Manual didáctico de actividades experimentales en bioquímica

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
COMISIÓN SECTORIAL DE ENSEÑANZA
Y EDUCACIÓN PERMANENTE

Coordinadora:
Florencia Tomasina

Autoras:
Gabriela Specker
Matilde Abboud
Jennyfer Martínez
Lucía Piacenza
María Noel Álvarez

Autor:
Mateo Schaffner

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY
Prorrectorado de **Enseñanza**

Coordinadora: Florencia Tomasina
Autoras: Gabriela Specker, Matilde Abboud,
Jennyfer Martínez, Lucía Piacenza y María Noel Álvarez
Autor: Mateo Schaffner

Manual didáctico de actividades experimentales en bioquímica

FACULTAD DE MEDICINA | UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY | Prorrectorado de Enseñanza

Manual didáctico de actividades experimentales en bioquímica/ Gabriela Specker, Matilde Abboud, Mateo Schaffner, Jennyfer Martínez, Lucía Piacenza y María Noel Álvarez – Montevideo Universidad de la República. Comisión Sectorial de Enseñanza y Educación Permanente, 2026

144 p. - (Manuales didácticos / Comisión Sectorial de Enseñanza y Educación Permanente)

ISBN: 978-9974-0-2372-7

1. BIOQUÍMICA
2. LABORATORIOS
3. NORMAS DE SEGURIDAD
4. ENSEÑANZA SUPERIOR
5. UNIVERSIDADES

I. Tomasina, Florencia coord. II. Specker, Gabriela III. Abboud, Matilde IV. Schaffner, Mateo V. Martínez, Jennyfer VI. Piacenza, Lucía VII. Álvarez, María Noel

CDD: 574.192

La publicación de este libro fue realizada con el apoyo de la Comisión Sectorial de Enseñanza y Educación Permanente (CSEEP) de la Universidad de la República (Udelar). El manual fue escrito en 2021 y revisado en 2023.

Evaluador externo: Carlos Batthyány



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0, Gabriela Specker, Matilde Abboud, Mateo Schaffner, Jennyfer Martínez, Lucía Piacenza y María Noel Álvarez. https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/

Comunicación y Publicaciones, CSEEP, Udelar
Alberto Lasplaces 1620, 11600 Montevideo, Montevideo
Tel.: (+598) 2400 8393

www.cse.udelar.edu.uy
comunicacion@cse.udelar.edu.uy

ISBN: 978-9974-0-2372-7

Coordinación editorial: **Matías Núñez**
Diseño de tapa: **Gabriela Pérez Caviglia**
Corrección de estilo: **Eloisa Figueredo**
Diagramación: **Levy Apolinar**

Índice

Agradecimientos 11

Prefacio 13

Capítulo 1 15
Pautas básicas de seguridad en el laboratorio 15

Bibliografía 17
Técnicas generales para actividades experimentales de bioquímica 18

Capítulo 2 19
Preparación de soluciones 19

2.1. Introducción 19
2.1.1. Gramos/litro 19
2.1.2. Porcentaje masa/volumen 19
2.1.3. Molaridad 19
2.1.4. Osmolaridad 20
2.2. Preparación de una solución por dilución 21
2.3. Ejercicios de rutina de laboratorio 21
2.3.1. Preparación de una solución 0,5 M 21
2.3.2. Preparación de una solución 0,3 % masa/volumen 22
2.3.3. Preparación de una solución isotónica 22
2.3.4. Preparación de una solución por dilución 23
2.4. Actividad experimental 24
2.4.1. Preparación de soluciones con diferentes osmolaridades: efecto en los glóbulos rojos 24
Bibliografía 26

Capítulo 3 27
pH 27

3.1. Introducción 27
3.2. Ácidos, bases y soluciones amortiguadoras 29
3.3. Determinación del pH 30
3.3.1. Métodos potenciométricos (con pHmetro) 30
3.3.2. Métodos colorimétricos (utilizando indicadores de pH) 31
3.4. Titulación. Curva de titulación 32
3.5. Ejercicios de rutina de laboratorio 34
3.5.1. Preparación de soluciones 34
3.6. Actividades experimentales 36
3.6.1. Soluciones amortiguadoras 36
3.6.2. Titulación de un aminoácido 38
Bibliografía 40

Capítulo 4 41
Espectrofotometría 41

4.1. Introducción 41
4.1.1. La luz 41
4.1.2. Espectrofotómetro 41
4.1.3. Absorbancia 42
4.1.4. Espectro de absorción 42
4.1.5. Ley de Lambert y Beer 43
4.1.6. Determinación de la concentración de una muestra. Consejos experimentales 44
4.1.7. Métodos indirectos. Métodos colorimétricos 44
4.2. Cuantificación de proteínas 45
4.2.1. Cuantificación de proteínas utilizando propiedades intrínsecas 45
4.2.2. Cuantificación de proteínas utilizando métodos indirectos (colorimétricos) 46
4.3. Cuantificación de glúcidos reductores 50
4.3.1. Cuantificación de glúcidos reductores utilizando la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico 50
4.4. Cuantificación de α-cetoácidos 53
4.4.1. Cuantificación de α-cetoácidos utilizando la reacción con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina 53
4.5. Determinación de la velocidad de reacción. Cinética enzimática 56
4.5.1. Definición de velocidad inicial de una reacción 56
4.5.2. Definición de enzima 58
4.5.3. Determinación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima 59
4.5.4. Cinética enzimática. Determinación de parámetros cinéticos 60
4.5.5. Actividad enzimática (U) y actividad específica (U/mg) 62
4.6. Inmunoensayo enzimático (ELISA) 62
4.6.1. Introducción 62
4.6.2. Procedimiento experimental 63
4.7. Ejercicios de rutina de laboratorio 64
4.7.1. Espectros de absorción 64
4.7.2. Determinación de la velocidad inicial 66
4.7.3. Parámetros cinéticos 67
4.8. Actividades experimentales 72
4.8.1. Cuantificación de proteínas 72
4.8.2. Espectros de absorción de la hemoglobina 74
4.8.3. Determinación de la velocidad máxima de una reacción catalizada por la enzima invertasa 75
Bibliografía 80

Capítulo 5 81
Técnicas separativas 81

5.1. Electroforesis 81
5.1.1. Electroforesis en papel 82
5.1.2. Electroforesis en gel 84

5.2. Western blot (WB) ... 91
5.2.1. Introducción ... 91
5.2.2. Procedimiento experimental ... 92
5.3. Cromatografía ... 93
5.3.1. Cromatografía plana ... 93
5.3.2. Cromatografía en columna ... 94
5.4. Ejercicios de rutina de laboratorio ... 98
5.4.1. Electroforesis de aminoácidos ... 99
5.4.2. Análisis de una electroforesis desnaturalizante ... 99
5.4.3. Análisis de muestras por western blot ... 101
5.4.4. Resultado de una cromatografía de capa fina (TLC) ... 101
5.4.5. Técnicas cromatográficas ... 103
5.5. Actividades experimentales ... 103
5.5.1. Estudio de la hemoglobina ... 104
Bibliografía ... 106

Capítulo 6 ... 107
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ... 107

6.1. Introducción ... 107
6.2. Procedimiento experimental ... 108
6.3. Ejercicios de rutina en el laboratorio ... 110
6.3.1. Diseño de cebadores ... 110
6.3.2. Análisis de resultados de una PCR ... 111
6.3.3. Análisis de resultados de una PCR ... 111
6.4. Actividad experimental ... 112
6.4.1. Amplificación de la subunidad β de la hemoglobina ... 112
Bibliografía ... 117

Capítulo 7 ... 119
Actividades experimentales ... 119

7.1. Estudio de caso: Julia en el laboratorio ... 120
7.2. Estudio de caso: soluciones amortiguadoras ... 120
7.3. Cuantificación de proteínas en muestras de plasma y orina de pacientes ... 121
7.4. Efecto del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por la enzima invertasa ... 121
7.5. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima β-fructofuranosidasa (invertasa o sacarasa) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ... 125
7.6. Determinación de parámetros cinéticos y efectos de un inhibidor sobre la enzima xantina oxidasa ... 128
7.7. Estudio de una ruta metabólica: la glucólisis ... 132
7.8. Determinación de la concentración de glucosa y proteínas plasmáticas en plasma y orina ... 135
7.9. Detección de anemia falciforme por PCR ... 138
Bibliografía ... 141

Glosario de abreviaturas y símbolos ... 142

Dedicamos este manual didáctico a las docentes y los docentes que han contribuido, en el trabajo colectivo, a la elaboración de sus contenidos.

Agradecimientos

Este trabajo recopila actividades experimentales que fueron creadas y modificadas por docentes para las diferentes unidades curriculares y optativas en las que participa la Unidad Académica Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República (Udelar). Agradecemos especialmente a quienes han ido creando y construyendo cada uno de estos materiales que hoy recopilamos en este manual.

Prefacio

En este manual se presentan actividades experimentales elaboradas por el Departamento de Bioquímica en las unidades curriculares en las que participa durante el desarrollo de la carrera de grado de Doctor en Medicina. Las actividades se ordenan en varios capítulos que van aumentando gradualmente la dificultad.

Desde el Departamento de Bioquímica consideramos que la actividad experimental es clave en el proceso de enseñanza de esta disciplina porque permite el desarrollo de habilidades y destrezas vinculadas a la aplicación de los contenidos teóricos. Implica una oportunidad para plantear y resolver problemas desplegando un conjunto de habilidades específicas. Es un espacio de estímulo para el estudiantado, una forma diferente de motivación para el aprendizaje. Combina los conceptos teóricos y desarrolla el espíritu crítico, formando estudiantes capaces de resolver problemas. Las actividades experimentales de laboratorio son una estrategia didáctica significativa para fomentar la creatividad y motivar para el aprendizaje.

Esta publicación está organizada en siete capítulos. En el primero se describen normas básicas de seguridad, importantes como conocimiento previo al ingreso a un laboratorio y para comenzar a trabajar. Del segundo al sexto capítulo se desarrollan conceptos básicos de laboratorio con ejercicios guías y actividades experimentales; se busca la adquisición de las diferentes técnicas con la realización de ejercicios paso a paso. El último capítulo se enfoca en tareas más complejas, que unen las diferentes técnicas y buscan plantear actividades cuya resolución implique un rol activo del estudiantado, con el planteo de hipótesis y la toma de decisiones que permitan llegar a responder las preguntas y objetivos planteados. De esta forma, el manual va complejizando su contenido y acompañando a cada estudiante en su crecimiento, en la adquisición de destrezas de laboratorio y en la aplicación de los diferentes conocimientos. Se pretende favorecer la adquisición de diferentes habilidades y técnicas, el desarrollo del pensamiento crítico y la aplicación del método científico.

Capítulo 1

Pautas básicas de seguridad en el laboratorio

El objetivo de este capítulo es desarrollar pautas básicas de convivencia y seguridad en el laboratorio. Realizar experimentación conlleva riesgos y es muy importante que se conozcan de antemano para evitarlos.

El orden es parte esencial de la vida en el laboratorio y mantener una organización correcta permite un trabajo cómodo y seguro. En tal sentido, es fundamental guardar las pertenencias en armarios especialmente diseñados y evitar dejar bolsos en el piso ya que pueden provocar caídas y obstruir las salidas en caso de emergencia. En las mesadas se debe trabajar con comodidad y con espacio, por lo que es preciso guardar todo lo que sea innecesario. Estos pequeños cuidados favorecerán la convivencia.

Hay que evitar correr en el laboratorio. En caso de emergencia, se sale de forma ordenada y tranquila, sin empujar a las demás personas. Las mesadas del laboratorio están diseñadas para no obstruir la salida.

Al ingresar al laboratorio por primera vez es necesario conocer dónde se ubican los elementos de protección, por ejemplo, los extinguidores, el lavador de ojos y el botiquín. Conocer su ubicación nos permite actuar rápidamente si necesitamos usarlos.

Se debe usar una túnica, que protege al usuario frente a derrames, así como también el pelo recogido. No se puede comer ni beber para evitar llevar contaminantes a la boca y está prohibido fumar debido a la presencia de reactivos inflamables.

En el contexto de una práctica de laboratorio, debe conocer al docente referente a quien acudirá ante cualquier accidente o duda sobre cómo proceder durante la actividad. Tiene que leer previamente el protocolo que va a seguir y es vital que conozca las propiedades de los reactivos con los que trabaja —conocer si es explosivo o inflamable, así como su toxicidad—. Es necesario que sepa cómo se recomienda su manipulación, por ejemplo, si debe usar guantes o manipular en campana de extracción de gases. Deberá conocer cómo se destruye el exceso de reactivo y sus residuos, al igual que la forma de actuar frente a un derrame.

Los disolventes concentrados de soluciones orgánicas y ácidos deben usarse en campanas de extracción de gases. Si se descartan ácidos y bases, es necesario llevarlos a la neutralidad, verificando el valor de pH de la solución de descarte. En caso de contacto con ácidos o bases, es fundamental lavarse con abundante agua dado que pueden generar quemaduras graves en la piel y los ojos.

Para la manipulación de agentes intercalantes se recomienda el uso de guantes y el posterior descarte de todos los materiales que entren en contacto con estos, por ejemplo, puntas de pipetas automáticas y guantes se desechan en bolsas específicas para el descarte de material biológico. Los equipos electroforéticos deben lavarse con abundante agua.

La manipulación de los polvos de acrilamida y de bisacrilamida, utilizados para realizar geles de poliacrilamida (PAGE) debe hacerse en campana de extracción utilizando mascarilla, lentes y guantes. El polvo es un potencial cancerígeno que puede irritar la piel y las vías respiratorias. Frente a un derrame de líquido no polimerizado de acrilamida/bisacrilamida, retire con material absorbente y trate el sitio con persulfato de sodio, que permite la polimerización. Dejar reposar durante 30 minutos y luego lavar con abundante agua.

A los efectos de mantener el orden, es fundamental rotular claramente las soluciones para preparar, lo que incluye saber qué reactivo es, su concentración, la fecha correspondiente y el nombre de quien la preparó. Cada tubo que va a utilizar debe estar marcado. No debe dejar reactivos o soluciones sobre la mesada sin su etiqueta correspondiente. En caso de derrames, primero se debe evaluar el incidente, luego hay que asegurar el área y notificar el incidente, en tercer lugar, controlar el derrame, y finalmente, limpiar la zona contaminada. Es importante avisar al resto de los presentes para evitar que otros utilicen esa zona.

Si se utilizan cortopunzantes, hay que depositarlos en los contenedores amarillos correspondientes luego del uso. Al trabajar con muestras biológicas siempre se deben usar túnica y guantes. Los guantes y los materiales como tubos, puntas y otros que hayan entrado en contacto con las muestras biológicas se descartan en recipientes que contengan hipoclorito y deben permanecer allí por 24 horas antes de su descarte. Si se usan balanzas, se debe limpiar la zona después de su uso.

Es fundamental tener un cuaderno de laboratorio para registrar todos los pasos del proceso de experimentación. La función del cuaderno es dejar un registro de lo que hizo y observó, y es importante que las notas sean claras para que otra persona logre interpretarlas.

Al finalizar la estancia en el laboratorio, se debe volver al orden inicial, no pueden quedar residuos sobre la mesada ni materiales sin rotular, y hay que apagar los equipos electrónicos. Es importante lavarse las manos antes de irse del laboratorio para evitar llevar consigo componentes químicos peligrosos.

Bibliografía

Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos. (s.f.). *Ficha de datos de seguridad de materiales: ácido sulfúrico*. https://www.ciafa.org.ar/files/qKzC6XQKs7Ck7K966mbkQTexmqOIaKiJCNi6pq5s.pdf

Cervantes, M., Gutiérrez, L., Reynoso, A., Canihua, J., López, E., Munarriz, J., Flores, I., Sales, B., y Guerrero, L. (2021). *Manual de buenas prácticas de laboratorio*. Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Harris, D. C. (2003). Instrumentos de laboratorio. En *Análisis químico cuantitativo* (pp. 29-31). Reverté.

Thermo Fisher Scientific. (s. f.). *Ficha de datos de seguridad: Ethidium bromide, 1% solution/Molecular Biology*. https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=10132863&productDescription=10ML+Ethidium+bromide%2C+1%25+Solution%2FMolecular+Biology&countryCode=ES&language=es

Técnicas generales para actividades experimentales de bioquímica

En los siguientes capítulos se plantean diferentes técnicas que se desarrollan en los laboratorios del área científico-tecnológica. Cada capítulo comienza con conceptos teóricos introductorios, luego se describen ejemplos de sus diferentes aplicaciones y se plantean ejercicios con resolución y actividades experimentales.

Se busca avanzar desde conceptos sencillos a conceptos más complejos. Se acompaña cada sección con ejercicios de rutina de laboratorio que tienen resolución y se explica paso a paso cómo se llega al resultado. Al finalizar cada capítulo, se plantean actividades experimentales que tienen como objetivo que el estudiante desarrolle procedimientos de tipo sensomotor de acción y observación y adquiera el manejo instrumental correspondiente a cada técnica.

Con este formato se busca acompañar el proceso en el que cada estudiante primero comprende los conceptos teóricos que hay detrás de la actividad experimental, luego los aplica en papel para realmente incorporarlos diseñando sus propios objetivos y protocolo experimental, para finalizar obteniendo sus propios resultados en el laboratorio.

CAPÍTULO 2

Preparación de soluciones

La preparación de soluciones es una tarea fundamental en el día a día de un laboratorio. Para estudiar una reacción química es necesario preparar los reactivos a concentraciones específicas e incluso ajustarlos a un pH determinado. Las soluciones permiten controlar diversas condiciones experimentales; por ejemplo, al simular condiciones fisiológicas, se preparan soluciones amortiguadoras con un pH de 7,4 y una concentración en el entorno de los 310 mOsm.

En este capítulo se aborda la definición de una solución y las unidades de concentración más utilizadas. Se plantean ejercicios con resolución para brindar apoyo en la preparación de diferentes soluciones. Por último, se plantean actividades experimentales que permiten a cada estudiante ponerse a prueba en el laboratorio y desarrollar los conceptos aprendidos.

2.1. Introducción

Una solución es una mezcla homogénea de al menos dos componentes. Se denomina solvente al componente que se encuentra en mayor proporción y soluto, o solutos, a los componentes que se encuentran en menor proporción. El solvente más frecuente es el agua, pero también hay solventes de tipo orgánico, como el etanol. En esta sección se presentan las principales formas de expresar la concentración de los solutos en una solución y cómo preparar las soluciones en el laboratorio.

2.1.1. Gramos/litro

Es una de las formas de expresión de concentración más utilizadas en la medicina. Implica dividir la masa en gramos del soluto sobre el volumen de la solución en litros. Existen varianzas según la unidad de la masa, por ejemplo, mg/L, o con el volumen, g/dL.

2.1.2. Porcentaje masa/volumen

El porcentaje masa/volumen (% m/v) indica la masa en gramos de soluto que hay por cada 100mL de solución. Matemáticamente se expresa de la siguiente forma:

$$\%\frac{masa}{volumen} = \frac{masa\ en\ gramos}{volumen\ en\ mL}.100 \qquad [2.1]$$

2.1.3. Molaridad

La molaridad es la forma de expresar la concentración de una solución más utilizada en el área bioquímica, ya que expresa la cantidad de moléculas o partículas presentes en dicha solución. La molaridad corresponde a la cantidad de moles de soluto por litro de solución.

Matemáticamente se expresa de la siguiente forma:

$$Molaridad\ (M)\ =\ \frac{moles}{volumen} \qquad [2.2]$$

Un mol corresponde a $6{,}022 \times 10^{23}$ partículas independientemente de la molécula que se esté analizando.

En el laboratorio se cuenta generalmente con los reactivos en forma de polvo, por lo que hay que masarlos en una balanza. Para relacionar los moles de una molécula con la masa, se utiliza el peso molecular que relaciona la masa en gramos y los moles de una molécula:

$$PM\ (peso\ molecular) = \frac{masa\ (gramos)}{moles} \qquad [2.3]$$

El peso molecular es la suma de las masas atómicas que componen esa molécula y el dato se encuentra en la tabla periódica de los elementos.

2.1.4. Osmolaridad

La osmolaridad se corresponde con la suma de todas las partículas presentes en una solución, independientemente de las características químicas del soluto. La ósmosis es el estudio del movimiento del agua a través de membranas semipermeables desde una región de menor concentración de partículas a una de mayor concentración. Este efecto es un factor muy importante en la vida de las células.

Matemáticamente se calcula la osmolaridad de una solución:

$$Osmolaridad = [\,] \,.\, i \qquad [2.4]$$

La concentración del soluto es [ ] e i la cantidad de partículas osmóticamente activas de cada molécula en solución.

Para conocer el valor de i de una molécula, es necesario saber cómo se comporta en una solución, es decir, si se disocia en más de una partícula o si, por el contrario, se mantiene como una única partícula. Por ejemplo, las sales en solución se disocian en su parte catión y en su contra ion aniónico, por lo que aportan más de una partícula a la solución. Las biomoléculas como los glúcidos y proteínas en solución no se disocian en más partículas, por lo que su i es de 1. Por ejemplo, el cloruro de sodio (NaCl) en solución se disocia en su catión (Na^+) y en su anión (Cl^-), por lo que el i es de 2 (dos partículas en solución).

En biología se conocen como soluciones isotónicas aquellas que presentan la misma osmolaridad que el medio intracelular (280mOsm y 310 mOsm). Se denominan hipertónicas las soluciones con mayor osmolaridad que las isotónicas, lo que implica que una célula en una solución hipertónica perderá agua intracelular y se deshidratará, dado que el agua fluye de la región con menor concentración a la región con mayor concentración. Se denomina solución hipotónica a aquella solución que tiene una concentración osmolar menor a la del medio intracelular. El agua en una solución hipotónica fluye desde la solución que tiene menos concentración de partículas al medio intracelular, lo que implica que la célula aumenta de volumen; en el caso de las células que no poseen pared celular, se rompe su membrana plasmática. Las células presentan generalmente concentraciones altas de

biomoléculas y iones y existen distintas estrategias para evitar el contacto con soluciones de diferente osmolaridad. En bacterias y plantas, la membrana plasmática está rodeada de una pared celular rígida que resiste la presión osmótica.

2.2. Preparación de una solución por dilución

Una dilución es una disminución en la concentración de una solución. Se obtiene partiendo de una solución con una concentración determinada y agregando un disolvente como, por ejemplo, el agua. Esta técnica es muy utilizada para preparar una solución con una concentración específica a partir de una solución concentrada, es decir, de una concentración mayor a la deseada. La ecuación base que permite calcular el volumen que se debe tomar de la solución concentrada para obtener el volumen de la concentración deseada es:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \qquad [2.5]$$

Donde,

C_1 corresponde a la concentración de la solución concentrada inicial;
V_1 es el volumen que debe tomar de esa solución inicial para pasarlo al tubo donde prepara la solución deseada;
C_2 es la concentración de la solución que desea preparar;
V_2 es el volumen de la solución que desea preparar.

2.3. Ejercicios de rutina de laboratorio

El objetivo de esta sección es ayudar a sortear las dificultades que puede tener el estudiantado a la hora de preparar soluciones. Entender cómo se hacen y cómo se calculan es fundamental para comprender y realizar actividades más complejas.

La manera de abordar este tema es a través de actividades experimentales que apliquen los conceptos teóricos fundamentales. Específicamente, se muestran planteos cotidianos en la vida de un laboratorio con la resolución correspondiente, como forma de guiar al estudiante para que sepa cómo se resuelven este tipo de preparaciones y cuál es el razonamiento que hay detrás. Así, se busca que el estudiantado realice los procedimientos intelectuales para adquirir los conceptos teóricos fundamentales para la preparación de soluciones.

2.3.1. Preparación de una solución 0,5 M

Se desea preparar una solución de 100 mL de Na_3PO_4 0,5 M. Describa los pasos que se deben realizar en el laboratorio para preparar la solución.

Dato PM $Na_3(PO_4)$ = 163,3 g/mol

Resolución

El $Na_3(PO_4)$ es un reactivo en polvo, por lo que inicialmente se debe calcular la masa que se deberá masar. Para calcular la masa, primero hay que calcular el número de moles que se necesita para preparar la solución y, posteriormente, utilizando el peso molecular, determinar la masa a pesar. Se aplica la ecuación 2.2 y luego la ecuación 2.3:

$$M = \frac{moles}{volumen\ (litro)} \rightarrow M\ .\ volumen = moles \rightarrow 0{,}5\ .\ 0{,}1 = \ 0{,}05\ moles$$

$$PM = \frac{masa\ (gramos)}{moles} \rightarrow PM\ .\ moles = masa\ \rightarrow 0{,}05\ .\ 163{,}3 = 8{,}17\ g$$

Una vez determinada la masa del reactivo (8,17 g), se coloca en un vaso de bohemia y se agrega un volumen en el entorno de la mitad del volumen final, en este caso, 50 mL. Luego se disuelve la solución utilizando un agitador y, posteriormente, se trasvasa esa solución a una probeta. Se completa con la cantidad de agua destilada suficiente para llegar al volumen final, en este caso, los 100 mL. Para hacer el enrasado es importante colocar nuestra vista a la misma altura de la probeta. Este procedimiento permite tomar en cuenta el volumen agregado del reactivo.

2.3.2. Preparación de una solución 0,3 % masa/volumen

Se desea preparar una solución de 300 mL de cloruro de potasio (KCl) 0,3 % masa/volumen. Describa los pasos para realizarla en el laboratorio.

Resolución

En este caso, se trata de un reactivo en polvo, por lo que se debe masar para poder preparar la solución. Tomando en cuenta que 0,3 % masa/volumen significa 0,3 gramos de KCl en 100 mL de solución, 300 mL implica que se deben pesar 0,9 gramos.

