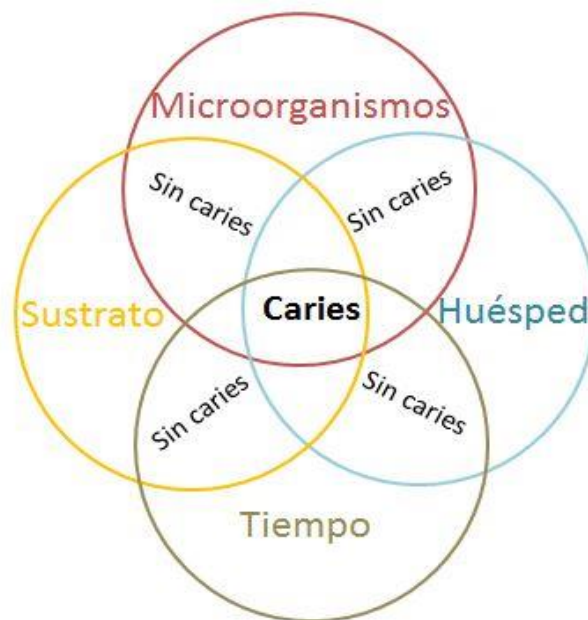
Bibliografía:

Newburn, E. Cariología. Ed. Noriega.

Thylstrup. Caries. Ed.

Introducción:

Con el advenimiento de nuevas técnicas de análisis ha sido posible estudiar la etiología y patogénesis de la caries. La caries dental (caries del latín: degradación) significa la degradación o ruptura de los dientes. Se produce mediante una destrucción progresiva del esmalte, dentina y cemento, iniciada por la actividad microbiana en la superficie de los dientes. La pérdida de la sustancia dental va precedida de manera característica por un reblandecimiento de estos tejidos, originada por la disolución parcial del mineral y seguida por la destrucción total del tejido. Se ha determinado que la caries es el resultado de la intervención de cuatro factores principales: el huésped (dienta y saliva), la microflora, el sustrato (dieta) y el tiempo.



La prueba de Snyder es empleada para la determinación colorimétrica del nivel y la cantidad de ácido producido por los microorganismos acidogénicos en la cavidad bucal. La reacción se evidencia por medio del cambio de color del indicador, que al inicio presenta una coloración verde - verde azulado y vira a un color amarillento. Si se producen cambios en la coloración la muestra se considera como positiva, si el medio no presenta cambios la muestra se considera negativa.

Para determinar la actividad cariogénica las muestras se analizan de acuerdo a la tabla que se presenta a continuación.

ACTIVIDAD DE CARIES	24 HRS.	48 HRS	72 HRS.
ACTIVA	+	+	+
MODERADA	-	+	+
LIGERA	-	-	+

Esta prueba será realizada por todos los estudiantes del primer año de la carrera a fin de determinar su propia susceptibilidad a la caries. La mejor forma de recolectar la muestra es antes del desayuno o antes de que los dientes sean cepillados.

Material:

4 Tubos de ensaye estériles para la saliva.
Pipeta de 1 mL
4 Tubos en ensaye con el medio de cultivo Snyder.
1 Gradilla.
1 Incubadora.
1 Autoclave.
Pastilla de parafina.
Mechero de porcelana.
Cinta adhesiva.
Plumón.

Reactivos:

Medio Snyder:

Bacto triptosa	20 gr.
Bacto dextrosa	20 gr.
Cloruro de sodio	5 gr.
Bacto agar	20 gr.
Bacto bromo cresol verde	0.20 gr.

pH 4.8 disolver en 7 litros.

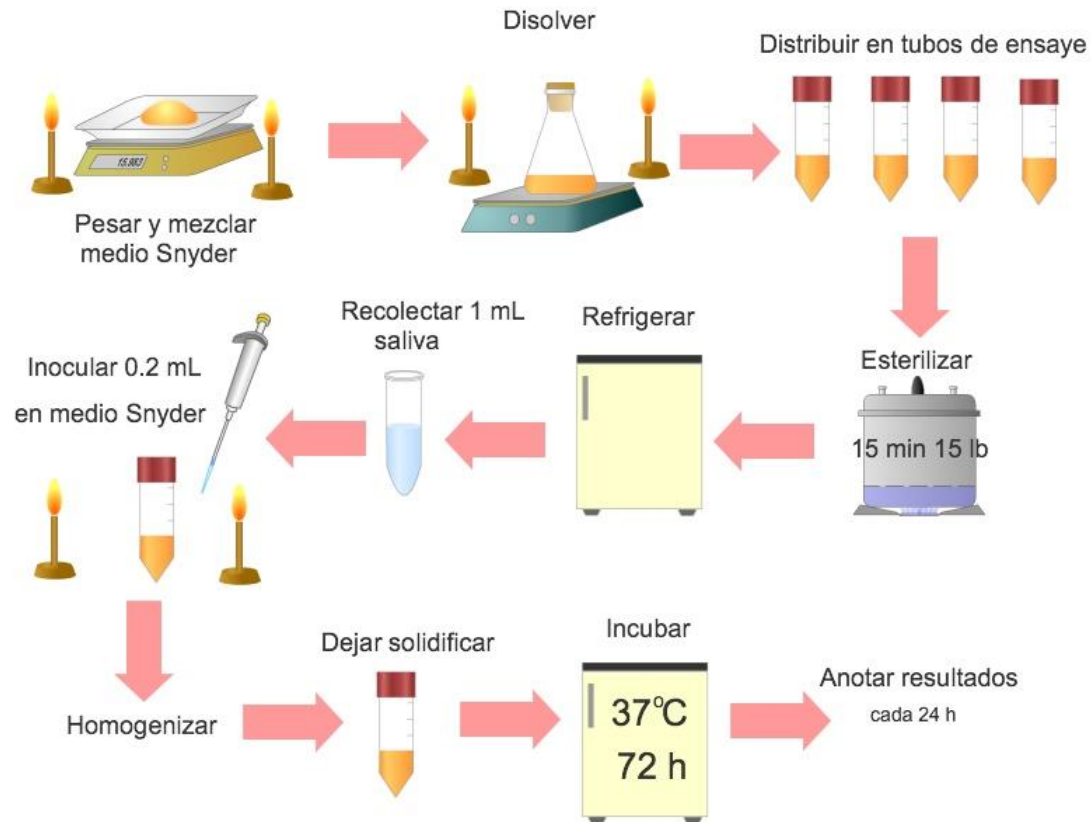
Procedimiento:

TODO EL PROCEDIMIENTO SE REALIZA CON LOS MECHEROS EN UN LUGAR CERRADO Y LIBRE DE CORRIENTES.

1. Se pesan y mezclan los componentes del medio Snyder y se disuelven posteriormente se calienta la mezcla hasta que se disuelva completamente.
2. Distribuir la solución en tubos de ensaye con tapa de rosca de 10 mL
3. Esterilizar los tubos en el autoclave por 15 min a 15 LB de presión.
4. Al término refrigerar los tubos en posición recta.
5. Recolectar 1 mL saliva en un tubo estéril
6. Tomar 0.2 mL de saliva e inocular en el tubo que contiene el medio Snyder.
7. Se rolan los tubos de ensaye inoculados para mezclar a uniformidad la muestra de saliva y el medio.
8. Dejar que solidifique el medio.
9. Incubar los tubos a 37°C durante 72 h
10. Observar los tubos cada 24 h y anotar los resultados.

Actividad de caries	24 h	48 h	72 h
Activa			
Moderada			
Ligera			

Diagrama de flujo



Cuestionario.

- 1.- Definir la caries.
- 2.- ¿Qué relación existe entre la prueba Snyder y la caries.?
- 3.- ¿Qué finalidad tiene la utilización del verde de bromocresol?
- 4.- ¿Por qué se realiza el experimento con mechero.
- 5.- ¿Qué significado Bioquímico tiene el viraje en la coloración del tubo de ensayo.?
- 6.- ¿Qué otras pruebas de susceptibilidad a caries ha sido descritas y cuál es su utilidad?
- 7.- ¿Qué moléculas contiene la saliva que produce cambios en el medio de cultivo?

PRÁCTICA XVI

RELACIÓN ENTRE LA CARIES CON LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE *LACTOBACILLUS* PRESENTES EN LA SALIVA

Protocolo financiado por PAPIME- EN205403

Introducción

Un problema de Salud Pública de alto impacto en la población es la caries. La caries, es una enfermedad ocasionada por microorganismos presentes en la placa dentobacteriana.

La caries se caracteriza por una insipiente desmineralización del esmalte en las etapas tempranas y cuando avanza afecta el paquete vásculo-nervioso del diente con la posible presencia de abscesos radiculares.

Dentro de los microorganismos presentes en la placa dentobacteriana y que están directamente relacionados con la caries dental se encuentran el *Streptococcus mutans* y especies *Lactobacillus*, estos microorganismos fermentan diferentes carbohidratos liberando diversos productos entre los que se encuentran ácidos como el ácido láctico. La disminución local del pH que provoca que el esmalte se disuelva, ya que la solubilidad de los fosfatos de calcio aumenta en valores de pH ácido.