Una vez determinada la masa del reactivo (0,9 gramos), se coloca en un vaso de bohemia y se agrega un volumen en el entorno de la mitad del volumen final, en este caso, 150 mL. Luego se disuelve la solución utilizando un agitador y, posteriormente, se trasvasa esa solución a una probeta. Se completa con cantidad de agua destilada suficiente para llegar al volumen final, en este caso, los 300 mL.

2.3.3. Preparación de una solución isotónica

Un compañero del laboratorio quiere utilizar la solución anterior para lavar glóbulos rojos, pero solo le puede servir si la solución es isotónica con el medio interno. Definir si la solución es hipotónica, isotónica o hipertónica.

Dato PM KCl = 74,55 g/mol

Resolución

Para conocer si la solución es hipotónica, isotónica o hipertónica se debe determinar la osmolaridad de la solución y luego comparar con la del medio interno (280-310 mOsm).

Para calcular la osmolaridad se utiliza la ecuación 2.4:

$$Osmolaridad = [\,] \,.\, i$$

La concentración se debe pasar a molaridad, por lo tanto, se debe determinar primero el número de moles en los 0,9 gramos (ec. 2.3):

$$moles = \frac{masa\ (gramos)}{PM\ (\frac{g}{mol})} = \frac{0{,}9\ g}{74{,}55\ g/mol} = 0{,}012\ moles$$

Posteriormente, se determina la molaridad (ec. 2.2):

$$M = \frac{moles}{volumen\ (litro)} = \frac{0{,}012\ moles}{0{,}3\ L} = 0{,}04\ M$$

Sabiendo entonces la molaridad, resta conocer el i, es decir, el número de partículas osmóticamente activas. En este caso, el KCl, al ser una sal, se disocia en solución en K^+ y Cl^-, por lo tanto, el i es igual a 2.

Sustituyendo en la ecuación 2.4,

$$Osmolaridad = [\,] \,.\, i \rightarrow Osm = 0{,}04\ M \,.\, 2 = 0{,}08\ Osm \rightarrow 80\ mOsm$$

Por lo tanto, esta solución de KCl es una solución hipotónica y no sirve para lavar glóbulos rojos.

2.3.4. Preparación de una solución por dilución

Se cuenta en el laboratorio con 2 litros de una solución de fosfato de sodio 1 M y se desea preparar 1 litro de una solución 200 mM. Describir el procedimiento.

Resolución

Utilizando la relación de dilución (ec. 2.5), se puede determinar el volumen a tomar de la solución más concentrada para posteriormente diluir con agua hasta el volumen final deseado.

$$C_1 \,.\, V_1 = C_2 \,.\, V_2$$

C_1 corresponde a la concentración de la solución de fosfato de sodio 1 M.
V_1 al volumen que se debe tomar de esa solución para luego diluir en el volumen final.
C_2 es la concentración de la solución deseada.
V_2 es el volumen final deseado.

Las unidades de concentración utilizadas, al igual que las del volumen, deben ser iguales. Por lo tanto, se debe pasar las unidades de concentración de mM a M, y eso es dividiendo entre 1000.

$$1\text{M} \,.\, V_1 = 0{,}2\text{M} \,.\, 1\ \text{L}$$
$$V_1 = 0{,}2\ \text{L}$$

Por lo tanto, se debe colocar en una probeta 200 mL de la solución concentrada, y llevar a 1 L con agua destilada para obtener la concentración final deseada.

2.4. Actividad experimental

En esta sección se describe una actividad experimental que tiene como objetivo de aprendizaje la preparación de diferentes soluciones para un problema planteado, acercando los conceptos teóricos. La actividad experimental consta de un procedimiento paso a paso, se busca así que el estudiantado conozca una forma de proceder para resolver un problema experimental.

2.4.1. Preparación de soluciones con diferentes osmolaridades: efecto en los glóbulos rojos

Objetivo

Evaluar el efecto de la osmolaridad sobre la integridad de la membrana de los glóbulos rojos.

Introducción

Los glóbulos rojos son las células mayoritarias del componente sanguíneo y poseen una concentración intracelular de entre 280 mOsm y 310 mOsm. El plasma sanguíneo corresponde a la parte no celular de la sangre y posee la misma concentración osmolar, lo que mantiene la integridad de los glóbulos rojos. Concentraciones más altas (soluciones hipertónicas) inducen a un glóbulo rojo deshidratado, mientras que soluciones menos concentradas (soluciones hipotónicas) hacen que el glóbulo rojo se lise (se rompa).

En esta actividad, se preparan tres soluciones de cloruro de sodio (NaCl) con osmolaridades diferentes con el fin de evaluar la integridad de la membrana celular. Para esto se trabaja con un concentrado de glóbulos rojos que se exponen a las diferentes soluciones preparadas de NaCl, y se evalúa la integridad de la membrana utilizando técnicas de microscopía y por centrifugación.

Procedimiento experimental

a) Preparar 100 mL de una solución de NaCl 310 mOsm y 50 mL de una solución 620 mOsm.
b) Preparar 50 mL de una solución 31 mOsm a partir de la solución 310 mOsm. Realizar una dilución al décimo (45 mL de agua destilada más 5 mL de la solución 310 mOsm).
c) Incubar durante 10 minutos 0,5 mL de sangre entera en 2,5 mL de cada una de las soluciones usando tubos de centrífuga.

d) Al finalizar la incubación tomar 10 µL de cada tubo, montar en un preparado y observar en el microscopio.
e) Centrifugar por 5 minutos el resto de la sangre a 1000 × g, y observar los sobrenadantes y precipitados de las tres condiciones.

Informe de actividades

Completar la tabla 2.1 según lo observado para cada solución.

Tabla 2.1

Solución	**Observación microscópica**	**Observación centrífuga**	
		Pellet	**Sobrenadante**
31 mOsm			
310 mOsm			
620 mOsm			

Discutir sobre el efecto de las tres soluciones sobre los glóbulos rojos. ¿A qué se debe este efecto?

Bibliografía

Chang, R., y College, W. (2002). Propiedades físicas de las disoluciones. En *Química* (pp. 467-504). McGraw-Hill.

Harris, D. C. (2003). Medidas. En *Análisis químico cuantitativo* (pp. 13-27). Reverté.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2014). El agua. En *Principios de bioquímica* (6.ª ed., pp. 47-74). Omega.

Voet, D., y Voet, J. G. (2010). Aqueous Solutions. En *Biochemistry* (4.ª ed., pp. 40-51). John Wiley & Sons.

pH

En este capítulo seguiremos escalando en los diferentes conceptos cotidianos de la vida en un laboratorio. El pH es una forma de expresar la concentración de hidrogeniones presentes en una solución. Conocer y controlar la concentración de hidrogeniones en una solución es fundamental a la hora de hacer experimentos. Las reacciones tienen diferentes rendimientos, la actividad enzimática varía y las proteínas cambian su conformación, estos son solo algunos ejemplos en los que el pH cobra un rol fundamental.

El capítulo se inicia con las definiciones de pH, de ácido, de bases y de las soluciones amortiguadoras. Luego se explica cómo se realiza una titulación, técnica ampliamente utilizada en los laboratorios, y se plantean ejercicios con resolución para brindar apoyo en la preparación de diferentes soluciones. Por último, se plantean actividades experimentales que permiten a cada estudiante ponerse a prueba en el laboratorio y desarrollar los conceptos aprendidos.

3.1. Introducción

El pH se define de manera matemática como:

$$pH = -\log[H^+] \qquad [3.1]$$

El pH es una forma de expresar la concentración de hidrogeniones (protones) $[H^+]$ presentes en una solución en base 10. Utilizar potencias permite el trabajo con números enteros.

La reactividad química del H^+ es de suma importancia para los procesos biológicos ya que participa tanto en reacciones químicas sencillas como en procesos patológicos importantes en medicina, como los trastornos del equilibrio ácido/base.

La concentración de H^+ es una variable altamente regulada por los organismos, que disponen de sofisticados mecanismos para mantenerla dentro de niveles compatibles con las reacciones químicas necesarias para sostener la vida. Para comprender cómo funcionan estos mecanismos, es necesario antes estudiar algunas características del agua y los ácidos.

El agua es capaz de ionizarse en sus constituyentes H^+ y OH^- de forma tal que:

$$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^- \qquad [3.2]$$

Las hemirreacciones del equilibrio y sus velocidades están dadas por:

$$H_2O \rightarrow H^+ + OH^- \qquad v_1 = k_1.[H_2O] \qquad [3.3]$$

$$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O \qquad v_2 = k_2.[H^+].[OH^-] \qquad [3.4]$$

En equilibrio, la velocidad de formación del agua y de descomposición se igualan, de esta forma:

$$k_1.[H_2O] = k_2.[H^+].[OH^-] \qquad [3.5]$$

De donde,

$$k_1.k_2 = \frac{[H^+].[OH^-]}{[H_2O]} \rightarrow k_1.k_2 = K_{eq} \qquad [3.6]$$

Siendo,

$$k_{eq}.[H_2O] = [H^+].[OH^-]$$

$$K_w = [H^+].[OH^-] \qquad [3.7]$$

K_w corresponde a la constante de disociación del agua (*w,* del inglés *water*).

La constante de equilibrio de la disociación del agua en sus iones (K_{eq}) determinada mediante medidas de conductividad eléctrica es de 1,8 × 10^{-16} M. Sabiendo, además, que el peso molecular del agua es de 18 g/mol y que un litro pesa 1000g (densidad = 1 g/L), podemos calcular la molaridad del agua.

$$\left[H_2O\right] = \frac{\frac{1000\ g}{18\ g/mol}}{1\ L} = 55,6\ M$$

Dado que la disociación del agua en sus constituyentes es ínfima y no cambia significativamente, se puede entonces asumir que es constante y, por lo tanto:

$$55,6 . 1,8\ x\ 10^{-16} = [H^+][OH^-] \rightarrow K_w = 1\ x\ 10^{-14}\ M^2$$

Despejando,

$$[H^+] = [OH^-] \rightarrow \sqrt{1\ x\ 10^{-14}} = 1\ x\ 10^{-7}\ M$$

Operando se demuestra que $[H^+]$ y $[OH^-]$ en el agua son iguales y que sus concentraciones son de 1 × 10^{-7} M.

De acuerdo con este planteo, el pH del agua es 7, ya que sustituyendo la $[H^+]$ en la definición de pH se obtiene:

$$pH = -\log(1x10^{-14}) = 7$$

Y arbitrariamente se la define como neutra.

Los valores de concentración de H^+ y OH^- en la mayoría de las soluciones son muy pequeños y esto hace difícil compararlos. Por este motivo es conveniente expresarlos como pH y pOH; el pOH es:

$$pOH = -\log[OH^-] \qquad [3.8]$$

Si el pH de una solución acuosa es menor a 7, se dice que es ácida, lo que implica soluciones con $[H^+]$ mayores a 10^{-7} M. Mientras que si el pH es mayor a 7, se dice que la solución es básica o alcalina, con soluciones con $[H^+]$ menores a 10^{-7} M.

3.2. Ácidos, bases y soluciones amortiguadoras

La teoría acuñada por Brønsted y Lowry, también llamada protónica, nos indica que un ácido es aquella sustancia capaz de ceder protones, y una base es aquella capaz de aceptarlos. Los ácidos se clasifican según su fuerza. Se conocen como ácidos fuertes los que se disocian completamente para ceder su o sus protones H^+:

$$HA \rightarrow H^+ + A^- \qquad [3.9]$$

Los ácidos débiles sufren una disociación parcial en solución. El grado de disociación del ácido débil viene determinado por la constante de equilibrio de la reacción, que recibe el nombre de constante de acidez (K_a). Una solución de ácido débil presentará tres especies: el ácido débil (HA), su base conjugada (A^-) y el protón (H^+). La disociación parcial de los ácidos débiles se representa como:

$$HA \leftrightarrow H^+ + A^-$$

La constante de equilibrio (K_a) se define como:

$$K_a = \frac{[H^+].[A^-]}{[HA]} \qquad [3.10]$$

Se define pK_a como:

$$pK_a = -\log K_a \qquad [3.11]$$

Hay ácidos débiles que ceden más de un protón a la solución y la disociación de cada protón tiene un valor de pK_a correspondiente. Por ejemplo, el caso de los ácidos dipróticos:

$$H_2A \leftrightarrow H^+ + HA^- \qquad pK_{a1} \qquad [3.12]$$

$$HA^- \leftrightarrow H^+ + A^{2-} \qquad pK_{a2} \qquad [3.13]$$

Las bases son aquellas que aceptan un protón de la solución y se clasifican en fuertes o débiles. Las fuertes son las que, en solución, liberan un grupo hidroxilo (OH^-). El hidroxilo en solución toma un H^+ del medio y forma agua:

$$OH^- + H^+ \rightarrow H_2O \qquad [3.14]$$

Las bases débiles también toman H^+ del medio, pero la asociación, al igual que ocurre con los ácidos, es parcial.

$$H^+ + B^- \leftrightarrow BH \qquad [3.15]$$

Las soluciones amortiguadoras o *buffer* se componen de un ácido débil y su base conjugada. Estas soluciones tienen la capacidad de resistir los cambios de pH y solo amortiguan en el pH del entorno al $pK_a \pm 1$, ya que van a estar presentes los dos componentes (el ácido débil y su base conjugada).

En estas soluciones se puede utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pk_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad [3.16]$$

La condición de mayor capacidad amortiguadora se da a concentraciones iguales del ácido y su base conjugada. De acuerdo con la ecuación anterior, cuando:

$$[HA] = [A^-] \rightarrow pH = pk_a \qquad [3.17]$$

La capacidad amortiguadora también depende de la concentración del ácido débil y de su base conjugada. Cuanto más concentrada se encuentra la solución, más equivalentes de ácido o base resisten los cambios de pH frente a los agregados de ácidos o bases.

Los ácidos débiles con más de un protón para ceder a la solución tienen tantas zonas de amortiguación como protones disociables en el entorno de cada valor de $pK_a \pm 1$.

3.3. Determinación del pH

La medida del pH de una solución puede determinarse por diversos métodos basados en diferentes principios; los más usados en la práctica son los métodos colorimétricos y los métodos potenciométricos.

3.3.1. Métodos potenciométricos (con pHmetro)

La medida de pH requiere de dos electrodos, un electrodo de vidrio sensible a los iones H^+ y un electrodo de referencia calomel independiente del pH. Usualmente, para medir el pH de una solución se utiliza un electrodo combinado, formado por un electrodo de vidrio y uno de referencia en un mismo cuerpo físico. El potencial de membrana viene dado por la diferencia de potencial que se desarrolla entre ambos electrodos, este potencial es sensible a los cambios de concentración de H^+ de la solución problema de la cual queremos determinar el pH.

El equipo que se requiere para los métodos potenciométricos es sencillo y barato, e incluye un electrodo de referencia, un electrodo indicador (de vidrio) y un dispositivo para medir el potencial que incluye una pantalla. Inicialmente se debe calibrar el pHmetro con

soluciones estándares. El electrodo indicador conectado se sumerge en la solución que se va a medir (figura 3.1).

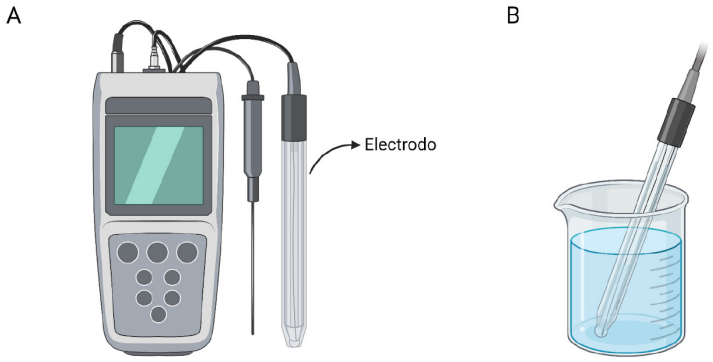


Figura 3.1. Representación de un pHmetro y su uso. A. Se representan las partes correspondientes a un pHmetro, su electrodo indicador y la pantalla donde se indica el valor de pH esperado. B. Electrodo de vidrio sumergido en la solución de la que se desea determinar el valor de pH.
(Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

3.3.1.1. Procedimiento experimental para el uso de pHmetro

Antes de usar el pHmetro es necesario chequear el nivel de KCl saturado (o la solución de referencia que corresponda) en el electrodo de vidrio. El pHmetro se debe calibrar con soluciones estándares. Las soluciones estándares más utilizadas son de pH 4, 7 y 10. Dependiendo del pHmetro se utilizan dos o tres soluciones estándares para su calibración. En caso de que el pHmetro solo permita la utilización de dos soluciones estándares, elegir la solución estándar con el valor de pH más próximo a la solución de interés. Los pHmetros que calibran con tres soluciones estándares cubren un amplio rango de valores de pH.

Cada vez que el electrodo se sumerge en una solución (incluidas las soluciones estándares) debe ser lavado previa y posteriormente con agua destilada, y secado con cuidado con papel absorbente. No hay que golpear el electrodo para secar. El electrodo de vidrio debe conservarse sumergido en solución estándar pH 7 para evitar que se seque.

3.3.2. Métodos colorimétricos (utilizando indicadores de pH)

Con estos métodos se obtiene una medida aproximada del pH de una solución que se basa en el uso de indicadores de pH. Un indicador de pH es un compuesto químico que, en solución, se disocia como un ácido débil, con la particularidad que sus formas ácido y base conjugada presentan colores diferentes (o una de ellas es incolora y la otra está coloreada).

El uso más común es el agregado de gotas de una solución de un indicador para observar la variación del pH durante una reacción química (por ejemplo, la valoración de un ácido o una base). La variación del pH se manifiesta por un viraje o cambio de color del indicador. En la tabla 3.1 se muestran diferentes indicadores con el color correspondiente según el pH en el que se encuentran y el intervalo de pH en el cual cambia de color.

Tabla 3.1. Indicadores de pH con su intervalo de viraje y los colores según su forma ácida o básica

Indicador	Color de la forma ácida	Color de la forma básica	Intervalo de viraje (pH inferior y superior)
Rojo Congo	Azul	Rojo	3,0-5,0
Azul de bromofenol	Amarillo	Azul violeta	3,0-4,6
Naranja de metilo	Rojo	Amarillo	3,2-4,4
Verde de bromocresol	Amarillo	Azul	3,8-5,4
Rojo de metilo	Rojo	Amarillo	4,8-6,0
Azul de bromotimol	Amarillo	Azul	6,0-7,6
Rojo fenol	Amarillo	Rojo	6,6-8,0
Rojo cresol	Amarillo	Rojo	7,0-8,8
Azul de timol	Amarillo	Azul	8,0-9,6
Fenolftaleína	Incoloro	Rosa fucsia	9,2-10,0
Amarillo de alizarina	Amarillo	Rojo	10,1-12,0

Es deseable preparar los indicadores a una concentración 0,05 % - 0,1 % en agua o en una solución alcohol (como etanol).

3.4. Titulación. Curva de titulación

La titulación es un método directo para la determinación de las constantes ácidas de un ácido débil y las zonas de amortiguación. Se debe disponer de un agente valorante —también llamado agente titulante—, que suelen ser bases fuertes, de concentración conocida, contenido en una bureta, y un vaso de bohemia o matraz con el ácido que se desea estudiar (figura 3.2). Al ácido en el matraz se le adicionan pequeñas cantidades de volumen conocido del agente valorante y, posteriormente, se mide el pH con el pHmetro.

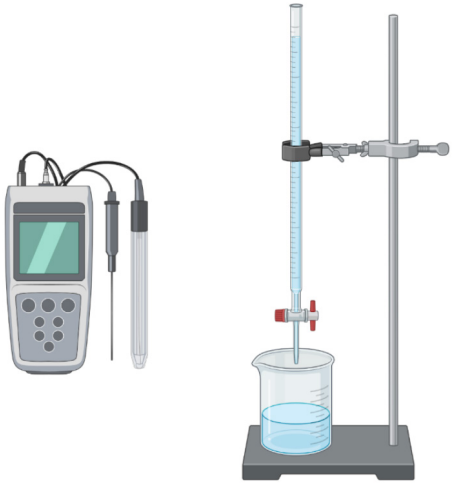


Figura 3.2. Esquema de un sistema experimental para la realización de una curva de titulación. El pHmetro digital, la bureta donde se coloca el agente titulante con su soporte y un vaso de bohemia donde se coloca la solución a valorar o titular. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

A partir de una titulación se puede obtener un gráfico denominado curva de titulación, en ella se grafica el pH en función de la cantidad de moles, de equivalentes o de volumen de OH^- o H^+ adicionados.

Las zonas amortiguadoras en la curva de titulación, donde se observa una resistencia al cambio de pH frente a la adición de la base fuerte, corresponden a regiones donde está presente una mezcla de ácido débil (HA) y su base conjugada (A^-). En la mitad de la zona amortiguadora se encuentra la misma concentración del ácido débil y su base conjugada, lo que indica que ese valor de pH corresponde al valor de pK_a para esa desprotonación. Un ácido débil tendrá las zonas de amortiguación y pK_a correspondientes según la cantidad de protones que pueden disociarse; por ejemplo, en la figura 3.3 se observa un ácido triprótico con sus tres zonas de amortiguación y se indican los tres valores de pK_a correspondientes.

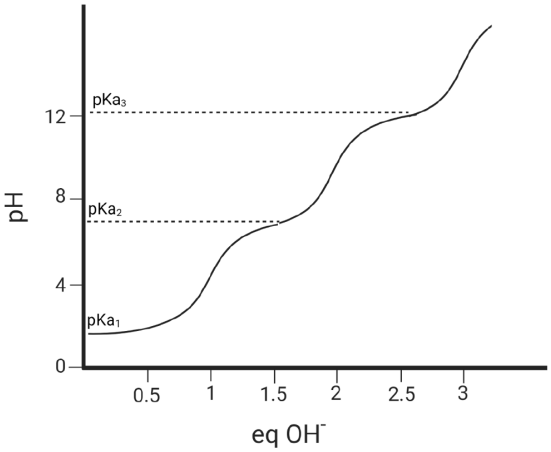


Figura 3.3. Curva de titulación de un ácido triprótico. El gráfico corresponde al pH en función de los equivalentes de OH^-, provenientes de la base fuerte (agente valorante), agregados a un ácido triprótico genérico. Al ser un ácido triprótico, se observan las tres zonas de amortiguación a la disociación de cada uno de los protones con sus valores de pK_a correspondientes.

3.5. Ejercicios de rutina de laboratorio

En esta sección se describen actividades experimentales para la adquisición de técnicas fundamentales de laboratorio, como la preparación de soluciones con un pH determinado o soluciones amortiguadoras. Se busca específicamente mostrar planteos cotidianos de un laboratorio para guiar a cada estudiante en la resolución de este tipo de preparaciones y en el razonamiento que hay detrás.

3.5.1. Preparación de soluciones

a) Preparación de una solución de ácido clorhídrico

Se desea preparar una solución de 200 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M a partir de una solución de HCl 11,6 M.

Resolución

Se debe realizar una dilución del ácido hasta obtener la concentración deseada utilizando la equivalencia para diluciones (ec. 2.5, sección 2.2):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Sustituyendo,

$$11{,}6 \cdot V_1 = 0{,}1\ M \cdot 200\ mL \rightarrow V_1 = 1{,}72\ mL$$

Experimentalmente, en primer lugar hay que colocar un volumen inferior a los 200 mL de agua destilada en un vaso de bohemia o matraz y después agregar 1,72 mL del ácido clorhídrico. Esta dilución se debe realizar en una campana de extracción de gases y es fundamental colocar primero el agua destilada y luego el ácido. Posteriormente, enrasar al volumen final con una probeta.

b) Preparación de una solución amortiguadora pH 7

Se desea preparar una solución amortiguadora pH 7, 0,05 M, 0,1 L. En el laboratorio se cuenta con la siguiente lista de reactivos:

Ácido cítrico: PM = 210,14 g/mol, $pK_a = 3{,}10$

Ácido acético: PM = 60,05 g/mol, $pK_a = 4{,}76$

Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4): PM = 120 g/mol, $pK_{a2} = 6{,}8$

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4): PM = 140,6 g/mol, $pK_{a2} = 12{,}2$

Resolución

Primero se debe seleccionar con qué reactivo se va a preparar la solución amortiguadora. El ácido cítrico y el ácido acético no amortiguan en el pH deseado. Hay que recordar que un ácido débil amortigua en la región del $pK_a \pm 1$, por lo que en este caso estos ácidos se descartan. Por lo tanto, la solución amortiguadora debe prepararse mezclando NaH_2PO_4 con su base conjugada (Na_2HPO_4), puesto que su pK_a corresponde a 6,8, por lo que amortigua en la región correspondiente. En este caso, Na_2HPO_4 está actuando como la base conjugada del ácido NaH_2PO_4.

$$H_2PO_4^- \leftrightarrow H^+ + HPO_4^{-2} \qquad pka_2 = 6{,}8$$

Utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ec. 3.16):

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

Del despeje surge la siguiente ecuación:

$$10^{(pH-pka)} . [HA] = [A^-]$$

Sabiendo que la concentración de la solución amortiguadora corresponde a la suma de los componentes (la concentración del ácido y su base conjugada),

$$[\text{ácido}] + [\text{base}] = [\text{solución amortiguadora}]$$

Que puede expresarse de la siguiente forma:

$$[\text{solución amortiguadora}] - [\text{ácido}] = [\text{base}]$$

Teniendo en cuenta las dos ecuaciones anteriores, se pueden igualar las ecuaciones:

$$10^{(pH-pKa)}.[\text{ácido}] = [\textit{solución amortiguadora}] - [\text{ácido}]$$

Despejando,

$$10^{(pH-pKa)}.[\text{ácido}] + [\text{ácido}] = [\textit{solución amortiguadora}]$$

En este ejercicio:
Paso 1. Se sustituye en la ecuación anterior:

$$10^{(7-6,8)}\,[H_2PO_4^-] + \;[H_2PO_4^-] = 0{,}05\ M$$

Paso 2. Se realiza la resta:

$$10^{(0,2)}\,[H_2PO_4^-] + \;[H_2PO_4^-] = 0{,}05\ M$$

Paso 3. Se resuelve la potencia:

$$1{,}58\,[H_2PO_4^-] + \;[H_2PO_4^-] = 0{,}05\ M$$

Paso 4. Se toma la concentración del ácido como factor común y se suman.

$$(1{,}58 + 1)\,[H_2PO_4^-] = 0{,}05\ M$$

$$(2{,}58)\,[H_2PO_4^-] = 0{,}05\ M$$

Paso 5. Finalmente, se despeja de la ecuación para determinar la concentración del ácido.

$$[H_2PO_4^-] = \frac{0{,}05}{2{,}58} = 0{,}019\ M$$

Paso 6. Para determinar la concentración de la base, se sustituye en la siguiente ecuación:

$$[Solución\ amortiguadora] + [H_2PO_4^-] = [HPO_4^{2-}]$$

$$[HPO_4^{2-}] = 0{,}05\ M - 0{,}019\ M = 0{,}031\ M$$

Luego de determinar la concentración de cada especie (ácido y base conjugada), se debe determinar la masa para luego pesar en la balanza, y colocar en un vaso de bohemia para preparar la solución. Conociendo el volumen de la solución a preparar (0,1 L) y la definición de molaridad, hay que realizar los siguientes cálculos para determinar la masa del ácido y la base.