La etiología de la caries ha sido ampliamente estudiada y existen reportes de su existencia en civilizaciones antiguas. Existen tres factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad que se agrupan en la Triada de Keyes que son:: la dieta, los microorganismos, el huésped y en fechas recientes se ha incluido el tiempo en el que conviven estos factores.

En este reporte estudiaremos el número de colonias formadoras de colonia de *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

Objetivo:

El alumno determinará el número de unidades formadoras de colonias de Lactobacillus y Streptococcus en una muestra de saliva.

Criterios de inclusión.

No consumir alimentos al menos 2 hrs. antes de la toma de muestra.

No haber consumido antibióticos tres semanas antes del desarrollo de la práctica.

Materiales y Métodos.

Equipo

Contador de unidades formadoras de colonias

Incubadora de temperatura controlada.

Jarra de anaerobiosis

Mechero

Material.

Asa bacteriológica.

Buffer de Fosfatos salino pH 7.4

Charola con hielo.

Kit de CRT bacteria (IVOCLAR)

Medio de cultivo

Agar mitis salivarius

Medio de cultivo Rogosa

Solución de transporte

Tubo clínico de 15 mL

Tubos de ensaye con tapa

Preparación de medios de Cultivo Bacteriano.

Medio de cultivo MSB-Gold

Medio Bacto mitis salivarius.

Ingredientes por litro.

Bacto agar	15 gr.
Bacto dextrosa	1 g.
Bacto sacarosa	50 g.
Bacto triptona.....	10 g.
Bactopeptona	5 g.
Cristal violeta	0.0008 gr
Dipotasa.....	4 g.
Tripan azul	0.075 gr.

pH final 7.0

Método de preparación:

Rehidrate el medio con una suspensión de 90 gr. Y disuelva en un litro de agua destilada o desionizada y agregar 150 gr. de sacarosa (para enriquecer el medio).

Calentar el medio hasta que se disuelva el medio.

Esterilizar 15 minutos a un presión de 15 libras (121-124°C)

Cuando alcance 45°C agregar 1 mL de telulito-bacitracina.

Vaciar a cajas petri y dejar que solidifique.

Medio de cultivo Rogosa.

Acetato de sodio	15 gr.
Bacto agar.....	15 gr.
Bacto arabinosa	5 gr.
Bacto dextrosa	10 gr.
Bacto sacarosa.....	5 gr.

Bacto triptona..... 10 gr.
Citrato de amonio 2 gr.
Extracto de levadura..... 5 gr.
Fosfato monobásico.....6 gr.
Monooleato de sorbitol..... 1 gr.
Sulfato de magnesio.....0.57 gr.
Sulfato ferroso.....0.03 gr.

pH final 5.4

Por cada 1000 mL de agua bidestilada, se agregan 75 gr. del medio Rogosa.

Se homogeniza en un agitador magnético se calienta hasta hervir.

Se dejar enfriar a 45°C y se adiciona 1,32 mL de ácido acético y se hierve de 2 a 3 min.

Se vacía en caja petri y se conserva 4°C hasta usarse.

Procedimiento.

El alumno se sentará de frente a la luz y un compañero obtendrá el índice CPO y reportará los valores en la historia clínica.

Estimular el flujo de saliva con una pastilla de parafina.

Recoger la saliva en un tubo clínico (5 mL) y dejarla en un baño con hielo.

Diluir la muestra de saliva 1:10 en buffer de fosfatos salino pH 7.4

Limpiar la mesa con alcohol al 70% y prender dos mecheros 15 minutos antes de iniciar el procedimiento y en la zona media colocar las cajas petri que contienen los medios de cultivo.

Inocular el medio con 10 microlitros de muestra de saliva y extender en el agar con ayuda de un asa bacteriológica.

Colocar la tableta de NaHCO_3 dentro de la jarra de anaerobiosis.

Etiquetar la muestra con el nombre del paciente y fecha.

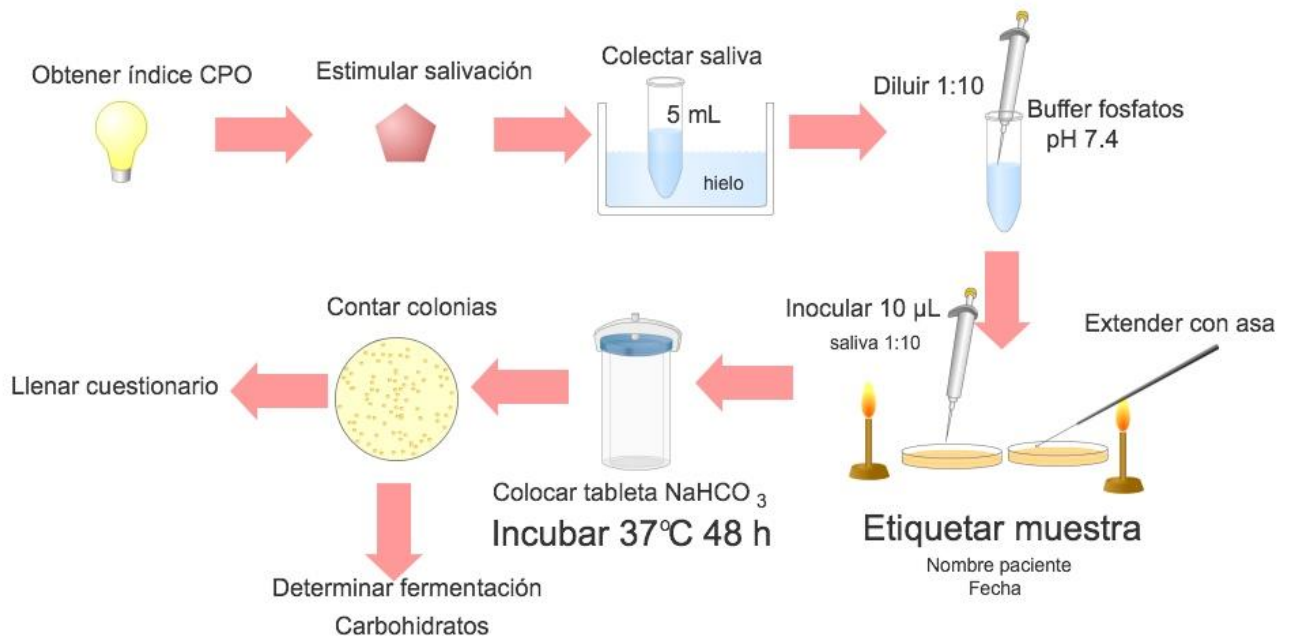
Incubar a 37°C por 48 hrs. Cuidando que el tubo se encuentre en posición vertical.

Retirar los tubos de la incubadora y contar el número de colonias.

Llenar el cuestionario de la Historia Clínica (Se anexa).

Al término de la incubación se tomará una muestra de colonia y se inoculará para determinar la fermentación de carbohidratos.

Diagrama de flujo:



Resultados.

Preparar el reporte tabulando el número de unidades por cada integrante del equipo.

Determinar la especie de *Lactobacillus* por los resultados obtenidos de la fermentación de carbohidratos.

Discutir de forma individual el fundamento Bioquímico de la fermentación de carbohidratos.

Bibliografía:

Williams y Elliot. *Bioquímica dental básica y aplicada México*. Manual Moderno. 1990.

Irigoyen ME et. al. *Dental caries status of 12 year-old students in the state of Mexico*. Community Dentistry and Oral Epidemiology. 1994;22:311-314.

Köhler B. et. al. *Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11 and 12 year-old Icelandic children*. Caries and cariogenic bacteria.

Metodología.

Definición de variables.

Edad: se anotarán los años desde el nacimiento hasta le presente.

Sexo: conjunto de características físicas y fisiológicas que identifican o diferencian a un ser masculino de uno femenino.

Municipio: se refiere a la delegación o municipio en donde habitan los escolares.

Enfermedad: determinar si se encuentra tomando algún medicamento.

Cepillado dental: corresponde al número de veces que se cepillan los dientes.

Complemento de higiene oral: se determinará el dentífrico que se utiliza, hilo dental o enjuagues bucales.

Consulta dental: se refiere al número de ocasiones que asisten a consulta al año.

Refresco: se refiere a la cantidad de refresco que se consume al día.

Ocupación de padre: se registrará como 1) No sabe; 2) Básica; 3) Medio; 4) Profesional.

Indicie CPOD: se registra como dientes perdidos, cariados y obturados permanentes.

Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus acidophilus*. Se refiere al total de colonias de *Lactobacillus* en saliva.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Historia Clínica

Elaboró: Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

CD Abel Hernández Miranda.

Datos generales

Escuela: _____ (1) Pública (2) Privada (3) Rural Ubicación (1) D.F. (2) Estado

Ocupación del jefe de familia : (0) No sabe (1) Obrero (2) Empleado (3) Profesionista (4) E, particular

Escolaridad del jefe de familia (0) No sabe (1) Básica 4% (2) Media 7% (3) Profesional 10%

Colonia, Delegación o Mpio: _____ NSE residencia : (1) Alto 30% 2(2) Medio 20% (3) Bajo 10%

Tu casa cuenta con:

Aire acondicionado o extractor de aire (3) Horno de microondas y lavadora automática

Televisión a color y video casetera (4) lo indispensable

Nivel socioeconómico del niño: (1) Bajo (2) Medio (3) Alto

Datos personales:

Nombre: _____ Edad: _____

sexo: ____ Grado: ____ Grupo: ____ Recursador: ____

Tiene alguna enfermedad: _____ Toma Algún medicamento: _____ Antibiótico _____

Cuantas veces al año acude a consulta dental: _____

No, de veces de cepillado al día: _____ Complemento de higiene oral: (1) pasta
(2)hilo (3)Enjuagues

Cantidad de golosinas que ingiere al día: (1) ninguna (2) Poca 1-3 (3) Regular (4)Mucho

Cuantos refrescos ingiere al día: _____

Frecuencia de aplicación de flúor: _____

Presencia de selladores de fosetas y fisuras: _____

55 54 53 52 51	61 62 63 64 65
17 16 15 14 13 12 11	21 22 23 24 25 26
47 46 45 44 43 42 41	31 32 33 34 35 36
85 84 83 82 81	71 72 73 74 75

- 0= sano =A
- 1= cariado =B
- 2= obturado y cariado =C
- 3= obturado =D
- 4= ausente por caries =E

	CPOD	cpod
C		
P		
O		
ÍNDICE		

Toma de muestra:

Horas de ayuno: _____ Mililitros de muestra: _____ Fecha: _____

Resultado de Practica: (1) susceptible (2)no susceptible

No . de colonias: _____

NOMBRE Y FIRMA DEL ALUMNO

Nota: declaro de conformidad que los datos asentados anteriormente son fidedignos y sean utilizados para el estudio pertinente.

PRÁCTICA XVI

RELACIÓN ENTRE LA CARIES CON LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE *LACTOBACILLUS* PRESENTES EN LA SALIVA PARTE II

Protocolo financiado por PAPIME EN205403

Objetivo:

El alumno estudiará la fermentación de carbohidratos en el crecimiento de *Lactobacillus* obtenidos de estudiantes con alto y bajo índice CPO.

El alumno integrará los resultados obtenidos con la información de las lecciones de metabolismo de carbohidratos que se imparten en las clases de teoría.

Introducción:

Las pruebas bioquímicas se utilizan en la identificación y clasificación de bacterias. En la identificación de una bacteria se realiza su asignación en un taxón según la clasificación, que consiste en el establecimiento de características fenotípicas o genotípicas. Para poder realizar la clasificación de una bacteria se realiza un esquema de trabajo que consiste principalmente en las siguientes características:

Obtención de cultivos puros.

Observación microscópica de las células mediante tinte por Gram. Lo que permite su agrupación como microorganismos Gram positivos o Gram negativos.

Determinación de características nutricionales.

Realización de pruebas primarias que permiten determinar el género al que pertenece el aislamiento. Entre las pruebas primarias se encuentran catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa. Crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis.

Se realizan también pruebas secundarias o terciarias para la caracterización de la especie. Como producción de indol, producción de coagulasa, actividad de fenilalanina desaminasa.

Caracterización del Serotipo:

Se utilizan antisueros específicos. Los antígenos bacterianos pueden ser capsulares, somáticos (O) que corresponden al lipopolisacárido de la pared de las bacterias Gram negativas, flagelares (H), los antisueros se identifican con estas letras y el número o letra del antígeno correspondiente. En la primera identificación se utilizan sueros polivalentes y para la caracterización serológica se utilizan sueros monovalentes.

Pruebas bioquímicas.

Se realiza la identificación de un aislamiento bacteriano mediante la utilización de diferentes combinaciones de características o criterios.

Los ensayos bioquímicos se nombran como “pruebas bioquímicas”, que generalmente determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato. Las pruebas son ensayos sencillos que permiten mostrar de forma muy clara una determinada característica bioquímica como es la presencia de una determinada actividad enzimática. Para realizar las pruebas nosotros determinaremos la actividad fermentadora de algunos carbohidratos (lactosa, sacarosa, manitol y salicina) utilizando como indicador de pH el rojo fenol. En esta prueba se coloca el inóculo y en solución de cada uno de estos carbohidratos. Si la prueba para el carbohidrato es positiva el rojo fenol virará de rojo a amarillo después de la muestra se incubó durante 72 h a 37°C. Si la prueba es negativa después de la incubación no se presentará ningún cambio la coloración del rojo fenol. En estos ensayos es conveniente utilizar controles positivos y negativos que nos permiten determinar si las condiciones del ensayo son las apropiadas.

Material y Equipo.

- Algodón.
- Gradilla.
- Incubadora
- Jarra de anaerobiosis.
- Pipetas,
- Tubos de ensaye.

Reactivos:

Solución de rojo fenol 1% adicionada con cada carbohidrato al 10%.

Procedimiento:

Conservar las cajas petri del crecimiento de *Lactobacillus* de dos alumnos.

De acuerdo a la historia clínica seleccionar la caja del alumno que presentó un bajo índice CPO y del alumno que presentó un alto CPO.

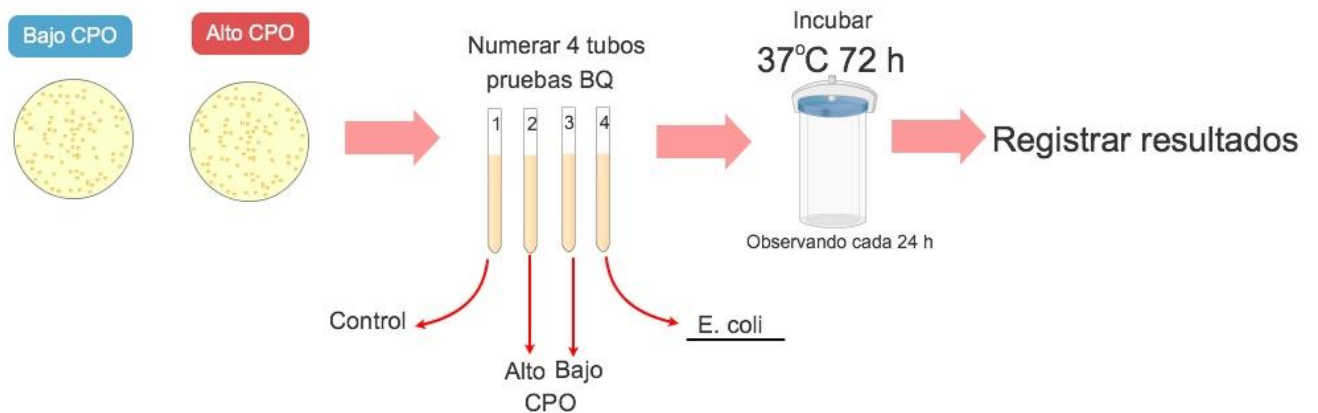
Seleccionar 4 tubos de cada prueba bioquímica y numerarlos.

El tubo 1 será el control; tubo 2 la muestra del alumno con bajo CPO; tubo 3 la muestra del alumno con alto CPO y tubo 4 muestra de *E. coli*.

Se introducen los tubos en jarra de anaerobiosis y se incuban por 72 h

Se realiza la observación cada 24 h y se anotan los resultados como se muestra en la tabla. Si la prueba es positiva se coloca + y si la prueba es negativa -.

Crecimiento bacteriano	Pruebas Bioquímicas											
	Lactosa			Sacarosa			Manitol			Salicina		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1.- Bajo CPO												
2.- Alto CPO												
3.- <i>E. coli</i>												



PRÁCTICA XVII

OPERÓN DE LACTOSA EN *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS*

Objetivo:

El alumno estudiará el funcionamiento del operón de lactosa.

Comprenderá como estos microorganismos utilizan otra fuente carbonada.

Introducción:

Los primeros estudios sobre la regulación de la expresión génica comenzaron a ser efectuados en la década de los 50 y concluyeron en los 60 con los hallazgos realizados por Jacob y Monod en Francia. Trabajo por el cual años después fueron acreedores al premio Nobel en Medicina. Sus trabajos en esencia fueron realizados en organismos procariontes, debido a que con anterioridad se había establecido que en estos organismos muchas de las enzimas que se requieren en las vías centrales del metabolismo se expresan de forma constante, los genes que codifican a estas enzimas reciben la denominación de constitutivos. Pero también presentan un grupo de enzimas cuya concentración aumenta o disminuye en respuesta a determinados agentes moleculares los genes que codifican a estas enzimas reciben la denominación de genes inducibles. Para el inicio de la transcripción participan interacciones entre proteína-DNA. En particular la RNA polimerasa que se asocia al DNA en unos sitios denominados promotores que para iniciar la transcripción deben de estar libres o disponibles algunos otros sitios que han recibido el nombre de factores de especificidad, represores y activadores que en su conjunto constituyen el operón a lactosa. Se demostró que las bacterias cuando crecen en un medio libre de glucosa pueden utilizar alguna otra fuente carbonada como la lactosa.

Para que la bacteria utilice este disacárido es necesario que se active el operón a lactosa que está constituido por tres genes estructurales que codifican para la galactosidasa permeasa, la β -galactosidasa y la transacetilasa, este conjunto de enzimas permitirá que la bacteria metabolice a la lactosa. El operón funciona en base un sistema de represión catabólica para el estudio del operón se determinará la actividad de la β -galactosidasa. Para medir su actividad se utilizará un análogo hidrolizable el nitrofenol β -galactósido que se hidrolizará en nitrofenol y dará una coloración amarilla.