Para determinar la masa del ácido, en este caso NaH_2PO_4:
NaH_2PO_4 → moles = 0,019 M × 0,1 L = 0,0019 moles
NaH_2PO_4 → masa = moles × PM = 0,0019 moles × 120 g/mol = 0,228 g

El mismo procedimiento se debe realizar para determinar la masa de la base (Na_2HPO_4):
Na_2HPO_4 → moles = 0,031 M × 0,1 L = 0,0031 moles
Na_2HPO_4 → masa = moles × PM = 0,0031 moles × 140,6 g/mol = 0,436 g

Es importante observar que tanto el ácido como la base conjugada se encuentran en forma de sal. Esto se debe a que tanto el ácido como la base se encuentran como sales cuando están en polvo, es decir, acompañados de su contra ion, que en este caso es el sodio. Esto es común para varios ácidos y bases, y se debe tomar en cuenta su peso al momento de determinar el peso molecular.

Por lo tanto, para preparar la solución amortiguadora hay que pesar las cantidades anteriormente calculadas de cada sal y colocarlas en un vaso de bohemia. Agregar un volumen de agua destilada inferior a los 100 mL finales, mezclar la solución y verificar el pH con un pHmetro. Luego de asegurar que se preparó la solución al pH deseado, enrasar con una probeta el volumen final deseado. En caso de que el pH no sea el que se busca, se debe ajustar con gotas de ácido o base fuerte más concentrado hasta alcanzar el pH correcto.

3.6. Actividades experimentales

En esta sección se presentan actividades experimentales procedimentales para que cada estudiante aprenda procedimientos básicos de laboratorio, como la realización de soluciones amortiguadoras. La segunda actividad experimental tiene como objetivo la adquisición de una destreza específica, la titulación y el entrenamiento en el uso de la bureta y el pHmetro.

3.6.1. Soluciones amortiguadoras

Objetivo

Preparar una solución amortiguadora y determinar su capacidad amortiguadora.

Introducción

Las soluciones amortiguadoras son fundamentales en los procesos biológicos ya que permiten mantener el pH del medio donde ocurren. Una solución amortiguadora amortigua únicamente en el entorno de su valor de $pK_a \pm 1$. La capacidad amortiguadora se define como la cantidad de ácido o base que puede amortiguar esa solución y depende específicamente de la concentración de esa solución. Cuanto mayor es la concentración de la solución mayor es su capacidad amortiguadora.

Procedimiento experimental

1. Preparación de soluciones

a) Preparar 50 mL de una solución amortiguadora de fosfato de potasio 120 mM, pH 7,4.

b) Preparar, por dilución a partir de la primera solución preparada en (a), 50mL de una solución amortiguadora 12 mM, pH 7,4.

2. Titulación de la solución amortiguadora

a) Calibrar el pHmetro.

b) Colocar en un vaso de bohemia 20 mL de la solución amortiguadora fosfato de potasio 120 mM pH 7,4.

c) Colocar HCl 0,2M en la bureta hasta completarla.

d) Medir el pH inicial de la solución amortiguadora.

e) Proceder al agregado de HCl 0,2 N de a 0,5 mL desde la bureta al vaso de bohemia. Medir el pH luego de cada agregado y completar la tabla de resultados (tabla 3.2).

f) Repetir el procedimiento con la solución amortiguadora 12 mM.

g) Registrar los valores de pH en función del volumen agregado.

Informe de actividades

Completar la tabla 3.2 con los resultados obtenidos de la titulación de las soluciones amortiguadoras.

Tabla 3.2

Volumen de HCl 0,2 N agregado (mL)	pH Solución 120 mM	pH Solución 12 mM
0		
0,5		
1,0		
1,5		
2,0		
2,5		
3,0		
3,5		
4,0		
4,5		

La tabla muestra como ejemplo hasta un volumen agregado de 4,5 mL de HCl 0,2 N. Sin embargo, se deberá agregar y registrar el volumen necesario hasta alcanzar valores de pH mayores a 2.

Análisis de resultados

a) Graficar el pH en función de equivalentes de ácido agregado.

b) Determinar la zona de amortiguación de la solución amortiguadora y determinar la capacidad amortiguadora.

3.6.2. Titulación de un aminoácido

Objetivo

Realizar la titulación del aminoácido glutamina.

Introducción

En el área de la bioquímica, es fundamental conocer las propiedades químicas de un aminoácido. Los aminoácidos tienen un carbono α que tiene unido un grupo funcional amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno y un grupo lateral (o grupo R) diferente para los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza. Aquellos aminoácidos que poseen grupos R con propiedades ácido-base son clave para la conformación y estructura de una proteína. Un aminoácido que tenga grupo R con grupos funcionales ácidos o básicos puede formar interacciones electrostáticas con otros aminoácidos. Realizar una titulación y obtener la curva de titulación correspondiente permite determinar si el aminoácido titulado posee grupo R con esas propiedades. También permite determinar el valor de pK_a para cada grupo ionizable.

Procedimiento experimental

a) Calibrar el pHmetro.
b) Colocar en un vaso de bohemia 20 mL de una solución de glutamina 0,1 M.
c) Medir el pH de la solución.
d)Agregar una cantidad suficiente de ácido clorhídrico concentrado (HCl 6 M aproximadamente) hasta alcanzar un pH cercano a 2. Ir agregando HCl gota a gota evitando agregar un exceso de ácido.
e) Colocar NaOH 0,2 M en la bureta hasta completarla.
f) Proceder al agregado de NaOH de a 0,5 mL desde la bureta al vaso de bohemia. Medir el pH luego de cada agregado.
g) Registrar los valores de pH en función del volumen agregado en la tabla de resultados (tabla 3.3).
h) Realizar el análisis correspondiente.

Informe de actividades

Completar los resultados obtenidos de la titulación de la glutamina en la tabla 3.3.

Tabla 3.3

Volumen de NaOH 0,2 M agregado (mL)	pH
0	
0,5	
1,0	
1,5	
2,0	
2,5	
3,0	
3,5	
4,0	
4,5	

La tabla muestra como ejemplo hasta un volumen agregado de 4,5mL de NaOH 0,2 M. Sin embargo, se deberá agregar y registrar el volumen necesario hasta alcanzar valores de pH mayores a 10.

Análisis de resultados

a) Graficar el pH en función de equivalentes de base agregada.
b) Determinar las zonas de amortiguación y los valores de pK_a del aminoácido.

Bibliografía

Harris, D. C. (2003). Equilibrio de ácidos y bases monopróticos. En *Análisis químico cuantitativo* (2.ª ed., pp. 198-201). Reverté.

Harris, D. C. (2003). Equilibrio de ácidos y bases polipróticos. En *Análisis químico cuantitativo* (2.ª ed., pp. 203-222). Reverté.

Harris, D. C. (2003). Equilibrio químico. En *Análisis químico cuantitativo* (2.ª ed., pp. 99-127). Reverté.

Kolthoff, I. M. (1937). *Acid-base indicators* (C. Rosenblum, trad.). Macmillan.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2019). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En *Principios de bioquímica* (5.ª ed., pp. 75-115). Omega.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2019). El agua. En *Principios de bioquímica* (5.ª ed., pp. 47-74). Omega.

Voet, D., y Voet, J. G. (2010). Amino Acids. En *Biochemistry* (4.ª ed., pp. 67-81). John Wiley & Sons.

CAPÍTULO 4

Espectrofotometría

4.1. Introducción

La luz puede reflejarse, transmitirse, dispersarse o absorberse en las moléculas, y la espectrofotometría es una técnica que se ocupa de medir la interacción de la luz con las moléculas.

4.1.1. La luz

La luz se compone por un conjunto de ondas electromagnéticas que se agrupan en regiones con características particulares definidas por su longitud de onda (λ)y su frecuencia. Al aumentar la frecuencia y disminuir la longitud de onda, mayor es la energía de la radiación. Los diferentes tipos de radiación abarcan un intervalo específico de longitudes de onda (y frecuencias). Las ondas largas de radio se transmiten mediante grandes antenas, como las que se utilizan en telecomunicación. La luz visible abarca longitudes de onda que van desde los 400 nm (violeta) hasta 700 nm (rojo) y se deben al movimiento de los electrones en los átomos y moléculas. Las ondas más cortas descritas se asocian a los rayos gamma que se forman durante los cambios ocurridos dentro del núcleo del átomo.

El color que se observa en un objeto proviene de la reflexión de las ondas electromagnéticas de la luz que no son absorbidas por el objeto. Si un objeto no absorbe radiación del espectro visible y refleja toda la luz, se ve blanco o incluso transparente. Por lo tanto, una molécula o materia puede absorber selectivamente parte de la luz que incide sobre ella dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, y esto es el principio fundamental de la espectrofotometría.

4.1.2. Espectrofotómetro

En su forma más simple, un espectrofotómetro contiene tres partes: una fuente de luz, un portamuestras y un detector. La fuente suele contener algún tipo de filtro para que la radiación óptica sea monocromática (a una longitud de onda) y abarque un rango de interés. En la figura 4.1 se esquematiza lo que ocurre dentro de un espectrofotómetro.

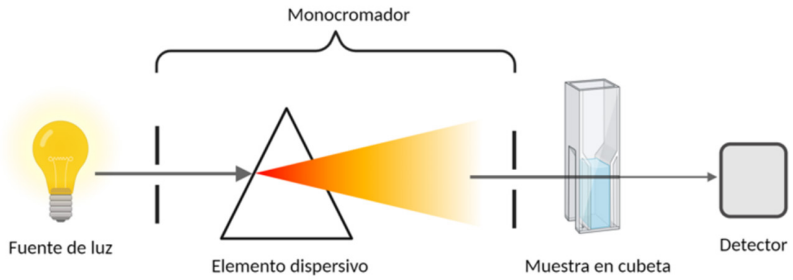


Figura 4.1. Esquema de espectrofotómetro con la entrada de la luz, el elemento de dispersión y el filtro monocromador, el portacubetas donde se ubica la muestra que es incidida por esa longitud de onda y el detector. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

4.1.3. Absorbancia

En la figura 4.1 se puede observar que cuando un haz incide sobre la muestra, la intensidad del haz incidente es siempre mayor a la intensidad del haz emergente, que es lo que registra el detector. Esa diferencia se debe a lo que absorben específicamente las moléculas en la muestra. Existen fenómenos independientes de la absorción de la muestra que hacen perder la potencia de la intensidad del haz, como la dispersión y reflexión de la luz. Para determinar el valor de este efecto independiente de la muestra problema y poder restarlo de la muestra de interés, es necesario realizar una muestra *blanco*. El blanco corresponde a todos los componentes de la muestra problema sin incluir el analito de interés que se va a medir. Por ejemplo, si se desea medir la absorbancia de una proteína en una solución amortiguadora, el blanco se corresponde con la solución amortiguadora en la que se encuentra la proteína. Los espectrofotómetros permiten setear ese valor de blanco (esa intensidad independiente de la muestra) y resta de forma automática lo que absorbe el blanco de las muestras problema.

La transmitancia (T) para un compuesto en solución es la proporción de luz incidente que es transmitida, definida de la siguiente manera:

$$T = \frac{I_e}{I_0} \qquad [4.1]$$

La T se expresa generalmente como porcentaje (varía entre 0 y 100) y es importante ya que solo la luz transmitida puede ser medida en el equipo. La luz absorbida (Abs) puede deducirse a partir de la transmitancia según la siguiente ecuación:

$$Abs = -log\ T \qquad [4.2]$$

4.1.4. Espectro de absorción

Para determinar si la molécula absorbe luz y específicamente en qué longitudes de onda, se hace incidir radiaciones de diferente longitud de onda utilizando un espectrofotómetro. El gráfico de absorbancia en función de longitud de onda que se construye corresponde con el espectro de absorción. La figura 4.2 muestra dos ejemplos de espectro de absorción de aminoácidos aromáticos, en línea negra el triptófano y en línea roja la tirosina.

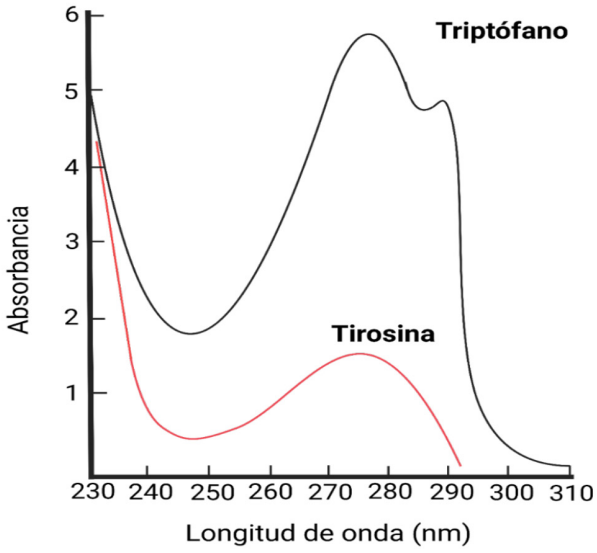


Figura 4.2. Absorbancia de la luz ultravioleta por los aminoácidos aromáticos. Comparación de los espectros de absorción de luz de los aminoácidos aromáticos triptófano (línea negra) y la tirosina (línea roja) a pH 6,0. Los aminoácidos se encuentran en cantidades equimolares en idénticas condiciones. La absorción de la luz por el triptófano es cuatro veces mayor que la de la tirosina a 280 nm. (Adaptada de A. L. Lehninger, D. L. Nelson y M. M. Cox (2014), *Principios de bioquímica,* p. 80.)

Conocer los espectros de absorción es fundamental en las diferentes áreas del conocimiento porque estos son característicos de las moléculas o de grupos funcionales dentro de las moléculas, y eso permite identificarlas en una muestra.

Más adelante se profundizará en la importancia de la espectrofotometría para determinar la concentración de una muestra y en cómo los espectros de absorción son imprescindibles para seleccionar la longitud de onda que se va a utilizar.

4.1.5. Ley de Lambert y Beer

La cantidad de luz absorbida por una molécula en una solución a una determinada longitud de onda (λ) se puede relacionar cuantitativamente con la concentración de dicha molécula en la solución.

Cuanto mayor sea la concentración de la molécula o de la muestra en la solución (C), mayor será la absorción de luz (Abs). Asimismo, cuanto mayor sea la distancia de muestra a recorrer por el haz de luz, denominada paso óptico (L), mayor será la luz absorbida. La ley de Lambert y Beer establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la molécula o muestra en la solución y a la longitud de la cubeta, lo que se define matemáticamente como:

$$Abs = \varepsilon . L . C \qquad [4.3]$$

Donde ε es una constante denominada coeficiente de absortividad o coeficiente de extinción molar. Este parámetro depende de la longitud de onda, de la naturaleza del soluto, del solvente y del pH para sustancias ionizables.

Si se conoce el coeficiente de extinción molar, se puede determinar la concentración de una molécula o de una muestra en una solución. La longitud de la cubeta es un valor conocido, en los laboratorios de enseñanza se suelen utilizar cubetas de 1 cm.

Como la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, un gráfico de absorbancia en función de la concentración de una muestra es lineal. Sin embargo, esta ley tiene limitaciones, a concentraciones altas las distancias entre iones o moléculas de especies absorbentes disminuyen hasta el punto en que afectan la distribución de cargas de partículas vecinas, alterando su capacidad de absorción, lo que subestima la concentración de la muestra. Un fenómeno similar ocurre en soluciones demasiado diluidas. Además, se suman las limitaciones de los equipos (espectrofotómetros) en los que la ley de Lambert y Beer pierde proporcionalidad cuando se obtienen valores superiores a la unidad de absorbancia.

4.1.6. Determinación de la concentración de una muestra. Consejos experimentales

Los pasos para determinar la concentración de una muestra utilizando la espectrofotometría son los siguientes:

1) *Seleccionar la longitud de onda a la cual se va a medir*. Para elegir la longitud de onda, es necesario contar con el espectro de absorción y seleccionar la longitud de onda del pico máximo de absorción. Seleccionar esa longitud permite una mayor sensibilidad para discriminar entre dos concentraciones diferentes. Además, se debe contar con otros criterios de selección, por ejemplo, evitar longitudes de onda donde absorben contaminantes presentes en la muestra. En caso de que la muestra no absorba dentro del rango de longitudes de onda del equipo, se pueden utilizar métodos colorimétricos, que se explican más adelante.
2) *Conocer el coeficiente de extinción molar*. Los coeficientes de extinción molar son propios de las moléculas y de una longitud de onda determinada y varios están reportados en la literatura. Si se desconoce el valor, se puede determinar a partir de concentraciones conocidas de la muestra, realizando una curva de calibración (véase la sección 4.1.7).
3) *Determinación de la absorbancia de la muestra*. En primer lugar, setear el equipo con la longitud de onda a la cual se desea medir, realizar el blanco (en la cubeta colocar todos los componentes menos la muestra a analizar) y luego medir la absorbancia de la muestra.
4) *Aplicar la ley de Lambert y Beer*. Luego de haber determinado el coeficiente de extinción molar y de haber medido la absorbancia, se despeja la concentración de la muestra a partir de la ley de Lambert y Beer (ec. 4.3) de la siguiente forma:

$$C = Abs / (\varepsilon . L)$$

4.1.7. Métodos indirectos. Métodos colorimétricos

Cuando no es posible medir la absorbancia directa de la muestra problema, ya sea porque la solución es una mezcla de solutos absorbentes no bien definidos o porque la molécula carece de picos de absorción dentro del rango de longitud de onda del equipo,

se debe recurrir a los métodos indirectos. En estos, el soluto que se va a medir debe reaccionar o interaccionar con un reactivo de modo tal que se observe un cambio de color en el reactivo que pueda ser detectado por el espectrofotómetro. La reacción debe ser lo más selectiva posible con la muestra de interés para discriminar entre el soluto problema y los demás compuestos disueltos.

Algunos ejemplos de métodos indirectos son los que se utilizan para cuantificar proteínas (método de Biuret, método de Bradford y método del ácido bicinconínico [BCA]) o glúcidos reductores (la interacción con el reactivo 3,5-dinitrosalicílico [DNS]), o para seguir una reacción en la que no se puede cuantificar de forma directa la aparición de los productos o la desaparición de los sustratos, por ejemplo, un aceptor de electrones artificial, el diclorofenol indofenol (DCPIP), un compuesto que absorbe luz a 600 nm y cuya absorbancia decrece al reducirse y permite seguir una reacción de óxido-reducción.

Para poder aplicar cualquiera de los métodos indirectos, se debe realizar una curva de calibración o tener el epsilón (ϵ) correspondiente. La curva de calibración es un gráfico de absorbancia en función de la concentración cuya pendiente se corresponde con el coeficiente de extinción molar. Para construirlo hay que preparar soluciones patrón de concentraciones conocidas, realizar la mezcla con el reactivo y determinar el valor de absorbancia para cada una. Posteriormente, se realiza el gráfico de absorbancia en función de la concentración patrón utilizada y se determina la ecuación de la recta para poder obtener el coeficiente de extinción molar a partir de la pendiente.

La muestra debe ser tratada de igual forma a las soluciones patrón. A partir de la absorbancia medida en el espectrofotómetro, se despeja el valor de la concentración utilizando la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración. En la sección 4.2.2 se muestran algunos ejemplos de métodos colorimétricos para la cuantificación de proteínas y glúcidos reductores.

4.2. Cuantificación de proteínas

Las proteínas son polímeros constituidos por aminoácidos, que son sus monómeros. Los seres humanos contamos con más de diez mil tipos diferentes de proteínas, cada una de ellas con una estructura tridimensional propia que le confiere una función específica. Las proteínas son macromoléculas biológicas fundamentales a nivel celular y participan de la estructura, en mecanismos de señalización y acelerando reacciones a ese nivel.

La determinación de la concentración de proteínas en una muestra es una técnica de rutina básica en el laboratorio. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, muchos de ellos se basan en:

a) La propiedad intrínseca de la proteína: absorción de aminoácidos aromáticos o presencia de grupos prostéticos.
b) La utilización de métodos colorimétricos.

4.2.1. Cuantificación de proteínas utilizando propiedades intrínsecas

Los aminoácidos con grupos aromáticos como el triptófano, la tirosina y, en menor grado, la fenilalanina absorben luz en el ultravioleta, como se observa en la figura 4.2.

Para la cuantificación de proteínas por este método, se mide en el espectrofotómetro a 280 nm ya que a esta longitud de onda se encuentra el pico máximo característico. La ventaja de usar el pico máximo es que permite determinar la mayor diferencia entre la muestra con y sin proteína, y da así un mayor rango de respuesta.

Para determinar el coeficiente de extinción molar (ε), se debe realizar una curva de calibración con concentraciones conocidas de la proteína de interés a la longitud de onda previamente determinada.

También se puede cuantificar una proteína si contiene un grupo prostético que absorbe en el rango visible. Un ejemplo característico es el grupo hemo que absorbe en el entorno de los 400 nm, en una banda conocida como Soret. Proteínas como la hemoglobina y los citocromos contienen grupo hemo, por lo que sus espectros de absorción incluyen la banda de Soret.

4.2.2. Cuantificación de proteínas utilizando métodos indirectos (colorimétricos)

4.2.2.1. Biuret

El reactivo de Biuret es una solución alcalina de sulfato cúprico. El ion cúprico (Cu^{2+}) en medio alcalino reacciona con todos aquellos compuestos que poseen en su molécula por lo menos dos grupos amida. Las proteínas poseen un grupo amida por cada enlace peptídico, que al reaccionar con el ion cúprico dan un compuesto coloreado púrpura. La reacción de formación del complejo proteína Cu^{2+} sigue la ley de Lambert y Beer. El rango de sensibilidad es bajo (entre 2 y 20 mg/mL), por lo que se puede utilizar este método para soluciones con concentraciones altas de proteínas, por ejemplo, para cuantificar proteínas del suero.

Procedimiento experimental

El reactivo de Biuret se prepara disolviendo 1,5 g de $CuSO_4.5H_2O$ y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada. Posteriormente, se agregan 300 mL de NaOH 10 % (m/v) y se lleva a un volumen final de 1 L. Se almacena en contenedor de plástico oscuro.

Se debe realizar una curva de calibración con concentraciones conocidas de la proteína que se va a estudiar en el rango de 2 a 20 mg/mL. En caso de que se trate de una mezcla de proteínas o no se cuente con la proteína de estudio de manera aislada, se puede utilizar la albúmina bovina como proteína patrón. En la tabla 4.1 se muestra un ejemplo de cómo diseñar una curva de calibración, utilizando la albúmina bovina como proteína patrón o estándar.

Tabla 4.1. Ejemplo de curva de calibración para la que se utiliza una concentración stock de 20 mg/mL de albúmina bovina y un volumen final de cada tubo de 2 mL

Tubo	Concentración final de albúmina bovina (mg/mL)	Volumen de albúmina bovina concentración 20 mg/mL (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
Blanco	0	0	2
1	2	0,2	1,8
2	4	0,4	1,6
3	6	0,6	1,4
4	8	0,8	1,2
5	10	1,0	1,0
6	12	1,2	0,8
7	14	1,4	0,6
8	16	1,6	0,4
9	20	2	0

Luego de preparar 2 mL de cada solución patrón de la curva de calibración (tubos blanco y del 1 al 9), se debe agregar 2 mL del reactivo de Biuret a cada uno de los tubos. Para lograr disminuir el error asociado con la preparación y medida de cada muestra, es necesario preparar cada solución patrón por duplicado o, incluso, por triplicado.

Para poder cuantificar la concentración de proteínas de la muestra de interés, esta se debe tratar de la misma forma que se prepararon las soluciones patrón de la curva de calibración, por lo cual a 2 mL de la muestra de interés se le debe agregar 2 mL de reactivo de Biuret. Nuevamente, se aconseja realizar al menos un duplicado de la muestra para amortiguar el error asociado con la preparación y medida de las muestras en el espectrofotómetro.

Los tubos de la curva de calibración y los correspondientes a las muestras de interés se colocan en un baño termostatizado a 37 ˚C por 15 minutos. Posteriormente, se determina el valor de absorbancia a 540 nm para cada tubo.

La tabla 4.2 es un ejemplo de tabla para el registro de los datos en el cuaderno de laboratorio.