Material y equipo:

- Espectrofotómetros.
- Gradilla.
- Pipetas,
- Tubos de ensaye.

Reactivos:

Solución de glucosa al 10%.

Solución de lactosa al 10%

Solución de sorbitol 10%

Buffer de Fosfatos pH7.0

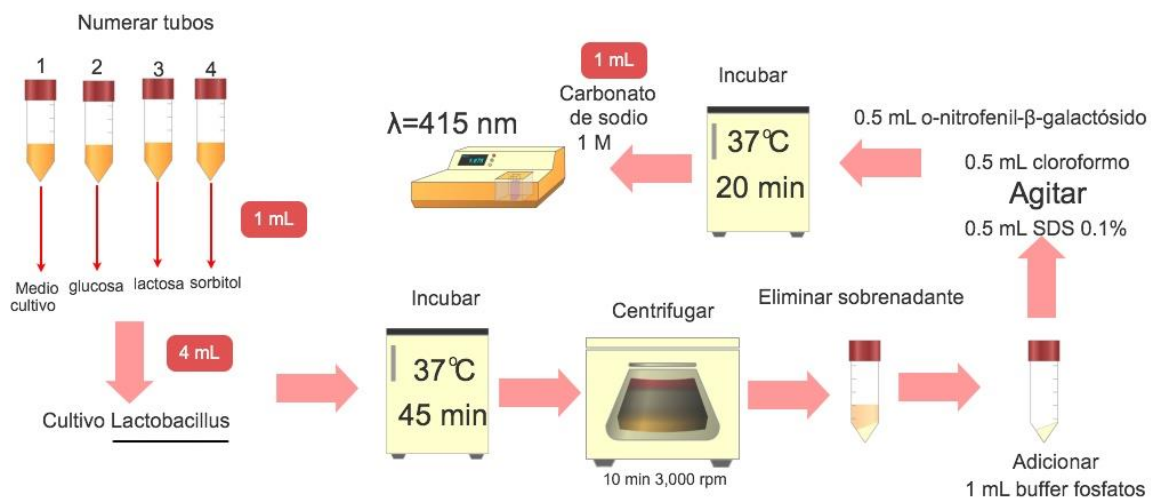
o-nitrofenil- β -galactósido al1%. en buffer de fosfatos

Procedimiento:

- 1.-Se crecerà a *Lactobacillus* en un medio Rogosa libre de glucosa y en presencia de manitol.
- 2.- Se numerarán los tubos de ensaye del 1al 5
- 3.-. Añadir a cada tubo cada una de las soluciones:
Tubo 1 1 mL del medio de cultivo.
Tubo 2 1 mL de solución de glucosa.
Tubo 3 1 mL de solución de lactosa.
Tubo 4 1 mL de solución de sorbitol.
- 4.- Adicionar a cada tubo 4 mL del cultivo de *Lactobacillus*.
- 5.- Incubar los tubos a 37°C en agitación durante 45 min.
- 6.-Al transcurrir el tiempo centrifugar 10 min a 3000 rpm.
- 7.-Decantar el sobrenadante.

- 8.- Añadir 1 mL del buffer de fosfatos.
 - 9.-Lisar las bacterias con 0.5 mL de SDS al 0.1%
 - 10.- Agitar.
 - 11.-Adicionar 0.5 mL de cloroformo.
 - 12.-Añadir a cada tubo 0.5 mL del reactivo de o-nitrofenil- β -galactósido.
 - 13.-Incubar a 37°C durante 20 minutos.
 - 14.-Parar la reacción con 1mL de carbonato de sodio 1 M.
- Leer a 415 nm.

Diagrama de flujo



Cuestionario.

- 1.- ¿Describir en consiste el operón?
- 2.- ¿Qué otros operones han sido descritos?
- 3.- ¿Qué importancia tiene la activación del operón de lactosa en los *Lactobacillus acidophilus*?
- 4.- ¿Qué relación existe entre la inducción del operón y el desarrollo de caries?

ANEXO I

REACTIVOS QUÍMICOS.

LOS REACTIVOS QUÍMICOS SE CLASIFICAN SEGÚN SU PUREZA EN:

REACTIVO GRADO TÉCNICO O COMERCIAL: SON REACTIVOS A LOS QUE SE LES DA USO INDUSTRIAL, CONTIENEN IMPUREZAS Y NO SON APROPIADOS PARA USO DE LABORATORIO.

REACTIVO GRADO USP (GRADO FARMACOPÉICO): SON REACTIVOS QUE PRESENTAN AUSENCIA DE IMPUREZAS QUE AFECTAN A LA SALUD, SE PUEDEN EMPLEAR EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS PERO NO TIENEN LA PUREZA DE UN REACTIVO QUÍMICAMENTE PURO.

REACTIVO GRADO QUÍMICAMENTE PURO (QP) SON REACTIVOS MÁS PUROS QUE LOS USP Y SE ESTANDARIZAN DE ACUERDO A LA CASA QUE LOS VENDE POR ESTE MOTIVO VARÍA DE ACUERDO A LA CASA COMERCIAL QUE LOS VENDE.

REACTIVO GRADO ANALÍTICO (ACS): ESTOS REACTIVOS SE ELABORAN DE ACUERDO A ESTRICIAS NORMAS DE SEGURIDAD Y BAJO LAS ESPECIFICACIONES DEL COMITÉ DE REACTIVOS ANALÍTICOS DE LA SOCIEDAD QUÍMICA AMERICANA. EN LA ETIQUETA DE ESTOS REACTIVOS SE ESPECIFICAN LOS LÍMITES DE IMPUREZAS ANALIZADAS.

REACTIVOS GRADO ESTÁNDAR PRIMARIO: SE REQUIEREN MÉTODOS ESPECIALES DE PURIFICACIÓN Y SU PUREZA ES CERCANA AL 100%.

ANEXO II

CONCENTRACIÓN COMERCIAL DE ÁCIDOS Y BASES

C O N C E N T R A C I Ó N				
ÁCIDO O BASE	PESO MOLECULAR	MOLES /L	% POR PESO	GRAVEDAD ESPECÍFICA.
Ácido acético	60.1	17.4	99.5	1.05
Ácido butírico	88.1	10.3	95	0.96
Ácido fórmico	46.0	23.4	90	1.20
Ácido clorhídrico	36.5	11.6	36	1.18
Ácido láctico	90.1	11.3	85	1.20
Ácido nítrico	63.0	16.0	71	1.42
Ácido fosfórico	80.0	18.1	85	1.70
Ácido sulfúrico	98.1	18.0	96	1.84
Hidróxido de amonio	35.0	14.8	28	0.89

ANEXO III

PREFIJOS

PREFIJO	SÍMBOLO	FACTOR	PREFIJO	SÍMBOLO	FACTOR
Yotta	Y	10^{24}	Deci	D	10^{-1}
Zeta	Z	10^{21}	Centi	C	10^{-2}
Exa	E	10^{18}	Mili	M	10^{-3}
Peta	P	10^{15}	Micro	μ	10^{-6}
Tera	T	10^{12}	Nano	η	10^{-9}
Giga	G	10^9	Pico	P	10^{-12}
Mega	M	10^6	Femto	F	10^{-15}
Kilo	K	10^3	Atto	A	10^{-18}
Hecto	H	10^2	Zepto	Z	10^{-21}
Deca	da	10^1	Yocto	Y	10^{-24}

ANEXO IV

FACTORES DE CONVERSIÓN

Cantidad	Unidad	Símbolo	Equivalente
Volumen	Litro	L	10^{-3} m^3
	Mililitro	mL	10^{-6} m^3
Longitud	Angstrom	Å	10^{-10} m
Masa	Pulgada	In	0.0254 m
	Libra	Lb	0.453 592 kg
	Tonelada métrica		
Fuerza	Dina	Dyn	1000 kg
Presión	Bar	Bar	10^5 Pa
	Atmósfera	atm	101.325 Pa
Energía	Ergio	Erg	10^{-7} J
	Electrovoltio	eV	$1,602 \ 176 \ 462 \times 10^{-19} \text{ J}$
	Caloría	cal	4,184 J
Potencia	Caballo de vapor		745,700 W
Temperatura	Centígrado	°C	°K 273.15
	Fahrenheit	°F	$1.8(K-273.15)+32$

ANEXO V

TABLA PERIÓDICA DE LOS ELEMENTOS.

# Atómico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	H Hidrógeno 1,008	He Helio 4,002602																	
2	Li Litio 6,94	Be Berilio 9,012182																	
3	Na Sodio 22,9897	Mg Magnesio 24,305																	
4	K Potasio 39,0983	Ca Calcio 40,078																	
5	Rb Rubidio 85,4678	Sr Estroncio 87,62																	
6	Cs Cesio 132,905	Ba Bario 137,327																	
7	Fr Francio (223)	Ra Radio (226)																	

Estado	C	Hg	H	Rf
Sólido	21	22	23	24
Líquido	25	26	27	28
Gaseoso	29	30	31	32
Desconocido	33	34	35	36

Clase	Grupos
Metales	1-10
Alcalinos	1
Acalinotérreos	2
Lantánidos	3-10
Actinidos	11-18
Metales de transición	3-10
Metales del bloque p	13-18
Metales	1-10
Otros no metales	13-16
Halógenos	17
Gases nobles	18
Metales	1-10
Alcalinos	1
Acalinotérreos	2
Lantánidos	3-10
Actinidos	11-18
Metales de transición	3-10
Metales del bloque p	13-18
Metales	1-10
Otros no metales	13-16
Halógenos	17
Gases nobles	18

57	La Lantano 138,905	Ce Cerio 140,116	Pr Praseodimio 140,907	Nd Neodimio 144,242	Pm Prometio (145)	Sm Samario 150,36	Eu Europio 151,964	Gd Gadolinio 157,25	Tb Terbio 158,925	Dy Dysprosio 162,500	Ho Holmio 164,930	Er Erbio 167,259	Tm Terbio 168,934	Yb Ytterbio 173,054	Lu Lutecio 174,967
89	Ac Actinio (227)	Th Torio 232,037	Pa Protactinio 231,036	U Uranio 238,028	Np Neptunio (237)	Pu Plutonio (244)	Am Americio (243)	Cm Curcio (247)	Bk Berkelio (247)	Cf Californio (251)	Es Einsteinio (252)	Fm Fermio (257)	Md Mendelevio (258)	No Nobelio (259)	Lr Lawrencio (262)

En el caso de los elementos con isotopos no estables, entre parentesis se encuentran las masas de aquellos isotopos que son más estables o más abundantes.

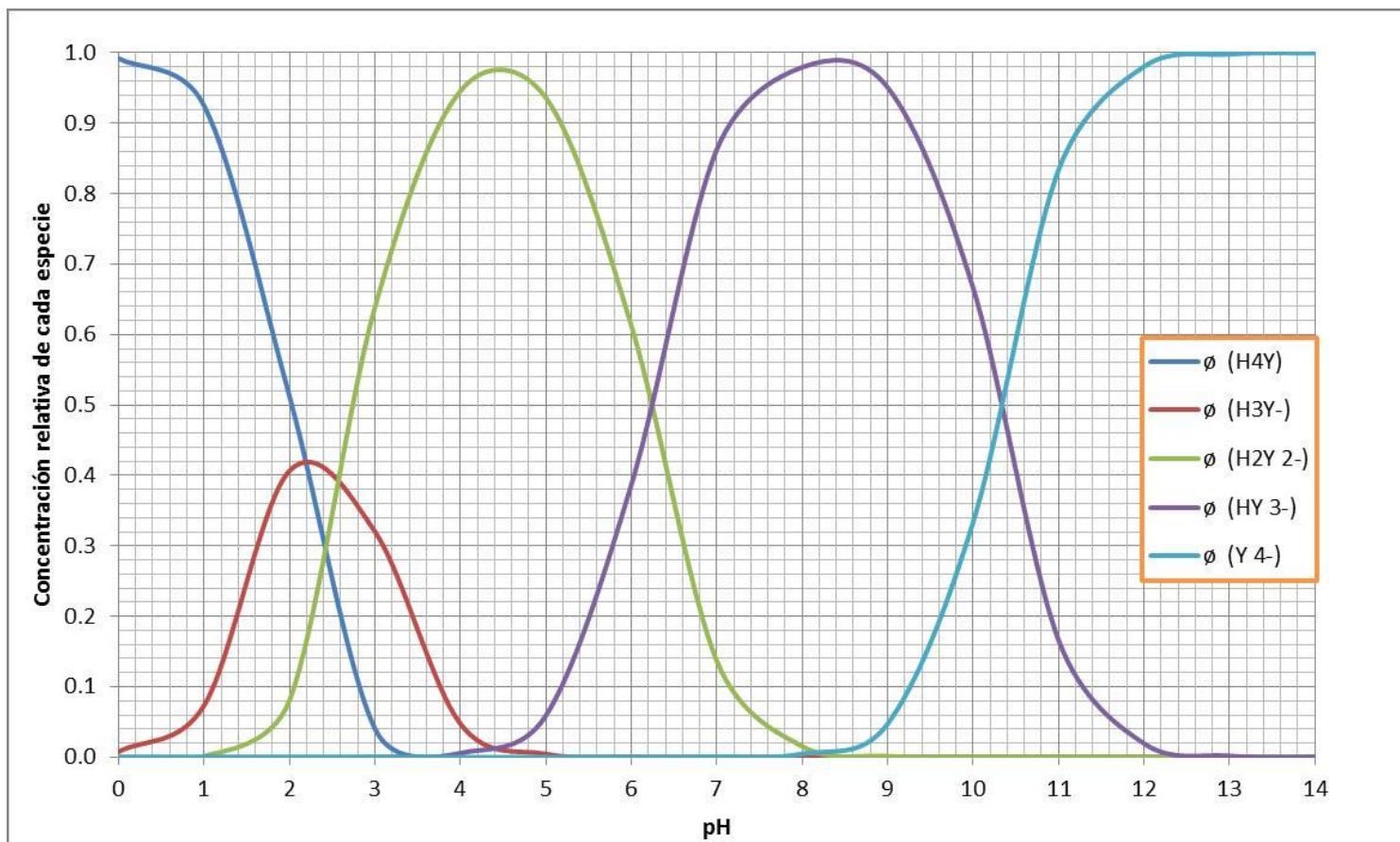
ANEXO VI

EXPRESIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE DISOLUCIONES.

MAGNITUD	ABREVIATURA	UNIDADES
Concentración másica	C	Adimensional (g / g)
Fracción molar	χ_i	Adimensional (mol / mol)
Porcentaje	%	Peso (g/100 g)
		Volumen (mL/100 mL)
		Peso/Volumen (g/100 mL)
Molaridad	M	g/L
Molalidad	M	g/kg disolvente
Normalidad	N	g/L

ANEXO VII

DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DEL EDTA.



H₄Y= EDTA (ÁCIDO ETILENDIAMINO TETRAACÉTICO) COMPLETAMENTE PROTONADO

ANEXO VIII

ALFABETO GRIEGO

Nombre de letra	de Mayúsculas	Minúsculas	Nombre de letra	de Mayúsculas	Minúsculas
Alfa	A	α	Ni	N	ν
Beta	B	β	Xi	Ξ	ξ
Gamma	Γ	γ	Ómicron	Ο	ο
Delta	Δ	δ	Pi	Π	π
Épsilon	E	ε	Ro	Ρ	ρ
Dseda	Z	ζ	Sigma	Σ	σ
Eta	H	η	Tau	Τ	τ
Zeta	Θ	θ	Ípsilon	Υ	υ
Iota	I	ι	Fi	Φ	φ
Kappa	K	κ	Ji	Χ	χ
Lambda	Λ	λ	Psi	Ψ	ψ
Mi	M	μ	Omega	Ω	ω

GLOSARIO

Absorbancia: (A) se define $A = \log(P_0/P)$ donde P_0 es la potencia radiante de la luz que incide en la muestra por una cara y P es la potencia radiante que emerge por la cara opuesta.

Absorbancia: cantidad de luz incidente que absorbe la muestra. Es el inverso de la Transmitancia de un objeto o solución (muestra). (A) se define $A = \log(P_0/P)$ donde P_0 es la potencia radiante de la luz que incide en la muestra por una cara y P es la potencia radiante que emerge por la cara opuesta.

Aceptor de protones: una base de Brønsted-Lowry.

Ácido acético: ácido etanoico (CH_3COOH), líquido incoloro de olor penetrante se produce por procesos como la fermentación, putrefacción y oxidación, se produce a partir de líquidos alcohólicos en fermentación.

Ácido: sustancia que aumenta la concentración de protones cuando se añade al agua. Sustancia donadora de protones.

Acido carboxílico: (RCO_2H) donde R es cualquier grupo de átomos.

Ácido desoxirribonucleico: (DNA) ácido nucleico compuesto de unidades de desoxirribonucleótidos, formados por desoxirribosa, fosfato y una base nitrogenada, formando una doble hélice.

Acido etilendiaminotetraacético: (EDTA) es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con metales de forma reversible por cuatro posiciones acetato y dos amino, lo que lo convierte en un ligando hexadentado. Secuestra iones metálicos con carga mayor o igual a 2^+ .

Aerobio: célula u organismo con vida aerobia.

Aerobiosis: propiedad de los procesos metabólicos, células u organismos que solo pueden existir en presencia de oxígeno.

Agar: gelatina vegetal de origen marino. Es un polisacárido sin ramificaciones obtenido de la pared celular de varias especies de algas de los géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria*, entre otros, resultando, según la especie, de un color característico. Químicamente, el

agar es un polímero de subunidades de galactosa; en realidad es una mezcla heterogénea de dos clases de polisacáridos: agarpectina y agarosa. Aunque ambas clases de polisacáridos comparten el mismo esqueleto de galactosa, la agarpectina está modificada con grupos ácidos, tales como sulfato y piruvato. Los polisacáridos de agar sirven como la estructura primaria de la pared celular de las algas. Disuelto en agua caliente y enfriado se vuelve gelatinoso.

Agarosa: polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C. Forma una matriz inerte y no tóxica. Derivado del agar, al cual se le retiran los grupos con carga negativa para obtener una matriz neutra.