Tabla 4.2. Registro de datos para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras de interés por el método colorimétrico de Biuret

Tubo	**Concentración final de albúmina bovina (mg/mL)**	**Absorbancia 540 nm**	**Absorbancia 540 nm**
1	2		
2	4		
3	6		
4	8		
5	10		
6	12		
7	14		
8	16		
9	20		
Tubo	Absorbancia 540 nm	Absorbancia 540 nm	Promedio absorbancia
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			

En este caso se dejaron dos columnas para una misma concentración con el fin de registrar el valor de absorbancia por duplicado; si se realizan tres tubos, se deberá incluir una tercera columna. En el ejemplo hay tres muestras; si se realizan más, o diluciones de estas, se deberá agregar la cantidad necesaria de filas.

Con los valores de absorbancia medidos para las soluciones patrón se elabora la curva de calibración para poder determinar la ecuación de la recta. La curva de calibración se realiza con todos los puntos y se debe obtener la mejor recta. A partir de esta ecuación de la recta y utilizando el promedio de absorbancia de cada muestra, se puede despejar la concentración de proteínas de cada una de las muestras de interés.

4.2.2.2. Bradford

En esta técnica se utiliza un colorante hidrofóbico (Coomassie Blue G-250) cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido tienen un color pardo, y que al encontrarse en ambientes hidrofóbicos en el interior de las proteínas adquiere un color azul intenso que es fácilmente medible. Es un método más sensible que el Biuret, el rango de sensibilidad se encuentra entre 0,1 y 2,0 mg/mL.

Procedimiento experimental

El reactivo de Bradford se prepara agitando vigorosamente 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 mL de etanol 95%. Se mezcla con 100 mL de ácido fosfórico 85%, se diluye con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1L y finalmente se filtra. El reactivo es estable por 2 semanas si se mantiene a temperatura ambiente.

Es necesario realizar una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de albúmina bovina dentro del rango de sensibilidad. En la tabla 4.3 se muestra un ejemplo de cómo diseñar una curva de calibración utilizando la albúmina bovina como proteína patrón o estándar.

Tabla 4.3. Ejemplo de curva de calibración para la que se utiliza una concentración stock de 2,0 mg/mL de albúmina bovina y volumen final de cada tubo de 100 µL

Tubo	Concentración final de albúmina bovina (mg/mL)	Volumen de albúmina bovina concentración 2,0 mg/mL (µL)	Volumen de agua destilada (µL)
Blanco	0	0	100
1	0,2	10	90
2	0,4	20	80
3	0,6	30	70
4	0,8	40	60
5	1,0	50	50
6	1,2	60	40
7	1,4	70	30
8	1,6	80	20
9	2,0	100	0

Luego de preparar los tubos de cada solución de la curva de calibración (tubos blanco y del 1 al 9), se debe agregar 1 mL de reactivo de Bradford a cada uno de los tubos. Para lograr disminuir el error asociado con la preparación y medida de cada muestra, es necesario preparar cada tubo de la curva de calibración por duplicado o, incluso, por triplicado.

Para poder cuantificar la concentración de proteínas de la muestra de interés, esta se debe tratar de la misma forma que se prepararon las soluciones patrón de la curva de calibración, por lo cual a 100 µL de la muestra de interés se le debe agregar 1 mL de reactivo de Bradford. Nuevamente, se aconseja realizar al menos un duplicado de la muestra para amortiguar el error asociado con la preparación y medida de las muestras en el espectrofotómetro.

Los tubos de la curva de calibración y los correspondientes a las muestras de interés se dejan a temperatura ambiente por al menos 2 minutos. Posteriormente, se determina el valor de absorbancia a 595 nm para cada tubo.

La tabla 4.4 es un ejemplo de tabla para el registro de los datos en el cuaderno de laboratorio.

Tabla 4.4. Registro de datos para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras de interés por el método colorimétrico de Bradford

Tubo	Concentración final de albúmina bovina (mg/mL)	Absorbancia 595 nm	Absorbancia 595 nm
Blanco	0		
1	0,2		
2	0,4		
3	0,6		
4	0,8		
5	1,0		
6	1,2		
7	1,4		
8	1,6		
9	2		
Tubo	Absorbancia 595 nm	Absorbancia 595 nm	Promedio absorbancia
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			

En este caso se dejaron dos columnas para una misma concentración con el fin de registrar el valor de absorbancia por duplicado; si se realizan tres tubos, se deberá incluir una tercera columna. En el ejemplo hay tres muestras; si se realizan más, o diluciones de estas, se deberá agregar la cantidad necesaria de filas.

Con los valores de absorbancia medidos para las soluciones patrón se elabora la curva de calibración para poder determinar la ecuación de la recta. La curva de calibración se realiza con todos los puntos y se debe obtener la mejor recta. A partir de esta ecuación de la recta y utilizando el promedio de absorbancia de cada muestra, se puede despejar la concentración de proteínas de cada una de las muestras de interés, como se describió antes.

4.3. Cuantificación de glúcidos reductores

4.3.1. Cuantificación de glúcidos reductores utilizando la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico

Los glúcidos son las biomoléculas más abundantes de la tierra. Ciertos glúcidos, como la sacarosa y el almidón, son fundamentales en la dieta humana ya que a partir de su

oxidación se obtiene energía. Los glúcidos son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, o bien sustancias que dan lugar a estos compuestos después de su hidrólisis.

Los glúcidos se clasifican según la complejidad estructural, los más simples son los monosacáridos, les siguen los oligosacáridos y los más complejos son los polisacáridos. Los glúcidos pueden ser reductores si poseen el carbono anomérico libre, es decir, el carbono que contiene el grupo carbonilo. Todos los monosacáridos son glúcidos reductores, pero algunos disacáridos pueden no serlo. Los polisacáridos tienen extremos reductores y no reductores.

Los glúcidos reductores pueden cuantificarse utilizando un método colorimétrico que implica la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en calor (figura 4.3). Esto produce un viraje de color que pasa del amarillo al anaranjado, correspondiente al producto reducido, que es el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Se puede determinar la concentración de glúcidos midiendo la absorbancia a 570 nm, sabiendo que la relación glúcido:ácido 3-amino-5-nitrosalicílico en la reacción es 1:1.

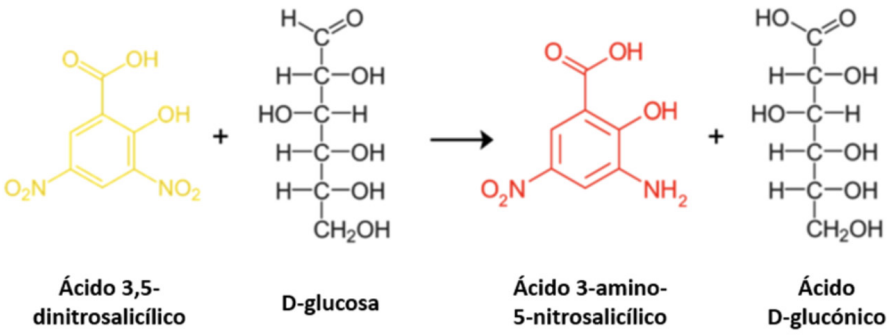


Figura 4.3. Reducción del DNS (color amarillo) por la glucosa (glúcido reductor). El producto reducido, el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico es anaranjado y absorbe en el entorno de los 570nm.

Debido a que la reacción química que genera el color es dependiente de múltiples factores, incluida la temperatura, el coeficiente de extinción molar varía con cada experimento. Por lo tanto, cuando se utilizan métodos colorimétricos, es necesario realizar una curva de calibración con concentraciones conocidas del glúcido a cuantificar.

Para preparar 1 litro del reactivo DNS se disuelven 4 gramos del ácido DNS y 150 gramos de tartrato de sodio y potasio en 200 mL de hidróxido de sodio 2 M; esto se prepara en calor y agitación. Posteriormente, se agrega agua destilada en cantidad suficiente para completar un litro.

Procedimiento experimental

Primero se debe realizar una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas del glúcido reductor. El rango de sensibilidad del método es de 2 a 20 mM para la glucosa, por lo que hay que seleccionar concentraciones que se encuentren dentro de ese rango.

La tabla 4.5 es un ejemplo de cómo diseñar una curva de calibración con el glúcido glucosa como estándar.

Tabla 4.5. Ejemplo de curva de calibración para la que se utiliza una concentración stock de 20 mM de glucosa y un volumen final de cada tubo de 100 µL

Tubo	Concentración final de glucosa (mM)	Volumen de glucosa (µL)	Volumen de agua destilada (µL)
Blanco	0	0	100
1	2	10	90
2	4	20	80
3	6	30	70
4	8	40	60
5	10	50	40
6	12	60	30
7	14	70	20
8	16	80	10
9	20	100	0

Luego de preparar 100 µL de cada solución patrón de la curva de calibración (tubos blanco y del 1 al 9), se debe agregar 900 µL de DNS a cada uno de los tubos. Para lograr disminuir el error asociado con la preparación y medida de cada muestra, es necesario preparar cada solución patrón por duplicado o, incluso, por triplicado.

Para poder cuantificar la concentración de glucosa (o glúcido reductor) de la muestra de interés, esta se debe tratar de la misma forma que se prepararon las soluciones patrón de la curva de calibración, por lo cual a 100 µL de muestra de interés se le debe agregar 900 µL del reactivo DNS. Nuevamente, se aconseja realizar al menos un duplicado de la muestra para amortiguar el error asociado con la preparación y medida de las muestras en el espectrofotómetro.

Los tubos de la curva de calibración y los correspondientes a las muestras de interés se incuban a 100˚C por 5 minutos. Posteriormente, se determina el valor de absorbancia a 570 nm para cada tubo.

La tabla 4.6 es un ejemplo de tabla para el registro de los datos en el cuaderno de laboratorio.

Tabla 4.6. Registro de datos para la determinación de la concentración de glucosa (o glúcido reductor) en las muestras de interés por el método colorimétrico del DNS. Los tubos del 1 al 9 corresponden a los de la curva de calibración.

Tubo	**Concentración final de glucosa (mM)**	**Absorbancia 570 nm**	**Absorbancia 570 nm**
Blanco	0		
1	2		
2	4		
3	6		
4	8		
5	10		
6	12		
7	14		
8	16		
9	20		
Tubo	Absorbancia 570 nm	Absorbancia 570 nm	Promedio Absorbancia
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			

En este caso se dejaron dos columnas para una misma concentración con el fin de registrar el valor de absorbancia por duplicado; si se realizan tres tubos, se deberá incluir una tercera columna. En el ejemplo hay tres muestras; si se realizan más, o diluciones de estas, se deberá agregar la cantidad necesaria de filas.

Con los valores de absorbancia medidos para las soluciones patrón se elabora la curva de calibración para poder determinar la ecuación de la recta. La curva de calibración se realiza con todos los puntos y se debe obtener la mejor recta. A partir de esta ecuación de la recta y utilizando el promedio de absorbancia de cada muestra, se puede despejar la concentración de glucosa (o glúcido reductor) de cada una de las muestras de interés.

4.4. Cuantificación de α-cetoácidos

4.4.1. Cuantificación de α-cetoácidos utilizando la reacción con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina

Los compuestos α-cetoácidos se pueden detectar con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Debido al grupo carbonilo, estos compuestos pueden reaccionar con el DNPH

en medios acuosos ligeramente ácidos, lo que da como producto la fenilhidrazona del α-cetoácido correspondiente. La reacción que permite la formación de fenilhidrazonas se da por una adición nucleofílica catalizada por el ácido, en la que ocurren una protonación del grupo carbonilo y una adición del agente nucleofílico al carbono, lo que da como producto un alcohol.

Al ser tratadas con NaOH, estas dinitrofenilhidrazonas desarrollan un color rojo que posee un máximo de absorbancia a 505 nm en forma proporcional a la cantidad de α-cetoácidos. Esta técnica es utilizada para la detección de cetoácidos en orina y también para seguir la cinética enzimática de enzimas que tienen como producto cetoácidos.

Procedimiento experimental

Preparación de reactivos

Para preparar el reactivo DNPH se debe pesar una cantidad suficiente para 2 mM y disolver lentamente con ácido clorhídrico 1 M. Conservar el reactivo en frasco color ámbar a 4 °C. Al prepararse en medio ácido, el DNPH sirve para detener la reacción al desnaturalizar la enzima. Adicionalmente, preparar hidróxido de sodio (NaOH) 0,4 M y solución amortiguadora fosfato 0,1 M pH 7,4. Se debe preparar un concentrado del α-cetoácido patrón para la realización de la curva de calibración en solución amortiguadora fosfato 0,1 M pH 7,4.

Se debe preparar una curva de calibración con el α-cetoácido a cuantificar. Un ejemplo de α-cetoácido es el piruvato, cuyo rango de linealidad es de 0,1 a 2 mM (tabla 4.7). Para lograr disminuir el error asociado con la preparación y la medida de cada muestra, es necesario preparar cada tubo de la curva de calibración por duplicado o, incluso, por triplicado.

Tabla 4.7. Ejemplo de curva de calibración para la que se utiliza una concentración stock de 2 mM de piruvato y un volumen final de cada tubo de 500 µL

Tubo	Concentración final de piruvato (mM)	Volumen de piruvato 2 mM (µL)	Volumen de solución amortiguadora fosfato 0,1 M pH 7,4 (µL)
Blanco	0	0	500
1	0,1	25	475
2	0,3	75	425
3	0,6	150	350
4	0,8	200	300
5	1,0	250	250
6	1,2	300	200
7	1,4	350	150
8	1,6	400	100
9	2,0	500	0

Protocolo para la detección de α-cetoácidos

1) Preparar suficiente cantidad de tubos de vidrio con capacidad mayor a 6mL para las muestras y los correspondientes a la curva de calibración. Rotular los tubos.
2) Colocar 500 µL de la muestra o los correspondientes a la curva de calibración. Es aconsejable tener triplicados de las muestras.
3) Agregar 500 µL de DNPH 2 mM a cada tubo.
4) Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5) Agregar 5 mL de NaOH 0,4 M y homogeneizar.
6) Medir la absorbancia a 505 nm. Registrar en la tabla 4.8 los valores de absorbancia determinados.

La tabla 4.8 es un ejemplo de tabla para el registro de los datos en el cuaderno de laboratorio.

Tabla 4.8. Registro de datos para la determinación de la concentración de piruvato (o el α-cetoácido a estudiar) en las muestras de interés utilizando la reacción con el DNPH. Los tubos del 1 al 9 corresponden a los de la curva de calibración.

Tubo	**[Piruvato] (mM)**	**Absorbancia 550 nm**	**Absorbancia 550 nm**
Blanco	0		
1	0,1		
2	0,3		
3	0,6		
4	0,8		
5	1,0		
6	1,2		
7	1,4		
8	1,6		
9	2,0		
Tubo	Absorbancia 550 nm	Absorbancia 550 nm	Promedio Absorbancia
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			

Procesamiento de datos

Con los valores de absorbancia medidos para las soluciones patrón, elaborar la curva de calibración (absorbancia en función de la concentración del α-cetoácido) y determinar la ecuación de la recta. La curva de calibración se realiza con todos los puntos y se debe

obtener la mejor recta. A partir de esta ecuación de la recta y utilizando el promedio de absorbancia de cada muestra, se puede despejar la concentración de cada una de las muestras.

4.5. Determinación de la velocidad de reacción. Cinética enzimática

La espectrofotometría es muy utilizada para determinar la velocidad de una reacción, la actividad de una enzima y sus parámetros cinéticos.

4.5.1. Definición de velocidad inicial de una reacción

La velocidad de una reacción se define como el cambio de la concentración de los reactivos (o los productos) en un determinado tiempo. Depende de la concentración del reactivo (o los reactivos) y de la constante de velocidad de la reacción.

A continuación, se presenta un ejemplo de una reacción y su velocidad:

$$A + B \rightarrow C \qquad [4.4]$$

$$v = k\,[A][B] \qquad [4.5]$$

A y B son los reactivos, C, el producto, [A] y [B], la concentración del reactivo A y B, respectivamente, y k, la constante de velocidad de la reacción. La velocidad es directamente proporcional a la constante y a la concentración del reactivo o los reactivos; a mayor valor de alguno de ellos, mayor será la velocidad de la reacción.

Para determinar la velocidad de una reacción de forma experimental, se debe colocar en un tubo el reactivo o los reactivos, con una solución amortiguadora para controlar el pH. Además, hay que controlar la temperatura, al igual que el pH, ya que son variables que afectan la velocidad de una reacción.

Desde el punto de vista experimental, la velocidad que se puede determinar es la considerada inicial. En ese tramo inicial, el reactivo se ha consumido menos de un 10%, por lo que se puede asumir que la velocidad inicial determinada corresponde a la concentración de reactivo colocada inicialmente. Al pasar el tramo inicial se pierde la linealidad, dado que la velocidad depende de la concentración de los reactivos y estos se han consumido. Además, varias reacciones tienen inhibición por producto, lo cual lleva a una disminución de la velocidad de reacción inicial. En la figura 4.4 se observa un gráfico de concentración de producto en función del tiempo, el tramo inicial está linealizado con la ecuación de la recta correspondiente. La pendiente (a) de ese tramo corresponde a la velocidad inicial de la reacción. El corte en el eje de las Y (b) tiene un valor cercano a 0, ya que se corresponde con el tiempo 0, por lo que la concentración de producto es 0.

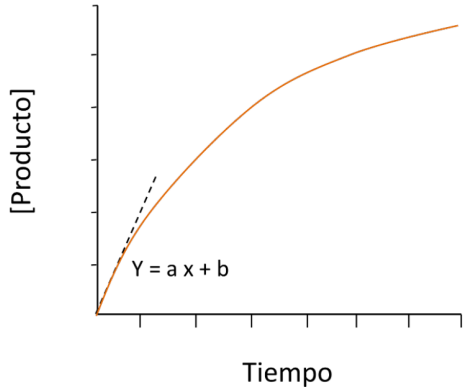


Figura 4.4. Concentración de producto en función del tiempo. La línea punteada corresponde a la linealización del tramo inicial de la velocidad. La pendiente de la ecuación de la recta correspondiente al tramo inicial (Y = ax + b) se corresponde con la velocidad de la reacción.

Como se mencionó anteriormente, también se puede determinar la velocidad inicial al seguir la concentración de los reactivos en función del tiempo. Se seguirá el consumo de reactivos o la formación de productos en el tiempo según cuál de estos se pueda medir experimentalmente. En la figura 4.5 se grafica la concentración de reactivo en función del tiempo. Para conocer la velocidad inicial se linealiza el tramo recto inicial y se determina la ecuación de la recta correspondiente. En este caso la pendiente tiene un valor negativo dado que el reactivo va disminuyendo (se va consumiendo a lo largo del tiempo), por lo cual su valor absoluto se corresponde con la velocidad inicial. El corte en el eje de las Y se corresponde con la concentración inicial del reactivo.

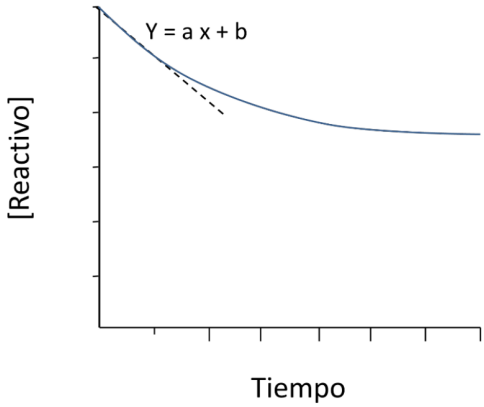


Figura 4.5. Concentración de reactivo en función del tiempo. La línea punteada corresponde a la linealización del tramo inicial de la velocidad. La pendiente de la ecuación de la recta correspondiente al tramo inicial (Y = ax + b) se corresponde con la velocidad de la reacción.

4.5.2. Definición de enzima

Una enzima es un catalizador biológico que acelera la velocidad de una reacción química. En su gran mayoría son proteínas. Desde el punto de vista termodinámico, aumentan la velocidad de una reacción que puede ocurrir de forma espontánea mediante la realización de pasos intermedios de reacción que permiten disminuir la energía de activación. La energía de activación se corresponde con la diferencia de energía entre el estado basal (la de los reactivos) y la energía del estado de transición; cuanto mayor es esa energía, mayor es la barrera para pasar de reactivos a productos, es decir, más lenta es la reacción. En la figura 4.6 se observa un gráfico de la coordenada de la reacción donde se comparan las reacciones sin catalizar y catalizada por enzima. Se ve que la enzima disminuye la energía de activación realizando otros estados de transición, lo que permite aumentar la velocidad de la reacción catalizada.

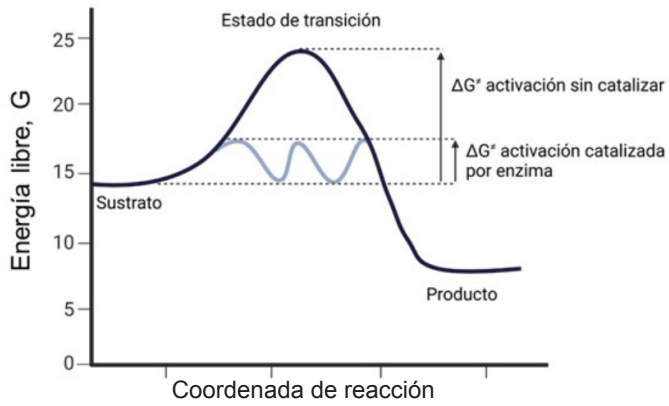


Figura 4.6. Gráfico de la coordenada de reacción donde se comparan las reacciones catalizadas por enzima y sin catalizar. Se indica la energía de activación de la reacción sin catalizar y la catalizada. La energía de activación del proceso es menor cuando la enzima cataliza la reacción. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

Las enzimas, en su mayoría proteínas, exhiben una alta especificidad hacia sus sustratos. Pueden ser reguladas mediante modificaciones postraduccionales, o moléculas que se unan a determinados sectores de la proteína, que pueden activar o inhibir la actividad enzimática. En los sistemas biológicos, las reacciones están catalizadas por enzimas específicas para cada proceso, lo que permite que sean reguladas tanto por modificaciones postraduccionales como por la regulación de la expresión y degradación proteica a nivel celular. Una de las modificaciones más comunes en biología es la fosforilación de ciertos residuos de aminoácidos en las enzimas.

La estructura de las proteínas depende de las interacciones débiles que se forman entre los aminoácidos que la componen. El pH del medio donde se encuentra la enzima influye en su estructura, ya que algunos residuos de aminoácidos tienen grupos funcionales que pueden protonarse o desprotonarse (cargarse positiva o negativamente) dependiendo del pH en el que se encuentran. Los cambios de pH generan cambios conformacionales que repercuten en la actividad de la enzima. Un pH y una temperatura óptimos corresponden al pH y la temperatura en los que una enzima adquiere la velocidad máxima de catálisis.

4.5.3. Determinación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima

Como ya se mencionó, la velocidad de una reacción catalizada por una enzima depende del pH y de la temperatura en que se encuentra, de la concentración de enzima (de forma directamente proporcional) y de la concentración de sustrato presente.

Para determinar la velocidad de una reacción catalizada por una enzima de forma experimental, se debe encontrar el método que permita seguir la concentración de sustrato o la de los productos en el tiempo. Varios productos o sustratos se pueden determinar de forma directa en el espectrofotómetro o utilizando métodos indirectos que reaccionan con alguno de ellos, lo que permite que sean detectados. Realizar los espectros de absorción de los sustratos y los productos es un buen ejercicio para conocer si tienen diferencias entre ellos.

A continuación, se muestran algunos ejemplos de métodos para seguir la concentración de los productos o sustratos de reacciones catalizadas por enzimas. Las reacciones catalizadas por enzimas que tienen como sustrato o producto el NADH se pueden seguir a 340 nm (pico máximo de absorción para esta forma reducida de la coenzima). Cuando ocurre transferencia de electrones (reacciones de óxido-reducción), puede utilizarse el reactivo DCPIP, que cambia de color al cambiar de estado de oxidación; y en las reacciones de las que se obtienen azúcares reductores, se puede seguir utilizando la oxidación del reactivo DNS, que cambia de color al cambiar de estado de oxidación.

En la figura 4.7 se observa un gráfico de concentración de sustrato o producto en función del tiempo y se indica el tramo recto inicial, correspondiente a la velocidad inicial en esas condiciones experimentales. Es importante observar que la velocidad inicial de aparición del producto o de desaparición del sustrato es la misma en términos absolutos.

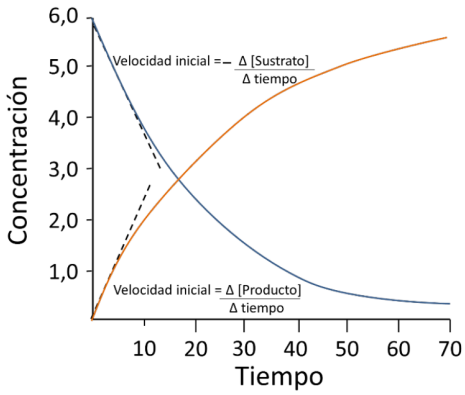


Figura 4.7. Concentración de sustrato (línea anaranjada) o producto (línea azul) en función del tiempo. El tramo inicial recto indicado con una línea punteada corresponde al tramo en condiciones de velocidad inicial, cuya pendiente corresponde a la velocidad inicial en esas condiciones experimentales.

De forma experimental, para determinar la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima, debe realizar un tubo de reacción que contenga sustrato, enzima y una solución amortiguadora al pH que desea determinar la reacción. En algunos casos puede contener algún reactivo que permita seguir la reacción.

Recordatorio: los gráficos siempre deben llevar unidades en sus ejes.
En estos casos no se indican porque se trata de ejemplos genéricos.

4.5.4. Cinética enzimática. Determinación de parámetros cinéticos

Las enzimas pueden clasificarse según su tipo de cinética en enzimas del tipo Michaelis-Menten y del tipo sigmoide. Desde el punto de vista experimental, para determinar el tipo de cinética de una enzima, es necesario realizar un gráfico de la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato, este gráfico se conoce como Michaelis-Menten.

A las enzimas del tipo Michaelis-Menten se les pueden determinar parámetros cinéticos como la velocidad máxima (Vmáx) que ocurre cuando la enzima se encuentra totalmente saturada, es decir, cuando todas las enzimas están catalizando un sustrato, no hay enzima libre, por lo que alcanza el límite máximo de velocidad que esa reacción puede alcanzar. La Vmáx depende directamente de la concentración de enzima, por lo que varía en cada experimento que se realiza.

Otro parámetro específico, que es propio de cada enzima, es constante y no varía, es la constante de Michaelis-Menten (K_M). De forma práctica se define como la concentración de sustrato a la cual la velocidad se corresponde con la mitad de la Vmáx que la enzima puede alcanzar.

El gráfico de Michaelis-Menten, velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, para el caso de las enzimas con cinética michaeliana, se ajusta a una hipérbola rectangular (figura 4.8, línea punteada azul), mientras que para las enzimas del tipo sigmoide, se ajusta a una sigmoide (figura 4.8, línea punteada rosada).

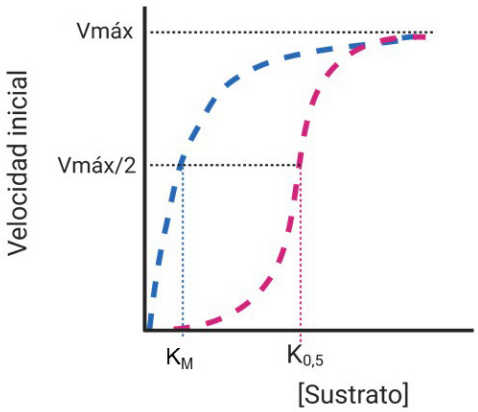


Figura 4.8. Velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. Se indica la cota superior de velocidad que logra alcanzar la enzima, definida como velocidad máxima (Vmáx). Se señala la concentración de sustrato a la cual se obtiene la mitad de la Vmáx, denominada K_M para las enzimas con cinética michaeliana (línea punteada azul) y $K_{0,5}$ para las enzimas con cinética sigmoidal (línea punteada rosada). La línea punteada azul corresponde a una enzima con cinética michaeliana, ya que los puntos del gráfico se ajustan a una hipérbola rectangular. La línea punteada rosada se ajusta a una sigmoide, correspondiente a las enzimas con cinética sigmoide (no michaeliana).

A las enzimas con cinética sigmoide también se les puede determinar una Vmáx cuando no hay enzima libre en la condición experimental. De igual forma, se define un $K_{0,5}$ para la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial es la mitad de la Vmáx.

Desde el punto de vista práctico, para determinar estos parámetros cinéticos, es necesario determinar la velocidad inicial a múltiples tubos con concentraciones diferentes de sustrato, pero manteniendo el resto de las condiciones experimentales iguales (concentración de enzima, pH y temperatura). Es importante que se utilicen concentraciones de sustrato que abarquen todo el rango de concentraciones, desde concentraciones menores a K_M o $K_{0,5}$ hasta concentraciones de sustrato que alcancen la velocidad máxima (concentraciones 10 veces mayores a la concentración de K_M o $K_{0,5}$).

Posteriormente, se deben realizar los gráficos de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato para realizar el ajuste y obtener los parámetros cinéticos. Para el caso de las enzimas michaelianas, existen gráficos secundarios que permiten ajustar los datos a un recta, lo que facilita la obtención de los parámetros cinéticos. El más utilizado es el gráfico de Lineweaver-Burk (figura 4.9), también conocido como doble recíproco. En este caso se grafica el inverso de la velocidad inicial en función del inverso de la concentración de sustrato, y a partir de la ecuación de la recta obtenida del ajuste lineal de los datos se puede determinar K_M y Vmáx.

La ecuación de la recta de forma genérica es:

$$Y = ax + b \qquad [4.6]$$

Siendo, a la pendiente del gráfico y b, el corte en el eje Y.

K_M y Vmáx se obtienen del despeje de las siguientes ecuaciones:

$$b = \frac{1}{Vmáx} \qquad [4.7]$$

$$a = \frac{K_M}{Vmáx} \qquad [4.8]$$

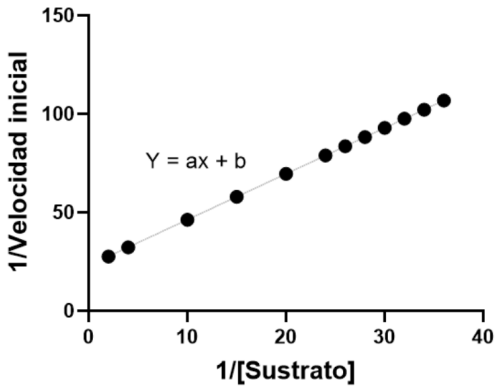


Figura 4.9. Gráfico de Lineweaver-Burk o doble recíproco. En este caso se grafica el inverso de la velocidad inicial en función del inverso de la concentración de sustrato. La pendiente de la recta (a) corresponde con K_M/Vmáx, mientras que el corte en la ordenada en el origen (b) corresponde con 1/Vmáx.

Las enzimas pueden ser inhibidas por determinadas moléculas que se pueden unir a ellas de forma irreversible, haciendo que disminuya la cantidad de enzima presente, o también de forma reversible. Los inhibidores reversibles pueden unirse al sitio activo de la enzima (sitio de entrada del sustrato) y competir por la unión del sustrato al sitio activo, o pueden unirse cuando el sustrato está unido a la enzima. Dependiendo del tipo de inhibidor reversible que se una a la enzima será el efecto que presente sobre los parámetros cinéticos.

Desde el punto de vista experimental, si se quiere conocer el efecto que induce una molécula en los parámetros cinéticos de una enzima, se debe repetir el mismo diseño experimental que el utilizado para determinar los parámetros cinéticos, pero en presencia de la molécula de interés, teniendo en cuenta que todos los tubos de reacción deben tener la misma concentración de inhibidor. Posteriormente, se debe realizar el mismo procesamiento de datos y elaborar los gráficos de Michaelis-Menten y el doble recíproco. En el caso de los inhibidores reversibles que compiten por el sitio activo de la enzima, el efecto es un aumento en el K_M de esta.

4.5.5. Actividad enzimática (U) y actividad específica (U/mg)

La actividad enzimática (U) es muy utilizada en el ámbito científico y se define como la cantidad de enzima que transforma 1 µmol de sustrato (o formación de producto) por minuto bajo condiciones de velocidad máxima. Esta información es fundamental puesto que no interesa tanto conocer la concentración proteica de un preparado, sino conocer qué tan activo está ese preparado. Desde el punto de vista práctico, para calcular la actividad de la enzima, hay que pasar la velocidad máxima obtenida a unidades de µM y ese valor se debe multiplicar por el volumen total de la reacción en litro.

Otro concepto utilizado es el de actividad específica (U/mg), en este caso se refiere a la actividad de la enzima (U) por mg de concentración de proteínas total de la muestra. Experimentalmente, implica que debemos determinar la concentración de proteína de la muestra por algún método, como se vio en la sección 4.2.2 y expresarla en mg. Matemáticamente, la actividad específica se obtiene de dividir la actividad entre la concentración de proteína determinada en mg. Este concepto es utilizado para ir conociendo la pureza de una muestra cuando se está realizando la purificación de una enzima, cuanto mayor es la actividad específica, más pura es la muestra.

4.6. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

4.6.1. Introducción

Los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) son técnicas ampliamente usadas en análisis clínicos y en el campo de la investigación. Utilizan las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar reacciones inmunológicas en solución. El ensayo se basa en la absorción de un componente (un anticuerpo o un antígeno) de forma covalente, pero no específica, a la superficie de un pocillo de una placa (fase sólida). Se utiliza una enzima ligada a un anticuerpo que reconozca a ese antígeno o anticuerpo y, mediante el agregado de sustratos específicos que cambian de color, se puede cuantificar y detectar la

unión efectiva. De forma muy resumida, los anticuerpos son proteínas de 150 kDa que reconocen de forma específica a un antígeno; y los antígenos son cualquier sustancia que puede ser unida de forma específica por un anticuerpo.

El uso más común de la técnica ELISA es la detección de un antígeno en una solución. En ese caso, a la superficie del pocillo se le ha unido el anticuerpo que reconoce el antígeno a detectar, se agrega una alícuota de la muestra o una solución patrón (calibrador) que contiene el antígeno que se va a cuantificar y se deja que se una al anticuerpo en fase sólida. Después de lavar el excedente que no se une, se añade un anticuerpo marcado con una enzima y se forma un *complejo sándwich* de enzima anticuerpo-antígeno-anticuerpo en fase sólida. Luego se elimina el anticuerpo no unido y se añade el sustrato enzimático. La cantidad de producto generado es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

Los anticuerpos específicos en una muestra también se pueden cuantificar mediante un procedimiento ELISA en el que se une antígeno en lugar de anticuerpo a una fase sólida. El segundo reactivo es un anticuerpo marcado con una enzima específica del anticuerpo. Si no se cuenta con un anticuerpo ligado con una enzima que reconoce específicamente al antígeno (anticuerpo primario ligado), luego de la unión del anticuerpo al antígeno, se puede utilizar un anticuerpo ligado a una enzima que reconozca de forma genérica la región constante del anticuerpo primario. Estos anticuerpos son denominados secundarios y reconocen específicamente a los anticuerpos de una especie, por ejemplo, anticuerpos que reconocen anticuerpos de ratón o de conejo, entre otros. La enzima que se liga al anticuerpo que más se utiliza es la peroxidasa de rábano (HRP, por su nombre en inglés, *horseradish peroxidase*), que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a expensas de oxidar los sustratos. Los sustratos más utilizados para revelar son la o-fenilendiamina y el $ABTS^{+\cdot}$.

Es importante incluir en el diseño experimental un control positivo (una muestra que incluya lo que se está testeando, por ejemplo, la proteína o anticuerpo de interés), un control negativo (una muestra que no incluya lo que se está buscando, por ejemplo, otra proteína o anticuerpo) y un blanco (sin muestra). De esta forma, si da color el control positivo y el negativo no, se puede asegurar que el ensayo funciona correctamente. Y el color obtenido en el blanco corresponde al cero para el resto de las muestras.

4.6.2. Procedimiento experimental

A continuación, se muestra un ejemplo de los pasos que hay que seguir para realizar un ELISA. No obstante, como se describió previamente, el protocolo que se utilice dependerá de lo que se quiere estudiar: la detección de un anticuerpo o de un antígeno.

Protocolo para la detección de un anticuerpo en una muestra

1) Preparar 500 mL de una solución amortiguadora fosfato salina (PBS) con cloruro de sodio (4 g), cloruro de potasio (0,1 g), fosfato sódico dibásico (0,72 g) y fosfato sódico monobásico (0,1225 g). Agregar 0,05 % de Tween al PBS.
2) Colocar en los pocillos 200 µL de una solución que contenga el antígeno que se va a estudiar (se suele utilizar una concentración de 0,5 a 2 µg). Incubar la placa por 1 hora a 37˚C o toda la noche a 4˚C.
3) Lavar 3 veces con PBS Tween 0,05 %; realizar cada lavado por 5 minutos a temperatura ambiente.

4) Bloquear con 200 µL de albúmina bovina 0,5 % por 1 hora a 37˚C o toda la noche a 4˚C.
5) Lavar 3 veces con PBS Tween 0,05 %; realizar cada lavado por 5 minutos a temperatura ambiente.
6) Incubar la muestra que contiene los anticuerpos para cuantificar por 1 hora a 37˚C. Idealmente, realizar diluciones seriadas de la muestra para evitar que se sature la señal. Además, se debe tener en cuenta el uso de soluciones patrón (calibradores) para cuantificar la muestra, por ello hay que reservar algunos pocillos dentro de la misma placa donde se va a realizar el experimento. Incluir unos pocillos con control negativo y blanco.
7) Lavar 3 veces con PBS Tween 0,05 %; realizar cada lavado por 5 minutos a temperatura ambiente.
8) Incubar con anticuerpo secundario conjugado a HRP por 1 hora a 37˚C.
9) Lavar 3 veces con PBS Tween 0,05 %; realizar cada lavado por 5 minutos a temperatura ambiente.
10) Incubar con el reactivo o-fenilendiamina, preparado en solución amortiguadora citrato-fosfato 0,05 M pH 5, hasta que se observe que el control positivo se está coloreando.
11) Cortar la reacción con 100 µL de ácido sulfúrico concentrado.
12) Medir la absorbancia a 492 nm utilizando un espectrofotómetro con lector de placas.

4.7. Ejercicios de rutina de laboratorio

En esta sección se describen actividades experimentales para la adquisición de técnicas básicas y fundamentales de laboratorio, como el uso de la espectrofotometría. Se busca mostrar planteos cotidianos de un laboratorio para guiar a cada estudiante en la resolución de este tipo de problemas, explicando paso a paso el procedimiento que se utilizará.

4.7.1. Espectros de absorción

En la figura 4.10 se presentan los espectros de absorción de la hemoglobina oxigenada (rojo) y desoxigenada (azul).

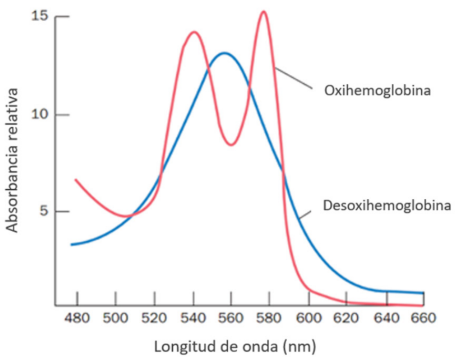


Figura 4.10. Espectros de absorción de la hemoglobina oxigenada (rojo) y desoxigenada (azul).

a) Seleccionar las longitudes de onda para cuantificar la hemoglobina oxigenada y para la hemoglobina desoxigenada. Justificar.

b) Se desea determinar la concentración de hemoglobina oxigenada en un lisado hepático. Sabiendo que el valor del coeficiente de extinción molar a 577 nm es $\varepsilon = 1{,}59 \times 10^4\ M^{-1}cm^{-1}$ determinar la concentración del lisado si la absorbancia de la muestra a 577 nm es 0,436 y se utilizó una cubeta de longitud igual a 1 cm.

c) Al mismo lisado hepático se le quiere determinar la concentración total de proteínas utilizando el método de Biuret. Para ello se obtuvo la curva de calibración de la figura 4.11 utilizando albúmina bovina (BSA, por su nombre en inglés, *bovine serum albumin*).

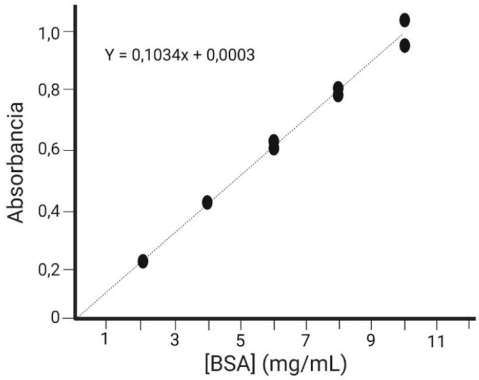


Figura 4.11. Absorbancia en función de la concentración de BSA.

La muestra y una dilución al medio de esta fueron tratadas de igual forma que la curva de calibración. El valor de absorbancia obtenido para la muestra fue 1,921 y para la dilución 0,925. ¿Qué concentración de proteína tiene la muestra?

Resolución

a) Para seleccionar la longitud de onda es necesario observar en el espectro de absorción a qué longitud efectivamente absorbe la muestra y específicamente seleccionar el pico máximo de absorción donde permite tener la mayor sensibilidad. En este caso, para la hemoglobina oxigenada el pico máximo de absorción se da a una longitud de onda de 577 nm y para el caso de la hemoglobina desoxigenada a 540 nm.

b) Utilizando la Ley de Beer (ec. 4.3):

$$Abs = \varepsilon . L . C \ \rightarrow C = Abs/\varepsilon . L$$

Sustituyendo y operando,

$$C = (0{,}436 / 1{,}59\ x\ 10^4 M^{-1} cm) = 2{,}742\ x\ 10^{-5}\ M$$

c) En este caso no se puede utilizar la muestra sin diluir para poder determinar la concentración de proteína en la muestra, ya que esta tiene un valor de absorbancia (1,921) que está por fuera del rango de la curva de calibración. Por este motivo, se debe utilizar la absorbancia de la muestra diluida al medio, correspondiente a 0,925. A partir de esta absorbancia se despeja la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, y posteriormente se debe tomar en cuenta el factor de dilución (que en este caso es 2 ya que se trata de una dilución al medio).

Ecuación de la recta de la curva de calibración: $y = 0{,}1034\ x + 0{,}0003$

$$(0{,}925 - 0{,}0003) \,/\, 0{,}1034 = 8{,}94\ mg/mL$$

Se multiplica por el factor de dilución (2): $17{,}88\ mg/mL$

4.7.2. Determinación de la velocidad inicial

Se desea determinar la Vmáx de la reacción catalizada por la enzima invertasa de un preparado enzimático. La invertasa cataliza la reacción de hidrólisis de la sacarosa, lo que da como producto glucosa y fructosa. Esta enzima tiene un pH óptimo de 4,5 y su K_M es de 15 mM.

a) Diseñar el tubo de reacción para determinar la Vmáx.

b) Indicar qué velocidad inicial de reacción (Vo) se obtuvo en el ensayo. Para esto, utilizar los datos del gráfico de concentración de glucosa en función del tiempo para la concentración de sacarosa seleccionada (figura 4.12).

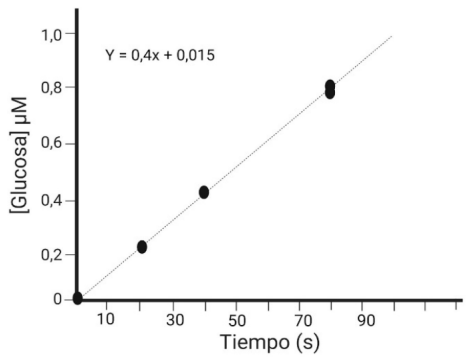


Figura 4.12. Concentración de glucosa en función del tiempo.

c) Si se realiza el mismo ensayo con la misma concentración de sacarosa, pero colocando una concentración de invertasa 10 veces mayor que en el ensayo anterior, ¿qué velocidad inicial se obtendrá?

Resolución

a) El tubo de reacción debe tener:

→ Una solución amortiguadora a pH 4,5 (pH óptimo).

→ Sacarosa (sustrato) con una concentración de al menos 10 veces el valor de K_M (15 mM), ya que en este caso se requiere que esté en condiciones de Vmáx; por lo tanto, serían concentraciones mayores a 150 mM.

→ El preparado enzimático.

b) Considerando que se trata de un gráfico de concentración de glucosa (producto) en función del tiempo, se sabe que la pendiente del primer tramo de este gráfico corresponde con la velocidad inicial. Es decir, la pendiente de este gráfico es de 0,4, por lo que la velocidad corresponde a 0,4 µM/s.

En este caso, coincide que la velocidad inicial es Vmáx para este preparado, ya que se realizó el ensayo a una concentración de sustrato 10 veces superior al K_M.

c) Si se aumenta 10 veces la concentración del preparado enzimático, aumenta diez veces la velocidad, dado que la velocidad es directamente proporcional a la concentración de enzima. Por lo tanto, la pendiente en esa situación sería de 4 µM/s.

4.7.3. Parámetros cinéticos

Se desean determinar los parámetros cinéticos de la lactato deshidrogenasa humana para el sustrato piruvato a pH fisiológico. La reacción que cataliza la enzima es:

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{Lactato} + \text{NAD}^+$$

Se conoce que el valor de K_M en algunas especies de mamíferos está en el entorno de 0,25 mM. El NADH tiene un pico máximo de absorción a 340 nm con un epsilón de 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$, por lo que se puede seguir la desaparición del sustrato (piruvato) en el tiempo.

a) Diseñar el experimento para determinar los parámetros cinéticos de la enzima para ese sustrato.

b) Determinar los parámetros cinéticos utilizando el gráfico de doble recíproco de la figura 4.13, construido con los datos obtenidos experimentalmente.

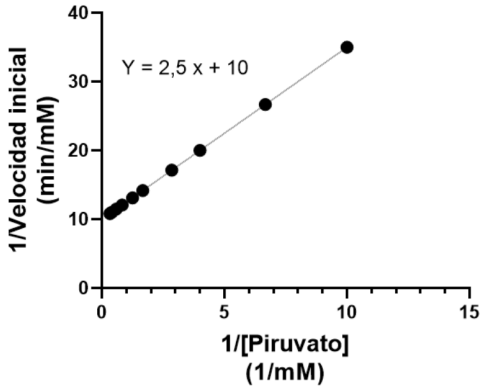


Figura 4.13. Inverso de la velocidad inicial en función del inverso de la concentración de piruvato.

Resolución

a) Para determinar los parámetros cinéticos, es necesario realizar varios tubos de reacción que contengan la misma cantidad de enzima y solución amortiguadora a pH 7.4, pero con concentraciones diferentes de piruvato (sustrato). Para seleccionar las concentraciones de sustrato de los diferentes tubos, se debe pensar en obtener la curva del gráfico de Michaelis-Menten, por lo que se deben seleccionar concentraciones por debajo, en el entorno y superiores al valor de K_M, y asegurar que se llega a concentraciones de sustrato que alcancen Vmáx, es decir, al menos 10 veces la concentración de K_M.

Posteriormente al armado de tubos, se debe determinar la velocidad inicial de cada uno de ellos, para luego realizar los gráficos de Michaelis-Menten y así obtener los parámetros cinéticos. Para determinar la velocidad inicial de cada uno de los tubos, se puede seguir la desaparición de sustrato (NADH) en el tiempo, utilizando un espectrofotómetro fijado a una longitud de onda de 340 nm.

A continuación, se presenta como ejemplo una tabla con concentraciones de sustrato a utilizar tomando en cuenta que K_M se encuentra en el entorno de 0,25 mM (tabla 4.9).

Concentración de sustrato (piruvato) presente en cada tubo de reacción. La elección de las concentraciones de sustrato en la tabla es para ejemplificar. Se pueden utilizar otras concentraciones, siempre buscando construir la curva del gráfico de Michaelis-Menten, es decir, que incluya concentraciones menores, en el entorno y superiores al K_M, y concentraciones 10 veces mayores que K_M (para asegurar que estemos en condiciones de velocidad máxima).

Tabla 4.9

Tubo	**[Piruvato] final (mM)**
0	0
1	0,10
2	0,15
3	0,25
4	0,35
5	0,60
6	0,80
7	1,20
8	1,70
9	2,50
10	3,00

Todos los tubos deben contener la misma cantidad de enzima (en este ejemplo, 100 µL, pero depende de cada protocolo experimental).

Para armar los 11 tubos, es necesario preparar una solución concentrada del sustrato (en el ejemplo, piruvato), para luego hacer diluciones a partir de ella. Esto facilita el armado de los tubos con concentraciones diferentes de sustrato. En este caso, se puede preparar una solución de piruvato 4 mM y tomar como volumen final de cada tubo 1 mL. (En el ejemplo se toma como volumen final 1 mL. El volumen final varía según cada protocolo experimental, pero suele ser de 1 mL ya que es lo mínimo que se necesita para una cubeta en el espectrofotómetro.) Para calcular los volúmenes de piruvato concentrado que se debe colocar en cada tubo, hay que utilizar la ecuación para realizar diluciones (ec. 2.5, sección 2.2).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Por ejemplo, en el tubo 1, la concentración inicial (la concentrada, C_1) corresponde con 4 mM, el volumen final del tubo de reacción es de 1 mL y la concentración final que se quiere alcanzar en el tubo 1 es de 0,1 mM, por lo tanto:

$$4\,mM\,.V_1 = 0{,}1\,mM\,.1\,mL$$
$$V_1 = 0{,}025\,mL = 25\,L$$

En el tubo 1, por lo tanto, se debe colocar 25 L más 875 L de solución amortiguadora, más los 100 L de la enzima para llegar a 1 mL de volumen final.

Idealmente, para seguir de forma ordenada el experimento, se aconseja armar una tabla para realizar los tubos correctamente. Los volúmenes del resto de los tubos se deben armar con el mismo razonamiento, pero cambiando la concentración de piruvato final. A continuación, se presenta la tabla completa con todos los volúmenes para cada uno de los tubos (tabla 4.10).

Preparación de los tubos de reacción para el estudio de los parámetros cinéticos de la lactato deshidrogenasa humana para el sustrato piruvato a pH fisiológico. Para armar cada tubo, es necesario conocer el volumen de piruvato concentrado que se debe colocar en cada uno de ellos y el volumen de la solución amortiguadora para diluir, y alcanzar la concentración final.

Tabla 4.10

Tubo	[Piruvato] (mM)	Volumen piruvato (µL)	Volumen solución amortiguadora pH 7.4 (µL)	Volumen de enzima (µL)	Velocidad inicial (mM/min)
0	0	0	900	100	
1	0,1	25	875	100	
2	0,15	37,5	862,5	100	
3	0,25	62,5	837,5	100	
4	0,35	87,5	812,5	100	
5	0,60	150	750	100	
6	0,80	200	700	100	
7	1,20	300	600	100	
8	1,70	425	475	100	
9	2,50	625	275	100	
10	3	750	150	100	

Ni bien se coloca la enzima, la reacción comienza, por lo que se recomienda preparar en primer lugar todos los tubos con solución amortiguadora y sustrato, sin el agregado de la enzima. Previamente, se debe preparar el espectrofotómetro, en este caso, se debe dejar el espectrofotómetro pronto con la longitud de 340 nm, con el blanco ya hecho.

Se pueden hacer tablas para cada tubo, de forma que luego sea más sencillo determinar la velocidad inicial.