Agua desionizada: agua que pasa por intercambiador catiónico y aniónico para eliminar iones de la disolución.

Almidón: polisacárido de hidrato de carbono $[C_6H_{10}O_5]_n$ formado glucosa y en su estructura presenta amilosa y amilopectina, polvo blanco higroscópico, insoluble en agua fría.

Amilosa: componente del almidón, producto de la condensación de D-glucopiranosas mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$ para la formación de largas cadenas lineales de 200 a 2500 unidades.

Amilopectina: polisacárido por unidades glucosa ramificado formado enlaces $\alpha(1-6)$ en el punto de la ramificación y enlaces $\alpha(1-4)$ en las cadenas.

Aminoácidos: sustancia cristalina de sabor dulce con carácter ácido – básico y actividad óptica. Químicamente son ácidos carbónicos, con grupo amino y son los componentes esenciales de las proteínas.

Anabolismo: es el conjunto de procesos del metabolismo que tienen como resultado la síntesis de componentes celulares a partir de precursores de baja masa molecular, por lo que recibe también el nombre de biosíntesis. Se encarga de la síntesis de moléculas orgánicas (biomoléculas) más complejas a partir de otras más sencillas, orgánicas o inorgánicas, con requerimiento de energía y de poder reductor, proporcionados por el catabolismo.

Análisis colorimétrico: es aquel en el que se mide la intensidad de color de una solución como medida indirecta de la concentración del analito.

Análisis espectrofotométrico: método basado en la absorción o emisión de luz.

Análisis potenciométrico: técnica con la que se puede determinar la concentración de una especie cargada en una disolución, empleando un equipo que mide corriente llamado potenciómetro.

Analito: es un componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Es una especie química cuya presencia o contenido se desea conocer, identificable y cuantificable, mediante un proceso de medición química.

Anfipático: moléculas que poseen un extremo hidrofílico o sea que es soluble en agua y otro hidrófobo o sea que rechaza el agua.

Ánodo: electrodo positivo de una célula electrolítica hacia el que se dirigen los iones negativos dentro del electrolito, que por esto reciben el nombre de aniones.

Anticuerpo: también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado Ig; son glicoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos. El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño, contribuyendo a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada distinto tipo de cuerpo extraño que encuentran.

Antígeno: es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. La definición moderna abarca todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, bien sean propias o ajenas.

Antilogaritmo: el antilogaritmo de a es B si $10^a = b$

Balanza analítica: balanza de laboratorio diseñada para medir pequeñas masas, de un rango menor del miligramo.

Balanza mecánica: balanza cuya cruz oscila sobre un punto de apoyo. Se usan masas estándar para medir la masa de una muestra

Balanza: instrumento que sirve para medir la **masa** de los objetos.

Base débil: con constante de disociación débil: aporta iones OH⁻ al medio, pero está en equilibrio el número de moléculas disociadas con las que no lo están.

Base fuerte: es la que se disocia completamente en el agua, es decir, aporta el máximo número de iones OH⁻.

Base: sustancia que reduce la concentración de protones cuando se añade agua.

Biología molecular: disciplina científica que tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista macromolecular: ácidos nucleicos y proteínas.

Bitácora: cuaderno en el que se reportan los avances y resultados preliminares de un proyecto. En ella se incluyen a detalle, entre otras cosas, las observaciones, ideas, datos, avances y obstáculos en el desarrollo de las actividades que se llevan a cabo. Sigue un orden cronológico de acuerdo al avance del proyecto. Debe incluir y describir las condiciones exactas bajo las cuales se ha trabajado el proyecto. Nunca se le deben arrancar hojas ni borrar información; si se comete algún error, se debe poner una línea en diagonal para indicarlo, de tal forma que el texto se siga apreciando, puesto que cualquier detalle, incluso un error, puede llegar a ser utilizado posteriormente.

Biuret (Reactivo de): contiene sulfato de cobre en solución alcalina, se basa en la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presenta un máximo de absorción a 540 nm.

Blanco de muestra: disolución que no contenga al analito. Contiene todos los demás reactivos excepto el analito de interés.

Blanco de reactivos: disolución que contiene a la muestra pero no al reactivo que genera la respuesta a medir (por ejemplo, absorbancia).

Bureta: tubo calibrado de vidrio con una llave en su extremo inferior. Se usa para verter volúmenes con alta precisión.

Catabolismo: degradación de macromoléculas en productos de masa molecular menor, produciéndose la liberación de energía que se almacena principalmente en forma de ATP.

Catálisis: proceso por el cual se aumenta la velocidad de una reacción química, debido a la participación de una sustancia llamada catalizador.

Catalizador: Especie química que aumenta la velocidad de una reacción, disminuyendo la barrera energética de la conversión de reactivos a productos; aumentando las probabilidades de choque de los reactivos para dar el producto. No se modifica durante la reacción, lo cual lo diferencia de un reactivo.

Cátodo: electrodo negativo de una célula electrolítica hacia el que se dirigen los iones positivos, que por esto reciben el nombre de cationes.

Célula: unidad organizada y funcional con la posibilidad de conservarse y reproducirse que muestra todas las actividades de la vida.

Células competentes: célula que es capaz de tomar de una molécula de ADN y ser transformada.

Centrifugación: método que permite la separación de sólidos de líquidos por medio de fuerza giratoria.

Clon: población celular procedente de una sola célula y cuyos individuos tienen identidad propia.

Clonación: ensamblaje y reproducción de genes en un DNA extraño.

Coefficiente de extinción molar: parámetro que define cuan fuertemente una sustancia absorbe la luz a una dada longitud de onda, por unidad de concentración molar.

Coefficiente de variación: referencia de la relación entre la variabilidad de los datos con respecto al promedio. Se expresa en porcentaje.

Coenzima: son cofactores orgánicos no proteicos, termoestables, que unidos a una apoenzima constituyen la holoenzima o forma catalíticamente activa de la enzima. Tienen en general baja masa molecular (al menos comparada con la apoenzima) y son claves en el mecanismo de catálisis, por ejemplo, aceptando o donando electrones o grupos funcionales, que transportan de una enzima a otra

Cofactor: es un componente no proteico, termoestable y de baja masa molecular, necesario para la acción de una enzima. El cofactor se une a una estructura proteica, denominada apoenzima, y el complejo apoenzima-cofactor recibe el nombre de holoenzima. Aquellos cofactores que están covalentemente unidos a la apoenzima son denominados grupos prostéticos, ya sean orgánicos (coenzimas) o inorgánicos. Los cofactores son básicamente de dos tipos, iones metálicos y moléculas orgánicas, denominadas coenzimas.

Concentración: contenido de soluto en una disolución expresado en por ciento (gr de soluto en 100 gr de disolución), mol o equivalentes.

Conjugación: unión de dos bacterias por un pilli para la transferencia de DNA de una bacteria a otra.

Constante de disociación ácida: (K_a) es una medida cuantitativa de la relación entre un ácido disociado y sin disociar.

Constante de equilibrio: relación entre las concentraciones molares (mol/l) de reactivos y productos, cuando las velocidades de transformación de reactivos a productos y viceversa

son iguales (se ha alcanzado el equilibrio químico a ciertas condiciones de temperatura, presión y concentración dadas).

Constante de Recambio: k_{cat} o número de recambio, hace referencia al máximo número de reacciones enzimáticas catalizadas por segundo.

Constante de velocidad: Proporcionalidad entre la velocidad de reacción y las variables que la afectan, fundamentalmente la concentración.

Creviceular: epitelio simple localizado en la dentición. Se trata de un epitelio estratificado no queratinizado, sobre la superficie del diente en el fondo o base del surco gingival.

Cromatografía: método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, basado en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por tanto una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla. Puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente: 1) Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente. 2) Medir la proporción de los componentes de la mezcla.

Cualitativo: Busca información sobre la identidad o forma de la sustancia presente. Saber si un analito está o no presente sin cuantificarlo.

Cuantitativo: En química se conoce como análisis cuantitativo a la determinación de la abundancia absoluta o relativa (muchas veces expresada como concentración) de una, varias o todas las sustancias químicas presentes en una muestra.

Curva hiperbólica: Curva que muestra un aumento lineal en los primeros puntos pero que la variable independiente tiende asintóticamente a un valor, cuando aumenta el valor de la variable independiente.

Decantación: separación de un sólido o líquido más denso de otro fluido (líquido o gas) menos denso y que por lo tanto ocupa la parte superior de la mezcla.

Desnaturalización: cambio de la conformación natural a una conformación no natural o inactiva.

Destilación: separación mediante vaporización y condensación en los diferentes componentes líquidos, sólidos disueltos en líquidos o gases licuados de una mezcla, aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de las sustancias ya que el punto de ebullición es una propiedad intensiva de cada sustancia.

Desviación estándar: es una medida estadística de dispersión. Se define como la raíz cuadrada de la varianza de la variable.

Detergente: sustancia tensoactiva y anfipática que tiene la propiedad química de disolver sustancias no polares o hidrófobas en sustancias polares o hidrófilas.

Dilución: reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución.

Disociación: Separación reversible de una unión o de un complejo en dos o más componentes $AB \leftrightarrow A + B$

Disolución: mezcla de varias sustancias en porcentajes variables.