Para realizar el seguimiento de la reacción, es necesario registrar las absorbancias a 340 nm obtenidas luego del agregado de la enzima. Se deben elaborar tantas tablas como tubos de reacción se realicen. Al finalizar la reacción, se puede determinar la concentración de producto para cada tiempo a partir de la absorbancia utilizando la ley de Lambert-Beer (ec. 4.3).

Tabla 4.11

Tubo 0		
Tiempo (segundos)	**Abs 340 nm**	**[NADH] (mM)**
0		
5		
10		
15		
20		
25		
30		

Con todo preparado, se agrega la enzima al tubo 0, se mezcla, y se coloca en la cubeta para medir en el espectrofotómetro. En este caso, se debe utilizar una cubeta de cuarzo o para UV (ultravioleta), ya que la longitud de onda 340 nm se encuentra dentro del espectro de la región UV. A continuación, se registran los valores de absorbancia a medida que pasa el tiempo.

Con el epsilón a 340 nm del NADH (ε = 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$) se puede determinar la concentración de producto formado en el tiempo, utilizando la ley de Lambert-Beer (ec. 4.3).

$$Abs = \varepsilon . L . [NADH]$$

Luego de determinar la concentración de NADH en cada tiempo (utilizando la ley de Lambert-Beer), se puede realizar el gráfico de concentración de NADH en función del tiempo. A partir de este gráfico, se toma la parte inicial recta para obtener la ecuación de la recta, y a partir de esta, la pendiente que corresponde a la velocidad inicial para cada tubo. Para pasar de velocidad en segundos a minutos, se debe multiplicar por 60 (lo que equivale a un minuto).

Con todos los datos obtenidos se puede completar la tabla 4.12, y a partir de estos elaborar el gráfico de doble recíproco para posteriormente realizar la linealización y obtener los parámetros cinéticos a partir de la ecuación de la recta.

Datos para los gráficos de velocidad inicial y de doble recíproco para la obtención de parámetros cinéticos de la reacción en estudio. Se completa con las velocidades iniciales obtenidas de cada tubo. Para elaborar el gráfico de doble recíproco se debe realizar el inverso de la concentración de sustrato y de la velocidad inicial. Hay que tomar en cuenta que matemáticamente 1/0 no existe.

Tabla 4.12

[Piruvato] (mM)	Velocidad inicial (mM/min)	1/[Piruvato] (1/mM)	1/Velocidad inicial (min/mM)
0	0	—	—
0,10			
0,15			
0,25			
0,35			
0,60			
0,80			
1,20			
1,70			
2,50			
3,00			

A partir de la linealización del doble recíproco, se obtiene una ecuación de la recta cuya pendiente corresponde con K_M/Vmáx, y el corte en el eje de las Y al inverso de la Vmáx. Por lo tanto, se puede obtener en primera instancia la Vmáx realizando el inverso del corte en el eje de las Y, y posteriormente, multiplicando la Vmáx obtenida por la pendiente, obtener K_M.

b) Se pueden determinar los parámetros cinéticos a partir de la ecuación de la recta del gráfico de doble recíproco, obtenido a partir de los datos experimentales.

Aplicando la ecuación 4.7:

$$b = 10$$

$$b = \frac{1}{Vmáx} \rightarrow Vmáx = \frac{1}{10} = 0{,}1\ mM/min$$

Luego de determinada la Vmáx, se aplica la ecuación 4.8:

$$a = 2{,}5 = \frac{K_M}{Vmáx} \rightarrow K_M = 2{,}5\ x\ 0{,}1 = 0{,}25\ mM$$

Por lo tanto, se obtiene que

$$K_M = 0{,}25\ mM$$
$$Vmáx = 0{,}1\ mM/min$$

4.8. Actividades experimentales

En esta sección se presentan diferentes protocolos experimentales de laboratorio que tienen como objetivo el aprendizaje de la espectrofotometría y su aplicabilidad. En particular, se utiliza la cuantificación de proteínas con diferentes métodos colorimétricos, la determinación de velocidad inicial y la realización de espectros como ejemplo de empleo de la espectrofotometría.

4.8.1. Cuantificación de proteínas

Objetivo

Determinar la concentración de proteínas presentes en un extracto enzimático.

Introducción

Las enzimas suelen purificarse a partir de tejidos o células, dependiendo de dónde se encuentren. La mezcla de proteínas que se obtiene a partir de una purificación se denomina extracto enzimático, pero la enzima de interés es la proteína predominante de ese extracto. La cuantificación de la concentración proteica nos proporciona información sobre el rendimiento del proceso de purificación, es decir, cuánto material inicial se necesita para obtener la proteína de interés, y permite comparar la eficacia entre muestras con igual cantidad.

Procedimiento experimental

Preparación de soluciones

1) Reactivo de Biuret: disolver 1,5 g de $CuSO_4.5H_2O$ y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500mL de agua destilada. Agregar 300 mL de NaOH 10% (m/v) y llevar a un volumen final de 1 L. Almacenar en contenedor de plástico oscuro.

2) Preparar 15 mL de albúmina bovina de concentración 20 mg/mL.

Cuantificación de proteínas

1) Elaborar la curva de calibración preparando los tubos según la tabla 4.13. Realizar cada tubo por duplicado.

Tabla 4.13. Preparación de la curva de calibración utilizando una concentración stock de 20 mg/mL de albúmina bovina y un volumen final de cada tubo de 2 mL

Tubo	Concentración final de albúmina bovina (mg/mL)	Volumen de albúmina bovina concentración 20 mg/mL (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
Blanco	0	0	2
1	2	0,2	1,8
2	4	0,4	1,6
3	6	0,6	1,4
4	8	0,8	1,2
5	10	1,0	1,0
6	12	1,2	0,8
7	14	1,4	0,6
8	16	1,6	0,4
9	20	2	0

2) Preparar diferentes diluciones del extracto enzimático por duplicado:

a) Una dilución 1/10 del extracto: 0,4 mL del extracto más 3,6 mL de agua destilada.

b) Una dilución 1/100 del extracto: tomar 0,4 mL de la dilución anterior (1/10) y agregar 3,6 mL de agua destilada.

c) Una dilución 1/1000 del extracto: tomar 0,4 mL de la dilución anterior (1/100) y agregar 3,6 mL de agua destilada.

3) Tomar 2 mL de cada dilución preparada y colocar en un tubo correctamente rotulado, recordar que esto debe realizarse por duplicado.

4) Agregar 2 mL del reactivo de Biuret a los tubos de la curva de calibración y a los tubos de las diluciones preparadas. Dejar incubando todos los tubos a 37˚C por 15 minutos.

5) Prender el espectrofotómetro y fijar la absorbancia a 540 nm. Realizar el blanco con el tubo correspondiente a 0 mg/mL de albúmina bovina.

Resultados

1) Registrar en la tabla 4.14 las absorbancias obtenidas de la curva de calibración y de las diferentes diluciones realizadas.

Tabla 4.14. Registro de datos para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras de interés por el método colorimétrico de Biuret

Tubo	**[Albúmina bovina] (mg/mL)**	**Absorbancia 540 nm**	**Absorbancia 540 nm**
1	2		
2	4		
3	6		
4	8		
5	10		
6	12		
7	14		
8	16		
9	20		
Tubo	Absorbancia 540 nm	Absorbancia 540 nm	Promedio absorbancia
Dilución 1/10			
Dilución 1/100			
Dilución 1/1000			

2) Realizar la curva de calibración elaborando un gráfico de concentración de albúmina bovina en función de la absorbancia a 540 nm.

3) Determinar la ecuación de la recta para el gráfico.

4) Calcular el promedio de las absorbancias obtenidas para cada dilución.

5) Observar cuál de las diferentes diluciones tienen valores de absorbancia que se encuentran en el rango de la curva de calibración y, a partir de ellos, utilizando la ecuación de la recta, determinar la concentración del extracto proteico.

4.8.2. Espectros de absorción de la hemoglobina

Objetivos

1) Observar el efecto de la hemoglobina en presencia y en ausencia de oxígeno en el espectro de absorción.

2) Observar el efecto de la oxidación de la hemoglobina en el espectro de absorción.

Introducción

La hemoglobina (Hb) es una proteína compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una porta un grupo hemo. Su función principal radica en el transporte de gases, como el oxígeno y el dióxido de carbono. Debido a la presencia del grupo hemo como grupo prostético, la hemoglobina exhibe un espectro característico en torno a los 400nm, conocido como la banda de Soret, que le confiere el característico color rojo. El

espectro de la hemoglobina es diferente dependiendo de si se encuentra unida a oxígeno (oxihemoglobina), sin oxígeno (desoxihemoglobina) o si se encuentra con el hierro del grupo hemo oxidado (metahemoglobina).

Procedimiento experimental

Realizar espectros de distintas preparaciones de Hb utilizando el espectrofotómetro.

1) Preparar previamente las siguientes soluciones:

a) Dos soluciones de hemoglobina: una de concentración 20 µM y otra de concentración 8 µM, cada una en solución amortiguadora pH 7,4, 20 mM.

Dato: peso molecular de la hemoglobina 66000 Da.

b) Ditionito de sodio 2 mM en condiciones anaeróbicas.

c) Nitrito de sodio 12 mM.

2) Realizar espectros de absorción de las dos soluciones de hemoglobina en el rango 400-700nm. Previamente, realizar el blanco con la solución amortiguadora.

3) Guardar los espectros obtenidos y anotar los principales picos de absorbancia observados, así como los valores de absorbancia alcanzados en ambas soluciones.

4) Agregar 10 µL del ditionito de sodio a la cubeta que contiene la solución de hemoglobina de concentración 8 µM.

Nota: El ditionito de sodio reacciona con el oxígeno presente en la cubeta y deja la hemoglobina sin oxígeno, se obtiene así desoxihemoglobina.

5) Burbujear aire dentro de la cubeta por medio de una pipeta Pasteur, esperar unos 3 minutos y volver a correr un espectro. Guardar los espectros obtenidos.

6) Agregar nitrito de sodio (NO_2^-) a la solución de hemoglobina 20 µM para alcanzar una concentración de 1,2 mM y registrar la absorbancia en el rango 500-700nm tomando espectros cada 1 minuto durante 5 minutos.

Nota: El nitrito de sodio oxida a la hemoglobina.

Discusión de los resultados

Discutir y contestar las siguientes preguntas sobre los resultados obtenidos del experimento:

a) ¿Cuáles son los picos máximos que se observan en el primer espectro realizado?

b) ¿Qué cambios espectrales se observan en presencia de ditionito de sodio?

c) ¿Cómo se denomina a la hemoglobina en ausencia de oxígeno?

d) ¿Qué sucede con el espectro al burbujear la muestra?

e) ¿Qué pico aparece frente al agregado de nitrito de sodio?

f) ¿Cómo se denomina a la hemoglobina que se forma al agregar nitrito de sodio?

4.8.3. Determinación de la velocidad máxima de una reacción catalizada por la enzima invertasa

Objetivos

Determinar la velocidad máxima de una reacción catalizada por la enzima invertasa.

Introducción

El sustrato principal de la β-fructofuranosidasa, también conocida como invertasa, es el disacárido sacarosa, por lo que también se la conoce como sacarasa. Esta enzima cataliza la reacción de hidrólisis de la sacarosa a fructosa y glucosa. Para determinar la velocidad de la reacción catalizada por una enzima se debe medir la desaparición del sustrato o la aparición del producto. En el caso de la reacción catalizada por la invertasa, dado que la sacarosa es un azúcar no reductor, una forma de determinar la velocidad es medir la aparición del poder reductor de sus productos (glucosa o fructosa). Para ello se utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), un reactivo que es reducido por los glúcidos reductores y cambia de color amarillo a anaranjado. Se cuantifica midiendo en el espectrofotómetro la absorbancia a 570 nm.

La enzima se encuentra en condiciones de velocidad máxima cuando está saturada de sustrato, es decir, no hay enzima libre en la solución. Se deben utilizar concentraciones de sustrato de al menos diez veces la concentración del K_M para encontrarse en condiciones de velocidad máxima. En el caso de esta enzima, el K_M aproximado es de 30 mM.

Procedimiento experimental

Se van a preparar dos tubos de reacción en condiciones de velocidad máxima. Se repite la misma condición experimental porque al realizar duplicados o triplicados de las condiciones experimentales se disminuyen los errores asociados a la incertidumbre de los equipos y el error asociado a la manipulación.

1) Antes de comenzar con la reacción, es necesario armar 20 tubos de vidrio con 900 µL de DNS cada uno.

2) Rotular cada uno de ellos con tiempo 1, tiempo 2, tiempo 3, hasta alcanzar los 10 tubos, y repetir para el duplicado.

3) Preparar 5 mL de una solución de sacarosa 400 mM en solución amortiguadora 0,05 M pH 4,5.

4) Armar los tubos de reacción para determinar la velocidad máxima colocando en cada uno de ellos 1800 µL de la solución de sacarosa 400 mM preparada previamente.

5) Agregar 200 µL de enzima a los tubos de reacción. Tomar en cuenta que al momento de colocar la enzima el tiempo de reacción comienza.

6) Sacar de cada tubo de reacción de a 100 µL cada 2 minutos y colocarlo en los tubos previamente rotulados (según el tiempo correspondiente) y preparados con 900 µL de DNS. El DNS está preparado en NaOH, por lo que la reacción en contacto con el DNS se termina.

7) En paralelo, realizar la curva de calibración con glucosa.

a) Preparar 10 mL de una solución de glucosa 20 mM.

b) Preparar los tubos por duplicado como indica la tabla 4.15.

Tabla 4.15. Curva de calibración utilizando una concentración stock de 20 mM de glucosa y un volumen final de cada tubo de 100 µL

Tubo	[Glucosa] (mM)	Volumen de glucosa (µL)	Volumen de agua destilada (µL)	Volumen de DNS (µL)
Blanco	0	0	100	900
1	2	10	90	900
2	4	20	80	900
3	6	30	70	900
4	8	40	60	900
5	10	50	40	900
6	12	60	30	900
7	14	70	20	900
8	16	80	10	900
9	20	100	0	900

1) Incubar a 100˚C por 5 minutos todos los tubos con DNS, tanto los de la curva de calibración como los tubos de reacción de las muestras de interés.

2) Prender el espectrofotómetro y fijar la longitud de onda en 570 nm. Realizar el blanco utilizando el tubo marcado como blanco.

3) Elaborar una tabla para ir registrando las absorbancias de cada una de las muestras, tanto de los tubos de la curva de calibración (tabla 4.16), como de los tubos de reacción que contienen las muestras de interés de acuerdo a cada tiempo registrado (tablas 4.17 y 4.18).

4) Medir la absorbancia de cada tubo a 570 nm y registrar los datos en la tablas 4.17 y 4.18, según corresponda.

Tabla 4.16. Registro de absorbancias a 570 nm para los tubos de la curva de calibración utilizando el método colorimétrico del DNS

Tubo	[Glucosa] (mM)	Absorbancia 570 nm (tubo 1)	Absorbancia 570 nm (tubo 2)
Blanco	0		
1	2		
2	4		
3	6		
4	8		
5	10		
6	12		
7	14		
8	16		
9	20		

Tabla 4.17. Registro de absorbancias a 570 nm para el tubo de reacción en condiciones de velocidad máxima en función del tiempo. A partir del dato de absorbancia, se puede determinar la concentración de glucosa más fructosa presente (glúcidos reductores).

Tiempo (min)	Absorbancia 570 nm	[Glucosa + Fructosa] (mM)	[Glucosa] (mM)
0			
2			
4			
6			
8			
10			
12			
14			
16			
18			

Tabla 4.18. Registro de absorbancias a 570 nm para el duplicado del tubo de reacción en condiciones de velocidad máxima en función del tiempo. A partir del dato de absorbancia, se puede determinar la concentración de glucosa más fructosa presente (glúcidos reductores).

Tiempo (min)	Absorbancia 570 nm	[Glucosa + Fructosa] (mM)	[Glucosa] (mM)
0			
2			
4			
6			
8			
10			
12			
14			
16			
18			

Resultados

1) Con los datos de la curva de calibración (tabla 4.16), realizar el gráfico de absorbancia a 570nm en función de la concentración de glucosa. Graficar en el mismo par de ejes todos los puntos (incluyendo los duplicados). Determinar la ecuación de la recta. La pendiente de este gráfico se corresponde con el epsilón (ε) para el DNS reducido a 570 nm.

2) Con el ε determinado de la curva de calibración y utilizando la ley de Lambert-Beer, determinar la concentración de glucosa + fructosa para cada tiempo de cada tubo de reacción. Para obtener la concentración de glucosa en cada tiempo se debe dividir el valor de [Glucosa + Fructosa] entre 2, ya que en cada reacción se forma una molécula de glucosa y una de fructosa. Graficar la concentración de glucosa en función del tiempo para cada tubo.

Discusión

1) Determinar hasta qué punto se está en condiciones de velocidad inicial, es decir, cuándo el gráfico de concentración de glucosa en función del tiempo se encuentra en el tramo inicial recto.

2) Obtener de cada gráfico de glucosa en función del tiempo la ecuación de la recta de ese tramo inicial. La pendiente corresponde a la velocidad inicial.

3) Realizar el promedio de las velocidades iniciales determinadas para cada duplicado.

Bibliografía

Alhajj, M., Zubair, M., y Farhana, A. (2023). Enzyme linked immunosorbent assay. *StatPearls*. https://www.statpearls.com/point-of-care/21178

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides, 72,* 4-15.

Chang, R. (2014). Teoría cuántica y la estructura electrónica de los átomos. En *Química* (7.ª ed., pp. 275-321). McGraw-Hill.

Crowther, J. R. (1995). Basic principles of ELISA. En *Elisa: Theory and Practice* (pp. 35-61). Humana Press.

Germer, T. A., Zwinkels, J. C., y Tsai, B. K. (2014). *Experimental Methods in the Physical Sciences: Vol. 46. Introduction. Spectrophotometry: Accurate Measurement of Optical Properties of Materials* (pp. 1-9). Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-386022-4.00001-7

Germer, T. A., Zwinkels, J. C., y Tsai, B. K. (2014). *Experimental Methods in the Physical Sciences: Vol. 46. Theoretical Concepts in Spectrophotometric Measurements. Spectrophotometry: Accurate Measurement of Optical Properties of Materials* (pp. 11-66). doi:10.1016/b978-0-12-386022-4.00002-9

Kirschenbaum, D. M. (1978). Molar Absorptivity and A 1% 1 cm values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. *Analytical Biochemistry, 87*(1), 223-242.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2014). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En *Principios de bioquímica* (pp. 75-115). Omega.

Voet, D., y Voet, J. G. (2010). Nucleic Acids, Gene Expression, and Recombinant DNA Technology. En *Biochemistry* (4.ª ed., pp. 82-104). John Wiley & Sons.

Voet, D., y Voet, J. G. (2010). Hemoglobin: Protein Function in Microcosm. En *Biochemistry* (4.ª ed., pp. 323-358). John Wiley & Sons.

CAPÍTULO 5

Técnicas separativas

En este capítulo veremos algunas técnicas que se utilizan para separar diferentes moléculas que componen una muestra compleja. La elección de la técnica adecuada depende del tipo de moléculas que componen la mezcla y de sus propiedades fisicoquímicas. Cada método de separación se basa en una o varias de estas propiedades, que varían entre las moléculas de la mezcla, lo que permite su diferenciación y separación. Así mismo, el tipo de técnica depende del objetivo que se busque; por ejemplo, si se desea la identificación, se usarán técnicas que permitan la identificación, como la electroforesis o el western blot. Mientras que, si el objetivo es la separación de una molécula de interés para seguir trabajando con ella posteriormente, se usarán técnicas que así lo permitan.

5.1. Electroforesis

La electroforesis es un método fundamental para separar proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Esta técnica se basa en la migración de iones en un campo eléctrico. El polo hacia el que migra cada partícula, así como la velocidad de ese movimiento dependen de su carga, su masa molecular y su estructura tridimensional. Por lo que, si una mezcla está compuesta por moléculas que se diferencien en alguna de estas propiedades, se podrán separar por electroforesis. Además, esta técnica se puede utilizar para conocer el peso molecular de una molécula, estimar su punto isoeléctrico (pI), determinar el grado de pureza y purificar proteínas o fragmentos de ADN.

De forma práctica, la electroforesis implica sembrar una muestra en un soporte sólido sumergido en una solución amortiguadora a un determinado pH, denominada solución de corrida. El soporte sólido es un polímero poroso, que puede ser de papel de filtro, acetato de celulosa, agarosa o acrilamida, al que se le aplica un campo eléctrico generado por dos polos (positivo y negativo). Las diferentes moléculas sembradas migran hacia el polo dependiendo de la carga que presentan, el soporte restringe el movimiento y la migración de la muestra, lo que permite que se separen los diferentes componentes según el peso y la carga, y la formación de bandas o zonas.

Cabe destacar que la carga eléctrica de las biomoléculas depende del pH del medio en el que se encuentran. Teniendo en cuenta que el movimiento de las moléculas en una electroforesis depende de su carga, la elección de la solución amortiguadora de corrida que determina el pH del medio es de gran importancia para esta técnica. El pI corresponde al pH en el que la proteína, el péptido o el aminoácido tiene carga neta igual a cero. Eso implica que, en un campo eléctrico, la proteína no va a migrar. Una proteína, péptido o aminoácido que se encuentre en una solución con pH de valor inferior al pH del pI se encuentra con carga neta positiva y migrará hacia el cátodo (polo negativo) de la electroforesis, mientras que si se encuentra en una solución de pH superior al pI, tendrá carga neta negativa y migrará hacia el ánodo (polo positivo).

Existen diferentes formas de clasificar las electroforesis, una de ellas tiene en cuenta el soporte sólido (papel o gel), otra, el tratamiento de la muestra (nativa o desnaturalizante). Una electroforesis puede ser en papel y nativa o puede ser en papel y desnaturalizante. Asimismo, puede ser en gel y nativa o en gel y desnaturalizante.

La estructura nativa corresponde a la conformación de la proteína funcional, es decir, con todas las interacciones débiles que permiten que su estructura se encuentre activa y conserve su carga neta. Por su parte, cuando la proteína se encuentra desplegada debido a la ruptura de las interacciones débiles que la estabilizan, se dice que está desnaturalizada. Existen varios mecanismos para desnaturalizar una proteína; es frecuente el uso de detergentes iónicos en conjunto con agentes reductores, que rompen los puentes disulfuros de las proteínas, así como también un aumento de la temperatura. Si las muestras se desnaturalizaron usando detergentes iónicos, las proteínas presentes quedan cargadas uniformemente con la carga del detergente y migran según sus pesos moleculares.

5.1.1. Electroforesis en papel

La electroforesis en papel, para la cual uno de los materiales más frecuentes es el acetato de celulosa, se usa habitualmente para separar aminoácidos, péptidos y proteínas. Un ejemplo muy utilizado es separar los aminoácidos según el pI. Los aminoácidos van a migrar a los diferentes polos según la carga que poseen, que depende del pH de la solución de corrida que se aplique (figura 5.1).

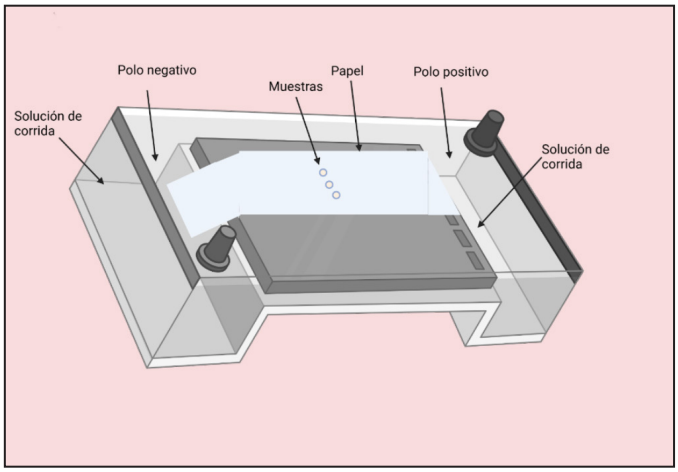


Figura 5.1. Electroforesis en papel o acetato de celulosa. Diagrama del sistema de electroforesis en acetato de celulosa. La muestra se aplica en un punto del acetato humedecido con solución amortiguadora de corrida. Los extremos del papel se sumergen en depósitos de solución tampón en los que se sumergen los electrodos y se aplica un campo eléctrico. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

Fue ampliamente utilizada por su fácil manejo en los laboratorios clínicos para obtener el gráfico de proteinograma electroforético, que corresponde a un gráfico que se obtiene de analizar la corrida electroforética de las proteínas plasmáticas. El estudio implica sembrar el suero en el papel de acetato de celulosa y aplicarle un campo eléctrico, permitiendo que las proteínas del plasma se separen según su carga y peso. También fue utilizado para el

estudio de las diferentes variantes de la hemoglobina, ya que permite la separación de las cadenas de la proteína. En ambas situaciones se usa una solución amortiguadora de corrida con pH básico, dado que la hemoglobina y las proteínas plasmáticas tienen carga negativa a pH básicos y, por lo tanto, migran hacia el ánodo cuando se aplica un campo eléctrico. En este tipo de electroforesis las proteínas se encuentran en su forma nativa, ya que no se utiliza un agente desnaturalizante. Por esta razón se separan por el peso molecular de su estructura nativa y por su carga al pH de la solución amortiguadora utilizada. Una vez finalizada la corrida, se sumerge el acetato de celulosa en una solución de tinción que se une específicamente a los componentes de la muestra, por ejemplo, rojo Ponceau-S. Las proteínas teñidas pueden cuantificarse por densitometría. En la figura 5.2 se observan ejemplos de separación de proteínas plasmáticas por electroforesis en acetato de celulosa.

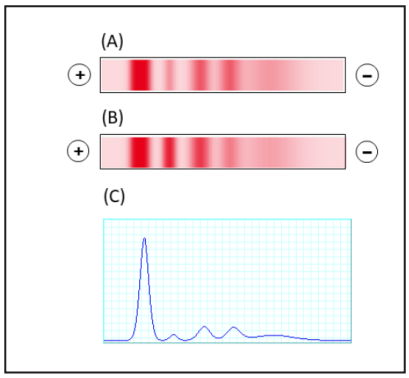


Figura 5.2. Resultado de la separación de las proteínas plasmáticas mediante electroforesis en acetato de celulosa. La tinción se realiza con rojo Ponceau-S. A. Electroforesis de proteínas plasmáticas de paciente sano. B. Electroforesis de proteínas plasmáticas de paciente con inanición. C. Densitograma realizado a partir del resultado mostrado en A. (Imágenes tomadas de Universidad de Alcalá (s. f.), *Acetato,* Biomodel. https://biomodel.uah.es/lab/acetato/)

5.1.1.1. Procedimiento genérico para una corrida en una electroforesis de acetato de celulosa

1. Preparar la solución amortiguadora de corrida al pH que desea estudiar. Normalmente, las proteínas a pH básicos se encuentran cargadas negativamente, por lo que se suele utilizar soluciones amortiguadoras de corrida a pH básicos, ejemplo, Tris-Glicina pH 8,7.

2. Las tiras de acetato de celulosa se conservan en metanol al 40 %, por lo que previamente deberá sumergirlas en la solución amortiguadora de corrida por 15 minutos.

3. Secar bien las tiras con papel de filtro y montarlas en la cuba de electroforesis con la superficie absorbente hacia arriba (cara mate, no brillante) y con los extremos tocando las soluciones de la solución amortiguadora de corrida.

4. Sembrar las muestras a 2 cm del polo negativo (cátodo).

5. Cerrar la cuba de electroforesis en forma hermética y aplicar 240 voltios por 45 minutos. El amperaje aproximado será de 2 mA.

6. Posteriormente, quitar las tiras de la cuba electroforética y colocarlas en un recipiente que contenga una solución de 0,5% de rojo Ponceau durante 5-10 minutos.

7. Colocar las tiras en agua para eliminar el color de fondo.

5.1.2. Electroforesis en gel

En este tipo de electroforesis, el campo eléctrico aplicado mueve los componentes de la muestra a través de un gel que contiene pequeños poros. El gel puede estar formado por diferentes polímeros, y el tamaño de los poros depende del polímero y la concentración que se utilice. Los polímeros más utilizados son la agarosa (poros más grandes) y la poliacrilamida (poros más pequeños).

En la figura 5.3 se muestra un esquema general de los pasos para realizar una electroforesis, que se profundizarán en las siguientes secciones.

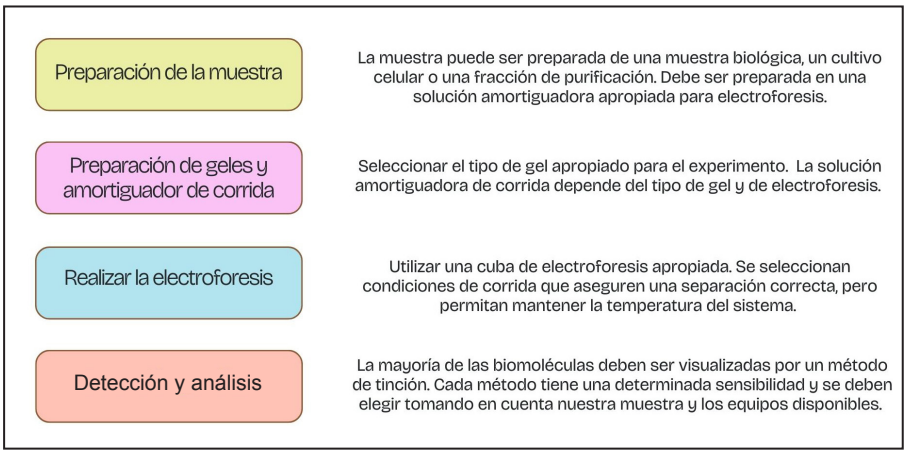


Figura 5.3. Esquema de los pasos para realizar una electroforesis en gel.

5.1.2.1. Electroforesis en gel de agarosa

La agarosa es la fracción neutra de polisacáridos de agar. El gel se prepara realizando una disolución del polisacárido en agua caliente, que luego se enfría y forma un gel mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno intramoleculares. El tamaño de poro es controlado por la concentración de agarosa. Permite separar materiales de alto peso molecular, como agregados de proteínas, lipoproteínas, ADN, ribosomas, entre otros.

El gel de agarosa se usa con frecuencia en el laboratorio para la separación de moléculas de ácidos nucleicos, que migran en el campo eléctrico debido a su carga negativa. La velocidad de migración de los ácidos depende de su tamaño y conformación, lo que permite la separación de ácidos nucleicos de distinta cantidad de pares de bases. Este método es comúnmente utilizado para el análisis de fragmentos de ADN entre 0,1 y 25 kb. En la tabla 5.1 se pueden ver los rangos de separación de los fragmentos de ADN según el porcentaje de agarosa.

Tabla 5.1. Rangos de separación de fragmentos de ADN según el porcentaje de agarosa utilizada en el gel

Concentración de agarosa (% m/v)	Rangos de separación de fragmentos de ADN (kb)
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3

Las soluciones amortiguadoras más usadas para la corrida electroforética en este tipo de soporte son TBE (tris-borato-EDTA) y TAE (tris-acetato-EDTA). La muestra que se va a sembrar debe prepararse con buffer de la muestra que contiene glicerol, que le da densidad, y azul de bromofenol, que permite seguir el frente de corrida.

Para la detección del ADN, luego de realizada la corrida electroforética, se incluye el gel en una solución de bromuro de etidio, un agente intercalante del ADN que permite visualizar esta macromolécula a través de una fuente de luz ultravioleta (transiluminador). Para la manipulación de agentes intercalantes se recomienda el uso de guantes y el descarte de todos los materiales que entren en contacto con estos, como puntas de pipetas automáticas y guantes, en bolsas específicas para desechar material biológico. El lavado de los equipos electroforéticos se debe hacer con abundante agua.

5.1.2.1.1. Preparación de soluciones

Es conveniente preparar soluciones más concentradas para tener reserva en el laboratorio (soluciones madre). En el momento de utilizarlas, se deben diluir hasta alcanzar la concentración que se necesita.

El buffer de la muestra se prepara 6×, por lo que en el momento de utilizar la solución se debe considerar diluirla por un factor de 6. Para preparar buffer de la muestra 6× de reserva, hay que colocar los componentes según la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Componentes para agregar para preparar buffer de la muestra 6×

Componente	Concentración final
EDTA pH 8	10 mM
Glicerol	30 % (v/v)
Azul de bromofenol (mg)	0,25 % (m/v)
Agua destilada	Cantidad suficiente

Para preparar 1 litro de solución de corrida TBE 10× (tris-acetato-EDTA), se debe colocar las siguientes cantidades y, posteriormente, llevar a 1 litro con probeta los siguiente reactivos:

1) tris base: 48,4 g;
2) ácido acético glacial: 11,4 mL;
3) EDTA (pH 8,0; 0,5 M): 20 mL.

5.1.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La poliacrilamida es un soporte formado por la polimerización de la acrilamida con la N,N´-metilenbisacrilamida, es químicamente inerte, de propiedades uniformes. Forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además, tiene la ventaja de que, variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. Este tipo de geles se puede realizar en condiciones nativas (sin agente desnaturalizante de proteínas) o en condiciones desnaturalizantes (incluyendo un detergente). La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE) es el método más utilizado para separar proteínas y fragmentos pequeños de ADN. El SDS desnaturaliza la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, y se une en una relación relativamente constante a la proteína (1,4 g de SDS por gramo de proteína, o una molécula de SDS cada dos aminoácidos). La gran carga negativa del SDS apantalla la carga de la proteína y genera una relación masa/carga eléctrica homogénea. Como consecuencia, las proteínas se separan de acuerdo a sus masas moleculares, sin que el pI o la conformación de la proteína influyan en la migración.

La tabla 5.3 muestra una guía de relación de porcentaje de acrilamida con el rango de peso molecular de separación de las proteínas.

Tabla 5.3. Rangos de peso molecular de separación de proteínas según el porcentaje de acrilamida utilizado en el gel

Concentración de acrilamida (% m/v)	Peso molecular de la proteína (kDa)
3-5	>100
5-12	20-150
10-15	10-80
>15	<45

Las electroforesis SDS-PAGE se pueden realizar en condiciones no reductoras o reductoras, en estas últimas se agrega a la muestra un agente reductor como el β-mercaptoetanol (β-ME) o el DTT (ditiotreitol). Estos compuestos reducen los enlaces disulfuro de las proteínas. Recordemos que estos enlaces covalentes están presentes en algunas proteínas y normalmente estabilizan la conformación terciaria o cuaternaria. En la figura 5.4 se ilustran los cambios que sufre la estructura de las proteínas en las diferentes condiciones de electroforesis.

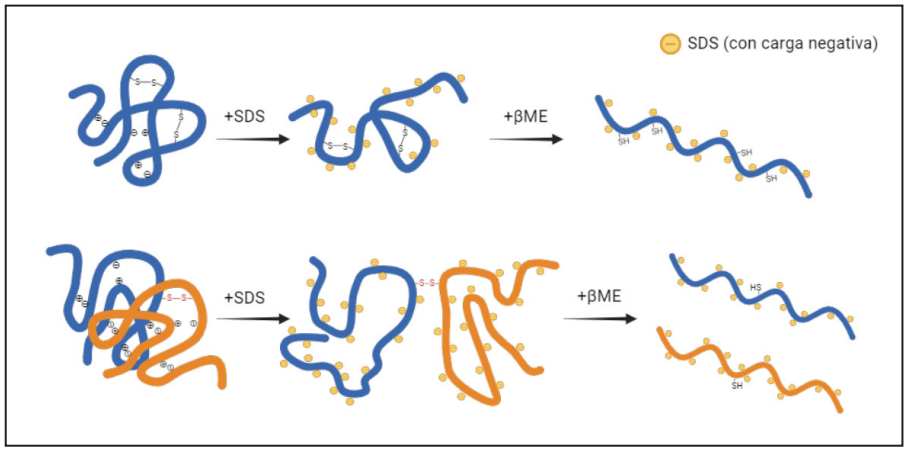


Figura 5.4. Efectos del tratamiento con un detergente aniónico (SDS) y un agente reductor (β-mercaptoetanol, β-ME) en la estructura tridimensional de las proteínas. El detergente desestabiliza la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína al romper las interacciones débiles, mientras que el agente reductor reduce el enlace disulfuro formado entre cisteínas de la proteína. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

A continuación, se describen protocolos para los diferentes pasos de una electroforesis de acrilamida, que se presentan de manera esquemática en la figura 5.3.

5.1.2.2.1. Protocolo para el armado de geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida tienen dos sectores, un sector concentrador y un sector de separación. El sector concentrador (también llamado gel concentrador) se encuentra al principio del gel y cumple la función de concentrar las proteínas de la muestra para que ingresen al sector separador como una sola banda. En el sector de separación (también llamado gel de separación), que es la mayor parte del gel, las proteínas se separan según su tamaño. El porcentaje de concentración de acrilamida de la parte separativa es el que se elige según la tabla 5.3, teniendo en cuenta las características de las proteínas de la muestra. En el laboratorio se estila preparar soluciones concentradas de reserva para preparar luego los geles a los diferentes porcentajes. En la tabla 5.4 se especifican los volúmenes de las soluciones que deben combinarse para lograr geles de separación de distinto porcentaje de acrilamida a partir de soluciones más concentradas (soluciones madre). En el caso del gel concentrador, se suele emplear uno con bajo porcentaje de poliacrilamida, esto facilita que las proteínas migren a través de este gel hacia el gel de separación, que tiene una concentración mayor, lo que resulta en la concentración de todas las proteínas en una única banda. En la tabla 5.5 se especifican los volúmenes de las soluciones que deben combinarse para lograr 10mL del gel concentrador 5% de poliacrilamida.

Preparación de soluciones de reserva (soluciones madre) para preparar los geles de poliacrilamida:

a) Solución madre de acrilamida 30 %. Se prepara con 1g acrilamida y 0,9g N,N´-metilenbisacrilamida. Se disuelve en 60 mL de agua destilada. Completar a 100 mL con agua destilada. Filtrar con papel de filtro Whatman n.º 1. Almacenar en botella de color ámbar a 4°C. La solución de acrilamida utilizada para el gel es neurotóxica y debe ser manejada con guantes para evitar su contacto directo con la piel.
b) Solución amortiguadora Tris-HCl 1,8 M, pH 8,8. Se prepara con 56,8 g de Tris, el cual se disuelve en 150 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl a 8,8. Llevar a 250 mL con agua destilada.
c) Solución amortiguadora Tris-HCl 1,25 M, pH 6,8. Se prepara con 37,8g de Tris, el cual se disuelve en 150 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl a 6,8. Llevar a 250 mL con agua destilada.
d) Solución de persulfato de amonio (PSA) al 10%. Se prepara con 10 gramos en 100 mL de agua destilada.
e) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%. Se prepara con 10 gramos en 100 mL de agua destilada.

Tabla 5.4. Volúmenes de las soluciones que deben combinarse para lograr geles de separación de distinto porcentaje de acrilamida para un volumen final de 10 mL

	Volumen (mL)				
	6%	8%	10%	12%	15%
Agua	5,3	4,6	4,0	3,3	2,3
Acrilamida	2,0	2,7	3,3	4,0	5,0
Tris 1,5 M, pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS 10 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PSA 10 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,008	0,006	0,004	0,004	0,004

Tabla 5.5. Volúmenes de las soluciones que deben combinarse para lograr geles de concentración de 5 % de acrilamida para un volumen final de 10 mL

	Volumen (mL)
Agua	6,8
Acrilamida	1,7
Tris 1 M, pH 6,8	1,25
SDS 10 %	0,1
PSA 10 %	0,1
TEMED	0,01

5.1.2.2.2. Preparación de muestras para análisis por electroforesis

Las muestras se deben preparar en una solución amortiguadora (buffer de la muestra) que contiene glicerol, para aumentar la densidad, y azul de bromofenol, que es una molécula coloreada pequeña que permite ir observando el frente de la corrida. En caso de geles desnaturalizantes, el buffer de la muestra contiene SDS. Además, se puede realizar la corrida electroforética en condiciones no reductoras o reductoras, en este último caso se agrega β-mercaptoetanol al buffer de muestra. En la tabla 5.6 se muestran los componentes del buffer de la muestra para un gel nativo (sin SDS) o desnaturalizante (con SDS). Como se observa en la tabla, este buffer se prepara 4 veces más concentrado (4×) que lo que se utiliza al preparar la muestra de electroforesis. Por lo que, cuando se preparan las muestras para correr el gel, se debe agregar un volumen de buffer de la muestra que sea ¼ del volumen total de muestra.

Tabla 5.6. Preparación del buffer de la muestra 4× para un gel nativo (sin SDS) o desnaturalizante (con SDS)

Componente	Gel nativo	Gel desnaturalizante no reductor	Gel desnaturalizante reductor
Tris-HCl pH 6,8 (mL)	2,5	2,5	2,5
Glicerol 87% (mL)	5,8	5,8	5,8
Azul de bromofenol (mg)	5	5	5
SDS (g)	–	1	1
β-mercaptoetanol (mL)	–	–	2,5
Agua (mL)	16,7	15,7	13,2

5.1.2.2.3. Preparación de solución amortiguadora de corrida

Todas las electroforesis se realizan con el soporte poroso (gel) sumergido en una solución amortiguadora de corrida. Esta solución cumple varias funciones: mantiene el pH y la fuerza iónica constante y permite el establecimiento del campo eléctrico y el movimiento de las proteínas a través del gel.

La solución amortiguadora de corrida o de electrodo más utilizada en las electroforesis de acrilamida es el amortiguador Tris-glicina pH 8,3; en la tabla 5.7 se muestran los componentes.

Tabla 5.7. Componentes del amortiguador de corrida Tris-glicina pH 8,3 (10×) para geles nativos y desnaturalizantes.
Se realiza una dilución 1/10 antes de utilizarlo.

Componente	Gel nativo	Gel desnaturalizante
Glicina (g)	144,2	144,2
Tris base (g)	30,3	30,3
SDS (g)	–	10
Agua (mL)	1000	1000

5.1.2.2.4. Protocolo de corrida

Se puede fijar el voltaje o el amperaje de corrida de la electroforesis al configurar la fuente de poder. De forma genérica, la corrida electroforética se fija entre 20 y 25 amperios por gel de corrida, o se puede fijar entre 100 y 120 voltios (V). Se puede correr en cámara fría (4°C), evitando que el gel se sobrecaliente y las proteínas no migren de forma pareja.

5.1.2.2.5. Tinción de las proteínas

Después de realizar la corrida electroforética es necesario utilizar soluciones que permitan visualizar las proteínas. El gel se desmonta del sistema de corrida y se coloca en

soluciones de tinción. Se puede teñir directamente con una solución de Coomassie Blue o con una solución de tinción con plata. También se puede usar el gel para la técnica western blot que se explica en la sección 5.2, «Western blot (WB)».

En la tabla 5.8 se muestra cómo preparar los reactivos de la solución de Coomassie Blue y la solución de Destain. Se debe dejar el gel en Coomassie entre 20 y 30 minutos, y posteriormente dejar en solución Destain hasta lograr ver las bandas de las proteínas.

Tabla 5.8. Soluciones para preparar tinción de Coomassie Blue

Solución Destain	**Componente**	**Volumen (mL)**
	Etanol	450
	Ácido acético	100
	Agua	450
Solución Coomassie Blue	**Componente**	
	Solución Destain (mL)	100
	Coomassie Blue G-250 (g)	0,5

5.2. Western blot (WB)

5.2.1. Introducción

El western blot (WB) o inmuno-blot es una técnica analítica que permite detectar proteínas específicas dentro de un extracto proteico mediante el uso de anticuerpos que reconocen específicamente nuestra proteína de interés. El extracto proteico para analizar se puede obtener a partir de un homogeneizado de tejido o células, así como de una muestra de proteína purificada. Es decir, esta técnica nos permite detectar una proteína específica dentro de una mezcla. Los anticuerpos utilizados generalmente se encuentran marcados con un marcador fluorescente o con un isótopo radioactivo, lo cual facilita su detección.

El WB se realiza luego de la separación de la mezcla de proteínas que se quiere estudiar por electroforesis y su transferencia a una membrana de nitrocelulosa que une las proteínas. La transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana se realiza por movimiento de las proteínas en un campo eléctrico en una cuba de transferencia; en la figura 5.5 se esquematiza el armado de la transferencia. Transcurrido el tiempo de transferencia, la membrana se coloca en una solución de bloqueo que permite bloquear los espacios de la membrana que no estén ocupados por las proteínas de la muestra. Luego, se incuba la membrana con el anticuerpo específico (anticuerpo primario). El exceso de anticuerpo, que no se unió específicamente a la proteína de interés, se elimina mediante lavados con una solución amortiguadora que contiene detergente no iónico. Para detectar la unión del anticuerpo a la proteína se utiliza otro anticuerpo (denominado anticuerpo secundario) que reconoce de manera genérica los anticuerpos. El anticuerpo secundario normalmente

está conjugado con un fluoróforo o una enzima que permite su detección. Si la proteína de interés se encuentra en el extracto analizado, al revelar el western-blot se observará una señal.

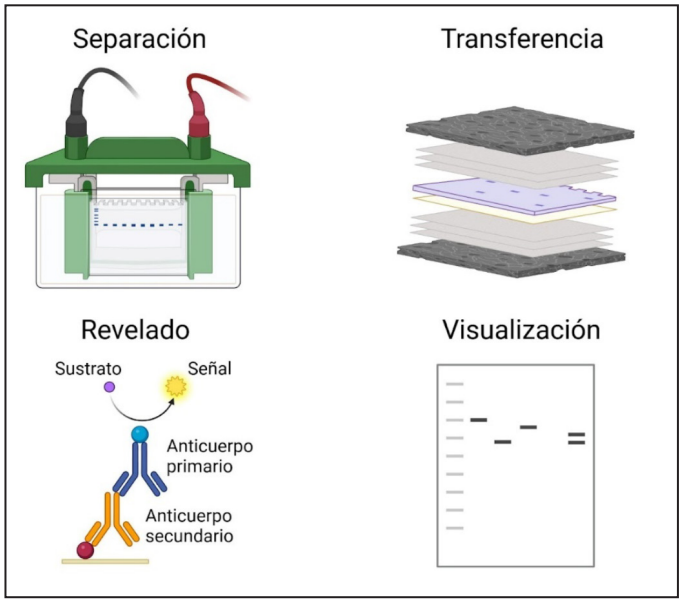


Figura 5.5. Esquematización de los pasos del WB. 1. Separación de las proteínas presentes en las muestras por electroforesis. 2. Transferencia de las proteínas en el gel a la membrana de nitrocelulosa. 3. Revelado de las proteínas de interés identificadas por el anticuerpo primario, que es reconocido por el anticuerpo secundario, que tiene unida una enzima y cataliza un sustrato que genera una señal, o directamente el anticuerpo secundario tiene una señal fluorescente que se puede detectar. 4. Visualización de la señal.
(Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

5.2.2. Procedimiento experimental

A) *Soluciones para preparar*

Preparación de soluciones para realizar la transferencia y posteriores incubaciones de la membrana:

a) Solución de transferencia. Se prepara con 150 mL de solución de corrida de electroforesis 10×, más 300 mL de metanol y se completa con agua destilada hasta alcanzar 1,5 L.

b) Solución de bloqueo. La solución de bloqueo se puede preparar con 3% de leche en polvo o BSA en PBS 1×.

c) Solución de lavado. PBS Tween 0,05%. Para preparar 500mL de PBS pesar 4g de cloruro de sodio, 0,1g de cloruro de potasio, 0,72g de fosfato sódico dibásico y 0,1225g de fosfato sódico monobásico. Agregar 0,05% de Tween al PBS.

B) *Pasos para realizar la transferencia y las posteriores incubaciones de la membrana*

1) Después de la corrida electroforética, realizar la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa, esta se realiza a 100 voltios por 1 hora a temperatura ambiente o a 20 voltios toda la noche a 4°C.

2) Luego de realizada la transferencia, bloquear la membrana con una solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación.

3) Realizar tres lavados con PBS Tween 0,05% de 10 minutos cada uno, en agitación.
4) Incubar la membrana con el anticuerpo primario preparado en PBS Tween 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4˚C en agitación.
5) Realizar tres lavados con PBS Tween 0,05% de 10 minutos cada uno, en agitación.
6) Incubar la membrana con el anticuerpo secundario preparado en PBS tween 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4˚C en agitación.
7) Realizar tres lavados con PBS Tween 0,05% de 10 minutos cada uno, en agitación.
8) Realizar el revelado según corresponda. En caso de utilizar un anticuerpo conjugado con fluoróforo, se escanea directamente. En caso de utilizar un anticuerpo conjugado a una enzima, se incuba con los sustratos de revelado y posteriormente se hace el revelado.

5.3. Cromatografía

La cromatografía es un técnica que permite la separación y purificación de los compuestos de una muestra mediante su movimiento a través de un soporte por aplicación de un flujo de disolvente (líquido o gas). Esto produce una separación diferencial de las moléculas de la muestra según su afinidad por la fase estacionaria, por la fase móvil o por ambas. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas se distingue una fase móvil que consiste en un líquido o gas que arrastra la muestra a través de una fase estacionaria, que consiste en un sólido o un líquido retenido en el soporte. En general, las técnicas cromatográficas suponen colocar la muestra en la fase estacionaria para que luego la fase móvil fluya a través de esta, separando los componentes de la muestra.

De acuerdo a cómo se dispone la fase estacionaria, se distinguen dos tipos principales de cromatografías: plana y en columna.

5.3.1. Cromatografía plana

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria se sitúa en una placa plana y consiste en un soporte (vidrio, aluminio o plástico) que contiene una sustancia adsorbente como alúmina o sílice. La fase móvil es el disolvente que migra por capilaridad. El fenómeno de separación se basa en la diferencia entre el número y el tipo de interacciones que existen entre el compuesto y la fase móvil, y el compuesto y la fase estacionaria. Si en la muestra aplicada existe más de una molécula, se separarán debido a las diferentes interacciones que establecen. Dentro de los tipos de cromatografía plana más utilizados se encuentra la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*), que se muestra en la figura 5.6.

La TLC es una técnica analítica que se basa en fenómenos de adsorción y se utiliza para determinar la pureza de muestras y en la identificación primaria de compuestos cuando se compara con un patrón. Normalmente, se utilizan adsorbentes polares como fase estacionaria, por lo que la capacidad de la fase móvil para desplazar una cierta molécula de la fase estacionaria depende de la polaridad del compuesto, la cual determina la diferencia entre la afinidad por la fase estacionaria (polar) y la fase móvil (menos polar). En este caso, los compuestos más polares se desplazarán en mayor medida.

Para realizar una TLC, se coloca una pequeña cantidad de la muestra en un extremo de la placa con fase estacionaria. Luego, se coloca en una cámara donde se encuentra la fase móvil, que se desplaza por capilaridad a través de la fase estacionaria, causando el movimiento de los componentes de la muestra según su afinidad por la fase estacionaria y por la fase móvil. Cuando la fase móvil llega al final de la placa, esta se retira de la cámara y se seca. Los componentes de la muestra se observan mediante diferentes técnicas y se calcula el factor de retención (Rf):

$$Rf = \frac{distancia\ recorrida\ por\ el\ compuesto\ (d_{compuesto})}{distancia\ recorrida\ por\ el\ disolvente\ (d_{disolvente})} \qquad [5.1]$$

Este factor se utiliza para medir el movimiento de los compuestos a lo largo de la placa de TLC y su valor se encuentra siempre entre cero y uno. Cuanto mayor afinidad tenga un compuesto por la fase estacionaria, menor distancia podrá desplazarse y, por lo tanto, tendrá menor Rf. Por el contrario, si un compuesto tiene gran afinidad por la fase móvil, entonces se trasladará más distancia y tendrá mayor Rf.