Ebullición: proceso físico en el que la materia pasa a estado gaseoso. Se realiza cuando la temperatura de la totalidad del líquido iguala al punto de ebullición del líquido a esa presión. Si se continúa calentando el líquido, éste absorbe el calor, pero sin aumentar la temperatura: el calor se emplea en la conversión de la materia en estado líquido al estado gaseoso, hasta que la totalidad de la masa pasa al estado gaseoso. En ese momento es posible aumentar la temperatura de la materia, ya como gas.

Electroforesis: migración de uniones químicas en un campo eléctrico.

Electroforesis en gel: separación de mezclas de sustancias macromoleculares cargadas eléctricamente en un gel sometido a un campo eléctrico.

Endonucleasa: enzimas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster en diferentes regiones ubicadas en el interior de una cadena de material genético. Esto las diferencia de las exonucleasas, que catalizan la escisión de enlaces fosfodiéster en los extremos de las cadenas.

Enzima de restricción: aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a este. Los sitios de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos. El mecanismo de corte de ADN se realiza a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de DNA. Éstos pueden ser romos (cuando los enlaces rotos coinciden) o Cohesivos/escalonados. Estos últimos tienen tendencia a volver a unirse de modo espontáneo, ya que los extremos se pueden unir a otros extremos coincidentes que pueda haber en la cercanía. Los fragmentos de ADN obtenidos de este modo pueden unirse por otras enzimas llamadas ligasas.

Enzima: moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas con una gran especificidad.

Error aleatorio: es aquel error inevitable que se produce por eventos únicos imposibles de controlar durante el proceso de medición. En un estudio de investigación, el error aleatorio o accidental viene determinado por el hecho de tomar sólo una muestra de una población para realizar inferencias. Puede disminuirse aumentando el tamaño de la muestra. Las fuentes de los errores aleatorios son difíciles de identificar o sus efectos no pueden corregirse del todo.

Error sistemático: aquel que se produce de igual modo en todas las **mediciones** que se realizan de una **magnitud**. Puede estar originado en un defecto del **instrumento**, en una particularidad del operador o del proceso de medición, etc. Este error no tiende a cero al aumentar el tamaño de la muestra. Está implícito en el diseño del estudio, y resulta difícil de corregir en la fase analítica. Determina lo que se conoce como **validez interna** del estudio.

Exactitud: Grado de concordancia entre el valor obtenido de la concentración del analito en la muestra y el valor verdadero.

Fase: en termodinámica y química, se denomina fase a cada una de las zonas macroscópicas del espacio de una composición química, y sus propiedades físicas homogéneas, que forman un sistema. Los sistemas monofásicos se denominan homogéneos, y los que están formados por varias fases se denominan mezclas o sistemas heterogéneos.

Fenotipo: expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos cuentan con rasgos tanto físicos como conductuales. Un fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. La diferencia entre genotipo y fenotipo es que el genotipo se puede distinguir observando el ADN y el fenotipo puede conocerse por medio de la observación de la apariencia externa de un organismo.

Fermentación: proceso catabólico de oxidación incompleta, que no requiere oxígeno, y el producto final es un compuesto orgánico.

Gel: sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida. Los geles presentan una densidad similar a los líquidos, sin embargo su estructura se asemeja más a la de un sólido.

Gen: una unidad de información dentro del genoma que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada. También se conoce como una secuencia de nucleótidos que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas pero también ARNm, ARNr y ARNt.

Genotipo: es la totalidad de la información genética contenido en el material hereditario.

Glucosa: monosacárido del grupo de las aldohexosas.

Grupos funcionales: grupos atómicos que dan un determinado carácter a compuesto químicos y que permiten su clasificación en tipos de sustancias con una función química común.

Hidrofílico: toda molécula que tiene afinidad por el agua.

Hidrófobo: sustancias que son repelidas por el agua o que no se pueden mezclar con ella. Un ejemplo de sustancias hidrófobas son los aceites.

Hidrólisis: ruptura de un enlace químico en presencia de agua.

Hipótesis: es una proposición aceptable que ha sido formulada a través de la recolección de información y datos, aunque no esté confirmada, sirve para responder de forma alternativa a un problema con base científica. El nivel de veracidad que se otorga a una hipótesis dependerá de la medida en que los datos empíricos apoyan lo afirmado en ella.

Incubar: Consiste en dejar una muestra sometida a condiciones (como temperatura, presión, concentración, etc.) determinados por un cierto tiempo, con la finalidad de esperar una respuesta (que se lleve a cabo una reacción, que crezcan microorganismos, etc).

Indicador: sustancia que cambia de color según sea el medio ácido o básico (tornasol), se utiliza en la determinación de punto de equilibrio.

Inóculo: en biología es ubicar algo que crecerá y se reproducirá. Se suele utilizar este término para referirse a la implantación de microorganismos en un medio de cultivo.

Intercambiador iónico: polímeros orgánicos o inorgánicos insolubles que presentan grupos iónicos cuyos inones antagonicos pueden ser cambiados por otros iones.

Iones: átomos o grupos atómicos que están cargados.

Lactosa: disacárido incoloro y cristalino formado por glucosa y galactosa.

Ley de acción de masas: determina en una reacción química reversible a temperatura constante las concentraciones de reactivos y productos.

Ley de Lambert-Beer: relación de la absorbancia (A) de una muestra con su concentración (c), distancia óptica (b) y la absortividad molar (ϵ)

Lipopolisacárido: también llamados endotoxinas, son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas. En su conjunto, forman una capa protectora hidrófila en torno a la célula bacteriana que no puede ser atravesada por moléculas lipófilas. Consta de lípido A, núcleo (también llamada Core, o región "R") y antígeno O.

Lisis celular: proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida del material intracelular.

Metabolismo: son todas las reacciones de síntesis, degradación y transformación que se producen en los organismos.

Mercaptoetanol: (HOCH₂CH₂SH) tioalcoholes, líquidos con olor repugnante. Actúa sobre las proteínas para reducir los puentes disulfuro.

Michaelis constante: (K_m) concentración de sustrato a la cual la enzima alcanza la mitad de su velocidad máxima.

Microbiota: conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano.

Molaridad: (M) moles de soluto por litro de disolución

Muestra: parte representativa del objeto, tomada en el espacio y el tiempo. Debe contener la(s) (alícuota)s de interés. Es lo que realmente se somete al proceso analítico.

Mutagénico: agentes que interactúan directa o indirectamente con el ADN y que provocan mutaciones en su secuencia.

Operón: unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interactúan las proteínas codificadas por sus genes. Este complejo está formado por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas), que participan en vías metabólicas cuya expresión generalmente está regulada por otros 3 factores de control, llamados: **Factor promotor:** zona que controla el inicio de la transcripción del operón, **Operador:** zona de control que permite la activación/desactivación del promotor a modo de "interruptor génico" por medio de su interacción con un compuesto inductor. **Gen regulador:** codificar factores de transcripción que se unan al promotor, regulando así la propia expresión del operón.

Oxidante: compuesto químico que oxida (quita electrones) a otra sustancia en reacciones electroquímicas o de reducción-oxidación. En estas reacciones, el compuesto oxidante se reduce (gana electrones).

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns), son pequeñas secuencias de moléculas encontradas en patógenos. Estos patrones moleculares son esenciales para el reconocimiento de los microorganismos por parte de las células de la inmunidad innata.

Pared celular: es una capa rígida que se localiza en el exterior de la membrana plasmática en las células de plantas, hongos, algas, bacterias y arqueas. En las plantas, la pared celular se compone, sobre todo, de un polímero de carbohidrato denominado celulosa, un polisacárido, y puede actuar también como almacén de carbohidratos para la célula. En las bacterias, la pared celular se compone de peptidoglicano. Entre las *archaea* se presentan paredes celulares con distintas composiciones químicas, incluyendo capas S de glicoproteínas, pseudopeptidoglicano o polisacáridos. Los hongos presentan paredes celulares de quitina, y las algas tienen típicamente paredes construidas a partir de glicoproteínas y polisacáridos. No obstante, algunas especies de algas pueden presentar una pared celular compuesta por dióxido de silicio.

Pastilla: Precipitado formado después de centrifugar una muestra; tiene mayor densidad que el sobrenadante.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Consiste en tres etapas fundamentales: desnaturalización (separación de la doble cadena de ADN), alineamiento de los nucleótidos y amplificación mediada por la enzima polimerasa (elongación de la cadena).

Pipeta: instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir la alícuota de un líquido con bastante precisión. Suelen ser de vidrio. Está formada por un tubo transparente que termina en una de sus puntas de forma cónica, y tiene una graduación (una serie de marcas grabadas) con la que se indican distintos volúmenes.

Plásmido: moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía desde 3 a 10 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula.

Postprandial: Evento fisiológico ocurrido posterior a la ingesta de alimentos.

Potencial de reducción: tendencia de las especies químicas en una reacción redox a adquirir electrones. Tiene unidades de energía.

Precisión: grado de concordancia mutua entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas de la misma muestra.

Probeta: instrumento volumétrico que consiste en un cilindro graduado de vidrio que permite contener líquidos y sirve para medir volúmenes de forma aproximada. Está formada por un tubo generalmente transparente de unos centímetros de diámetro y tiene una graduación desde 5 ml hasta el máximo de la probeta, indicando distintos volúmenes. En la parte inferior está cerrado y posee una base que sirve de apoyo, mientras que la superior está abierta (permite introducir el líquido a medir) y suele tener un pico (permite verter el líquido medido).

Prueba serológica: estudio que permite comprobar la presencia de anticuerpos en sangre.

Quelante: sustancia que tiene la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular.

Química analítica: rama de la química que tiene como finalidad el estudio de la composición química de un material o muestra, mediante diferentes métodos de laboratorio.

Química inorgánica: estudio integrado de la formación, composición, estructura y reacciones químicas de los elementos y compuestos inorgánicos (por ejemplo, ácido sulfúrico o carbonato cálcico); es decir, los que no poseen enlaces carbono-hidrógeno, porque éstos pertenecen al campo de la química orgánica.

Química orgánica: o química del carbono es la rama de la química que estudia una clase numerosa de moléculas que contienen carbono formando enlaces covalentes carbono-carbono o carbono-hidrógeno y otros heteroátomos, también conocidos como compuestos orgánicos.

Radical libre: es una especie química (orgánica o inorgánica), caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados. Se forma en el intermedio de reacciones químicas, a partir de la ruptura homolítica de una molécula y, en general, es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo y de vida media muy corta (milisegundos).

Reacción de ninhidrina: reacción coloreada en la que los grupos amino de los aminoácidos son librados en forma de amoniaco que reacciona con la ninhidrina dando una coloración

púrpura. Los grupos carboxilo se libera como dióxido de carbono y el resto del esqueleto carbonado se transforma en su aldehído correspondiente.

Redox: reacción química en la que uno o más electrones se transfieren entre los reactivos, provocando un cambio en sus estados de oxidación.

Reductor: aquel compuesto químico que cede electrones a un agente oxidante.

Regresión lineal: modelo matemático que permite relacionar dos variables (dependiente e independiente) mediante la ecuación de una línea recta, donde se caracteriza por un cierto valor de pendiente (término constante que expresa el número de veces que aumenta la variable independiente con respecto a la dependiente) y ordenada al origen (valor que toma la variable dependiente cuando la variable independiente vale cero).

Saturación: en bioquímica, se refiere a la fracción de los sitios de unión que están ocupados en un momento dado.

Sensibilidad: capacidad de un método analítico para discriminar entre concentraciones semejantes del analito en la muestra o capacidad para poder detectar (análisis cualitativo) o determinar (análisis cuantitativo) pequeñas concentraciones del analito en la muestra.

Serotipo: o serovar es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología. Un serotipo determinado es una subpoblación de un microorganismo infeccioso que se diferencia de otras subpoblaciones de la misma especie por medio de pruebas serológicas.

Sistema Inmune: conjunto de estructuras y procesos biológicos en el interior de un organismo que lo protege contra enfermedades identificando y matando células patógenas y cancerosas. Detecta una amplia variedad de agentes, desde virus hasta parásitos intestinales, y necesita distinguirlos de las propias células y tejidos sanos del organismo para funcionar correctamente.

Sobrenadante: Disolución que permanece tras la formación de un precipitado.

Sonicación: acto de aplicación de la **energía del sonido** (generalmente **ultrasonidos**) para agitar las partículas de una muestra, con diversos fines científicos o industriales.

Superenrollamiento DNA: molécula de DNA que como su título lo dice es superenrollada o girada sobre sí misma, de tal modo que el eje de la doble hélice propia del DNA no sigue una curva plana sino que forma otra hélice, una superhélice. Una molécula con la misma secuencia puede estar en estado relajado o en diferentes estados de enrollamiento. Estas

moléculas se conocen como topoisómeros, ya que son idénticas excepto en lo relativo a su topología.

Tensoactivo: sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (p.ej., dos líquidos insolubles uno en otro o una fase gaseosa en una fase líquida).

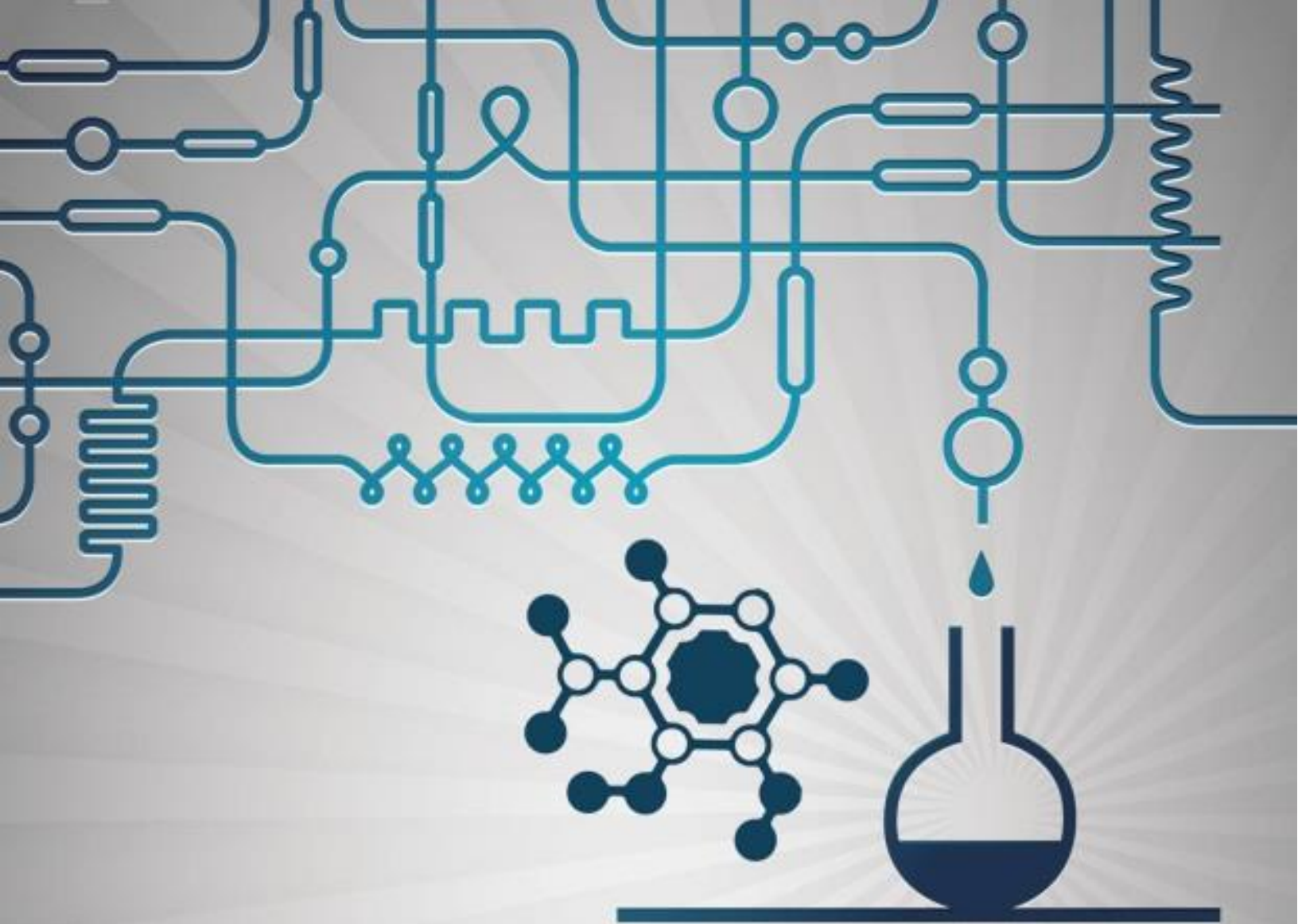
Tinción de Gram: es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias Gram negativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella. **FUNDAMENTO:** El cristal violeta penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El lugol actúa de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración. Los organismos gram positivos no se decoloran, mientras que los gram negativos sí lo hacen. Para poner de manifiesto las células gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen violetas. El alcohol o la acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos gram positivos, tratados con mordiente, y forma una barrera que la laca no puede atravesar. En las células gram negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células grampositivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo de cristal violeta con yodo.

Tornasol: pigmento de líquenes con ácidos se colorea rojo con álcalis azul, se utiliza en el reconocimiento del grado de acidez o basicidad de una solución.

Transmitancia: cantidad de energía que atraviesa un cuerpo en la unidad de tiempo.

Varianza: una medida de dispersión definida como el cuadrado de la desviación de una variable con respecto a su media (promedio).

Vector de clonación: moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados mediante técnicas de ADN recombinante. Para que sirva de vector, una molécula debe ser capaz de replicarse junto con el fragmento de ADN que transporta. También tiene que tener secuencias de reconocimiento que permitan la inserción del fragmento de ADN a clonar.



Facultad de Odontología

Mtro. José Arturo Fernández Pedrero
Director

C.D. Arturo Saracho Alarcón
Secretario General

Dra. Cristina Sifuentes Valenzuela
Secretaria Académica

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas
Coordinadora de Bioquímica

ISBN 970320025-7



9 789703 200252