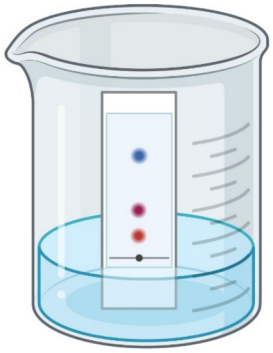


Figura 5.6. Cromatografía en capa fina (TLC). Se coloca la placa en un vaso que contiene solución de corrida. Se siembran las muestras en la línea base (en color negro en el esquema). Los diferentes componentes de la muestra van a migrar según su preferencia por la fase sólida o móvil. Los puntos con colores en el esquema simulan la migración de los diferentes componentes. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

5.3.2. Cromatografía en columna

En esta cromatografía la fase estacionaria se coloca en una columna a través de la que pasa la fase móvil, lo que hace que las moléculas presentes en la muestra se separen a lo largo de la columna. Hay múltiples tipos de cromatografía en columna que separan moléculas según diferentes propiedades, como tamaño, carga, hidrofobicidad o unión a ligandos. Cada uno de ellos utiliza distintos tipos de fase estacionaria. Dentro de las cromatografías más usadas se encuentran la de intercambio iónico, la de filtración en gel, la de afinidad, la hidrofóbica y la de fase reversa. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) es una de las más utilizadas en la actualidad.

Se denomina eluido a la sustancia o mezcla de sustancias que se separa de la fase estacionaria y es transportada por la fase móvil hacia la salida del sistema cromatográfico.

En palabras más sencillas, el eluido es lo que sale de la columna cromatográfica. La columna puede estar directamente conectada a un sistema de detección para su análisis. Los métodos de detección más utilizados son la medida de absorbancia por un espectrofotómetro, la intensidad de fluorescencia por un fluorímetro y las diferentes masas detectadas por un espectrómetro de masas. Por otra parte, se puede construir un cromatograma, que consiste en un gráfico de intensidad de la señal detectada en función del tiempo de retención en la columna (tiempo que tarda cada componente en pasar por la columna y llegar al detector) (figura 5.7). En este gráfico se pueden observar los picos obtenidos, cada uno corresponde a un componente de la mezcla estudiada. A mayor altura del pico, mayor es la concentración del componente en esa mezcla. No necesariamente un pico corresponde a una única molécula y es necesario recurrir a otras técnicas para verificarlo.

Cuando se utiliza la absorbancia, se suele fijar longitudes de onda en las que las proteínas de forma genérica absorban, por ejemplo, a 280 nm hay un pico característico de absorbancia de los aminoácidos aromáticos (ver sección 4.2.1) y a 190 nm absorben los enlaces peptídicos (enlace covalente que se establece entre cada aminoácido de una proteína o péptido). En el caso de proteínas coloreadas, como las hemoproteínas, se puede utilizar directamente la banda de Soret (en el entorno de 400nm).

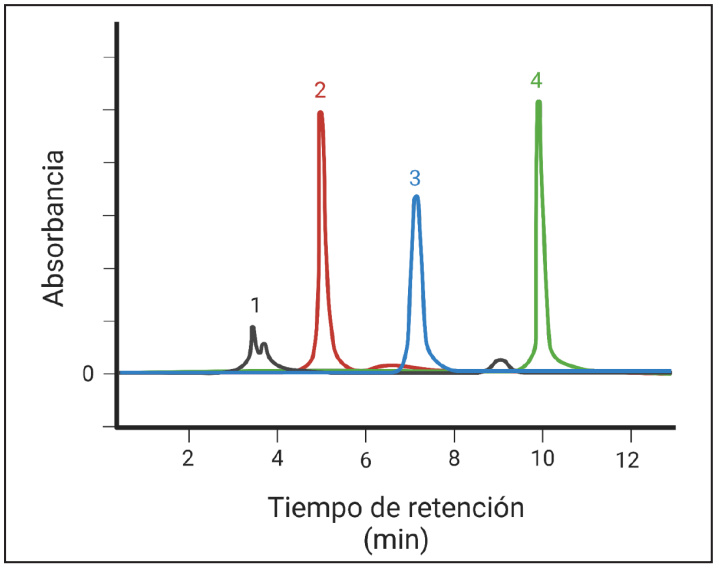


Figura 5.7. Cromatograma. Este gráfico representa la separación de los diferentes componentes de una muestra, mostrados como picos individuales en función del tiempo. En este ejemplo, el método de detección fue la espectrofotometría y, por lo tanto, es un gráfico de absorbancia en función del tiempo de retención de las diferentes muestras. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

5.3.2.1. Filtración en gel o exclusión molecular

La cromatografía de filtración en gel, también llamada cromatografía de exclusión molecular, separa las moléculas en virtud de su diferente peso molecular. Puede ser utilizada para purificación de proteínas o ADN, desalado, cambio de amortiguador, entre otras aplicaciones. Además, si se realiza una calibración utilizando proteínas estándares (de las que se conoce previamente su peso molecular), la cromatografía de filtración en gel

puede proporcionar información sobre el tamaño de una proteína de interés. La capacidad de separación reside en que la fase estacionaria está formada por gran número de esferas porosas microscópicas que retienen una cantidad de líquido al ser hidratadas (esto se conoce como matriz). Las moléculas se separan de acuerdo a su capacidad de entrar a los poros de las esferas del gel o quedar excluidas de las esferas. De acuerdo a este principio, las moléculas excluidas de la matriz (que son las de mayor tamaño) migran más rápido y las que tienen un tamaño suficiente para penetrar en los poros de la malla son retenidas y, por lo tanto, demoran más tiempo en eluir de la columna. Los poros de la fase estacionaria tienen distinto tamaño según la matriz utilizada.

La fase estacionaria más utilizada en la cromatografía de gel filtración es el Sephadex, que consiste en esferas de dextrano modificado que forman una malla o retículo con un alto contenido de grupos hidroxilo que le confiere gran capacidad de absorción de agua, lo que explica el aspecto de gel que adquiere luego de la hidratación. Al igual que otras matrices de cromatografía en gel filtración, los poros del Sephadex pueden tener diferente tamaño, lo que permite separar moléculas de diferente peso molecular. En el laboratorio se usan frecuentemente las columnas PD-10, que contienen Sephadex G-25 y permiten separar rápidamente proteínas de alto peso molecular de sustancias de bajo peso molecular, como sales y otras impurezas. Las moléculas de mayor tamaño no entran al poro de la matriz y, por lo tanto, son excluidas y eluidas primero. Las moléculas más pequeñas penetran en los poros y eluyen después que las moléculas más grandes.

El Sephadex, al igual que otras matrices para gel filtración, está diseñado con un rango de fraccionamiento que define el rango de pesos moleculares que tienen acceso parcial a los poros de la matriz. Moléculas con menor peso molecular que el rango serán completamente incluidas en la matriz y moléculas con pesos moleculares mayores que el rango serán completamente excluidas. Todas las moléculas que tengan un peso molecular mayor que el rango eluirán juntas en primer lugar, este tamaño se denomina límite de exclusión. Las moléculas con menor peso molecular tendrán acceso completo o parcial a los poros según su tamaño. Si una molécula tiene un peso molecular más pequeño que el límite menor del rango, tendrá acceso completo a los poros y se encontrará en el grupo de moléculas que eluyen al final de la cromatografía. En la tabla 5.9 se muestra el rango de fraccionamiento/límite de exclusión de los distintos tipos de Sephadex.

Tabla 5.9. Rango de fraccionamiento o límite de exclusión para los distintos tipos de matrices de Sephadex utilizadas en gel filtración

Tipo	Péptidos/Proteínas (Da)
G10	hasta 700
G15	hasta 1.500
G25	1.000–5.000
G50	1.500–30.000
G75	3.000–80.000
G100	4.000–150.000
G150	5.000–400.000
G200	5.000–800.000

5.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico

Este tipo de cromatografía se utiliza para separar biomoléculas según diferencias en las cargas. La separación se basa en la interacción reversible de las moléculas cargadas de una muestra con la fase estacionaria, también cargada. Las propiedades de carga de las diferentes biomoléculas pueden tener muchas variaciones respecto a la carga total, la densidad de carga y la distribución de cargas en la superficie, por lo que exhiben diferentes grados de interacción con la fase estacionaria. En esta cromatografía es de suma importancia la elección del pH de la solución amortiguadora ya que, como vimos, el pH determina la carga neta de las proteínas y otras biomoléculas.

Para realizar una cromatografía de intercambio iónico, se siembra la muestra a una columna con la matriz seleccionada, permitiendo las interacciones. Luego se alteran las condiciones, aumentando la fuerza iónica (los iones interfieren en la interacción proteína-matriz) o cambiando el pH. Esto hace que las proteínas unidas a la matriz se liberen de manera diferencial según sus propiedades electrostáticas. Las fases estacionarias de este tipo de cromatografía se denominan intercambiadores aniónicos si tienen carga positiva e intercambiadores catiónicos si tienen carga negativa.

5.3.2.3. Cromatografía de afinidad

Este tipo de cromatografía se basa en interacciones específicas entre cierta(s) proteína(s) y un grupo químico particular que se encuentra unido covalentemente a la fase estacionaria. Las proteínas que tengan afinidad por este grupo se unirán a la fase estacionaria retardando su migración por la columna, se consigue así la separación de las proteínas que no se unen. Una vez que se han establecido las interacciones específicas proteína-grupo químico y se ha lavado la columna de proteínas no unidas, se debe eluir la proteína de interés mediante cambio en las condiciones de la cromatografía, por ejemplo, variando el pH o la fuerza iónica.

Muchas proteínas se unen a ligandos con gran afinidad y de forma específica, por lo que esta técnica puede permitir la purificación con alta selectividad de una proteína de interés. La cromatografía de afinidad es la única técnica cromatográfica que permite la purificación de una molécula con base en su función biológica o estructura química específica.

Esta técnica se puede utilizar, por ejemplo, para purificar anticuerpos, uniendo a la fase estacionaria el antígeno específico o proteína G/A, que tienen gran afinidad por la porción constante que no se une a antígeno (FC, del inglés *Fragment Crystallizable*) de los anticuerpos del tipo G (IgG). Esta última opción separa todas las IgG presentes en una muestra compleja, a diferencia de la primera opción que aislará un determinado subtipo de anticuerpo que reconoce al antígeno.

Otro ejemplo es la unión de lectinas (proteínas de unión a glúcidos) a la fase estacionaria para la purificación de glicoproteínas.

5.3.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es una modernización de los métodos cromatográficos que utiliza bombas de alta presión para aumentar la velocidad de migración de las moléculas a través de columnas con fase estacionaria. Esto permite una gran resolución en la separación de las distintas moléculas presentes en la mezcla analizada, así como menores tiempos. En HPLC la separación puede estar basada en cualquiera de

las técnicas cromatográficas descritas en este capítulo. En la figura 5.8 se esquematiza un equipo de HPLC donde las bombas toman solución de los diferentes recipientes y permiten un flujo a determinada velocidad de la fase móvil a través de la columna. El eluido pasa directamente al detector.

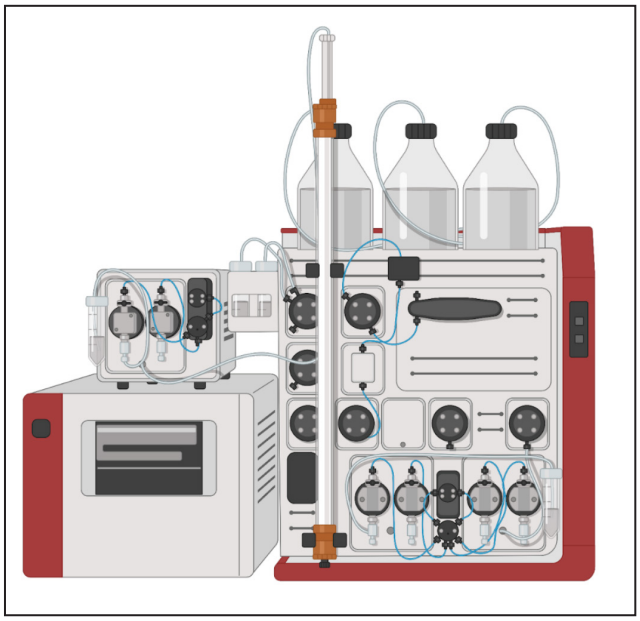


Figura 5.8. Representación de un equipo de HPLC. La columna está conectada a un sistema de bombas que bombean a la fase móvil (soluciones amortiguadoras o solventes orgánicos) por la columna. La muestra inyectada en la columna pasa a través de ella y sus diferentes componentes se van separando según sus propiedades y la propiedades de la fase móvil y la fase sólida. A medida que va saliendo solución por la columna (eluido) pasa por un detector y se genera un cromatograma. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

5.4. Ejercicios de rutina de laboratorio

El objetivo de esta sección es ayudar al estudiantado a comprender y diseñar métodos de separación según la complejidad y composición de la muestra, y a interpretar los resultados correspondientes.

Se abordará este tema a través de ejercicios en los que se aplican los conceptos teóricos fundamentales. De esta forma, se busca que cada estudiante realice los procedimientos intelectuales y utilice los conceptos teóricos necesarios para lograr seleccionar una técnica separativa apropiada para los objetivos planteados.

5.4.1. Electroforesis de aminoácidos

Indique hacia qué polo migrarán los siguientes aminoácidos en una corrida electroforética de papel a pH 6.

Aminoácido	pK_{a1}	pK_{a2}	pKR
Valina	2,32	9,62	-
Alanina	2,34	9,69	-
Glutamato	2,32	9,62	4,25
Serina	2,21	9,15	-
Lisina	2,18	8,95	10,53

Resolución

En la electroforesis en papel los aminoácidos migran según la carga neta. Por ser moléculas con propiedades ácido-base, la carga de los aminoácidos depende del pH del medio. Se debe comparar el pH con el pI de cada aminoácido. Si el pH del medio es igual al pI, la carga neta del aminoácido es 0. Si el pH del medio es mayor al pI, el aminoácido estará cargado negativamente, y si el pH del medio es menor al pI, el aminoácido estará cargado positivamente.

Por lo tanto, para resolver este problema, en primer lugar debemos calcular el pI de cada aminoácido. En la tabla 5.10 se muestran los valores de pI para cada uno de los aminoácidos, su carga neta a pH 6 y el polo hacia el cual migran en estas condiciones.

Tabla 5.10

Aminoácido	pI	Carga neta a pH 6	Migración
Valina	6	0	Permanece en origen
Alanina	6	0	Permanece en origen
Glutamato	3,3	-	Hacia polo positivo
Serina	5,7	0	Permanece en origen
Lisina	9,7	+	Hacia polo negativo

5.4.2. Análisis de una electroforesis desnaturalizante

Dibujar en el gel de acrilamida de la figura 5.9 el resultado que se espera obtener al realizar un SDS-PAGE de una muestra de un anticuerpo. En la figura se esquematiza un anticuerpo, proteína que está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas por enlaces disulfuros. Las cadenas polipeptídicas pequeñas son idénticas entre sí y las cadenas polipeptídicas mayores son idénticas entre sí. La muestra

se corrió en condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol, +β-ME) y en condiciones no reductoras (-β-ME).

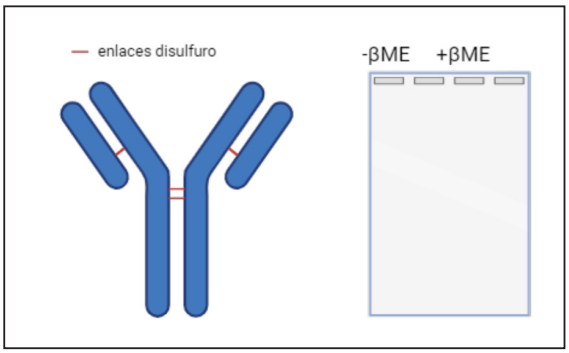


Figura 5.9

Resolución

Como se observa en el esquema de la estructura de la proteína, esta está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de menor tamaño e iguales entre sí (en azul en la figura 5.10) y dos de mayor tamaño e iguales entre sí (en rojo en la figura 5.10). Las cadenas polipeptídicas están unidas entre sí por enlaces disulfuro, que son enlaces covalentes entre el grupo SH de dos residuos de cisteína. Este enlace no se altera por la presencia de SDS, pero sí puede ser reducido por un agente reductor como el DTT o el β-mercaptoetanol que se nombra en el ejercicio.

Entonces, cuando analizamos esta proteína por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, todas las cadenas polipeptídicas migran unidas por los enlaces disulfuro y en la electroforesis se observa una sola banda de alto peso molecular. Por otro lado, si analizamos esta proteína por SDS-PAGE en condiciones reductoras, el β-mercaptoetanol presente en la muestra reduce los enlaces disulfuro y separa las diferentes cadenas polipeptídicas, que migrarán independientemente. Por esto, en la electroforesis observaremos dos bandas, una con menor migración, correspondiente a las cadenas polipeptídicas de mayor tamaño, y otra que migra más, correspondiente a las cadenas polipeptídicas de menor tamaño. Es preciso notar que, aunque tenemos 4 cadenas polipeptídicas, se obtienen solo 2 bandas, ya que las cadenas polipeptídicas pequeñas son idénticas entre sí y las cadenas polipeptídicas mayores son idénticas entre sí.

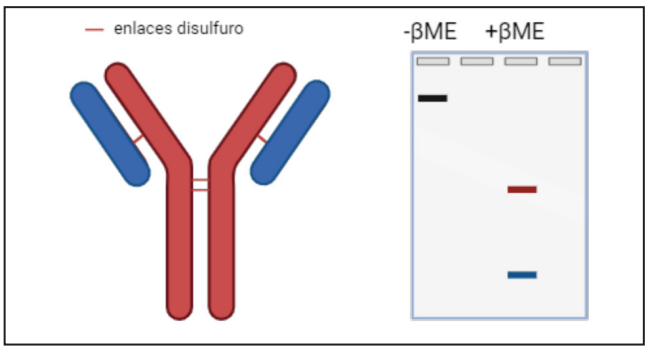


Figura 5.10

5.4.3. Análisis de muestras por western blot

Se hace una purificación de mitocondria y citosol a partir de músculo e hígado de vaca. Con el fin de comprobar la pureza de la purificación se realiza un western blot utilizando anticuerpos: anti-β actina como marcador del citosol y anti-citocromo c como marcador de mitocondria.

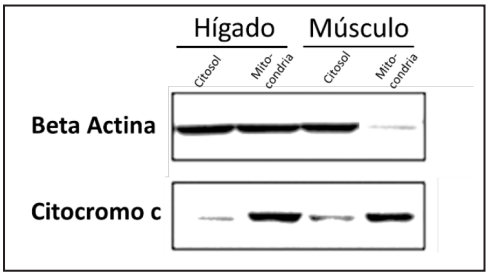


Figura 5.11. Resultados de western blot de muestras de fracciones enriquecidas de citosol y mitocondrias de músculo e hígado de vaca. Los anticuerpos utilizados corresponden a beta actina y citocromo c.

Analizar lo sucedido en cuanto a la pureza de las mitocondrias y del citosol obtenidos para los distintos tejidos.

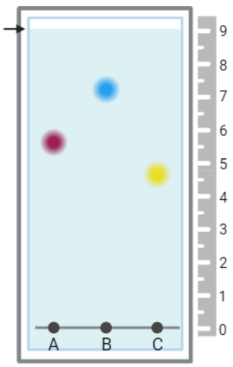
Resolución

Se espera que las muestras purificadas de citosol tengan β actina (proteína presente en el citosol de forma constitutiva), pero no citocromo c (proteína presente en las mitocondrias). La presencia de citocromo c indica que la muestra está contaminada con mitocondria. En el western blot se puede observar que la purificación del citosol para las muestras de los tejidos de hígado y músculo contiene la β actina presente y no se observa banda correspondiente al citocromo c, lo que indica que la pureza de la purificación del citosol es correcta para ambos tejidos.

Se espera que las muestras correspondientes a la purificación de las mitocondrias presenten citocromo c, pero no β actina. Se observa que para las muestras de músculo eso es así, es decir, hay una banda correspondiente al citocromo c, pero no a la β actina. Sin embargo, la purificación de las mitocondrias de hígado está contaminada, ya que se observa, además de la banda correspondiente al citocromo c, una banda correspondiente a la β actina, lo que indica que la purificación no salió correctamente, dado que hay proteína citosólica en ella.

5.4.4. Resultado de una cromatografía de capa fina (TLC)

En la figura 5.12 se observa un esquema de un resultado de una TLC. Completar la tabla y calcular el Rf de los compuestos analizados. La flecha señala la distancia recorrida por la fase móvil.



Compuesto	$d_{disolvente}$	$d_{molécula}$	Rf
A			
B			
C			

Figura 5.12

Teniendo en cuenta que la fase estacionaria tiene mayor polaridad que la fase móvil, ¿cuál de las 3 moléculas analizadas tiene mayor número de grupos polares en su estructura?

Resolución

Para determinar el Rf se debe medir la distancia que migró la fase móvil ($d_{disolvente}$) y la distancia que midió cada compuesto ($d_{compuesto}$) mediante la regla que se muestra junto con la TLC. Luego se realiza la división de ($d_{compuesto}/d_{disolvente}$) y se obtiene el Rf. Notar que $d_{disolvente}$ tiene el mismo valor para todos los compuestos ya que se analizaron en la misma corrida de TLC.

Compuesto	$d_{disolvente}$	$d_{compuesto}$	Rf
A	9	5,5	0,61
B	9	7,3	0,81
C	9	4,7	0,52

Observando la distancia que migró cada compuesto o su Rf (mayor Rf significa mayor distancia recorrida por el compuesto) podemos comparar las polaridades de los compuestos analizados en esta cromatografía. Teniendo en cuenta que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, los compuestos con mayor cantidad de grupos polares, es decir, con mayor capacidad de interacción con la fase estacionaria, serán retenidos en mayor medida, lo cual no favorece su migración con la fase móvil. Por otra parte, los compuestos con menor polaridad serán retenidos en menor medida y migrarán una distancia mayor, trasladados por la fase móvil. Por lo tanto, podemos inferir que el compuesto C es el que tiene mayor contenido de grupos polares (que migran menos).

5.4.5. Técnicas cromatográficas

Señalar cuál de las técnicas cromatográficas descritas en este manual es apropiada para separar las siguientes mezclas de compuestos. Justificar.

a) Proteína X (40 kDa, pI = 5) con colorante G (2000 Da)

b) Proteína Z (68 kDa pI = 4) con proteína U (64 KDa, pI = 9)

Resolución

a) En este ejemplo se busca separar dos moléculas que tienen una diferencia muy grande en su tamaño, la proteína X tiene un peso molecular de 40 kDa (40 000 Da) y el colorante G tiene un peso molecular de 2000 Da. Por lo que debemos buscar una técnica que esté basada en diferencias en el peso molecular. Para este tipo de muestras, que tienen proteínas y un compuesto de bajo peso molecular, la cromatografía de filtración en gel es la opción más adecuada; además, permite obtener los compuestos separados entre sí y sin modificar. Teniendo en cuenta la descripción de esta técnica, debemos usar una fase estacionaria de G25 (rango de separación 1000-5000 Da, límite de exclusión 5000 Da). Al separar esta muestra mediante filtración en gel, vamos a obtener una primera fracción enriquecida en la proteína X y una segunda fracción enriquecida en el colorante G.

b) Las proteínas que se quieren separar en este ejemplo se diferencian tanto en su peso molecular como en su pI. La separación basada en su peso molecular requerirá columnas de filtración en gel largas ya que estos son distintos, pero muy cercanos, lo que puede complicar la realización de la técnica porque se necesitan columnas especiales, así como presiones altas que pueden no estar disponibles. Por otro lado, la diferencia entre los pI es más significativa, por lo que la separación basada en esta propiedad puede ser más sencilla. Los diferentes pI de estas proteínas nos muestran que habrá valores de pH en los que una proteína esté cargada negativamente y la otra positivamente. Hay que recordar que a pH menores al pI la proteína tendrá carga positiva y a pH mayores al pI tendrá carga negativa. Por lo tanto, podemos elegir un pH al cual las proteínas tengan diferente carga y realizar una cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, a pH 7, la proteína Z tendrá carga neta negativa y la proteína U carga positiva. Entonces, podremos utilizar una fase estacionaria de intercambio catiónico que unirá la proteína U, reteniéndola. La proteína Z no se une a esta fase estacionaria y, por lo tanto, eluye en primer lugar. Luego, podemos cambiar el pH o la fuerza iónica para eluir la proteína U.

5.5. Actividades experimentales

En esta sección se describe una actividad experimental que tiene como objetivo de aprendizaje la realización de una caracterización utilizando la electroforesis como método de separación. El estudiante debe unir los conceptos teóricos sobre las proteínas con lo aprendido en este capítulo para caracterizar el objeto de estudio.

La actividad experimental consta de un procedimiento paso a paso que busca que el estudiantado conozca una forma de proceder para resolver un problema experimental utilizando esta metodología.

5.5.1. Estudio de la hemoglobina

Objetivo

Caracterización electroforética de distintas hemoglobinas.

Introducción

Las hemoglobinas son proteínas globulares presentes en altas concentraciones en los eritrocitos, que a nivel de los alvéolos pulmonares fijan oxígeno (O_2) y lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Existen 4 cadenas polipeptídicas de la hemoglobina (denominadas globinas): α, β, δ y γ. Las cadenas polipeptídicas α contienen 141 aminoácidos, las no α contienen 146 y difieren en la secuencia de aminoácidos.

Más del 95% de la hemoglobina (Hb) del adulto y de los niños mayores de 7 meses es A (HbA). Su estructura se designa como $\alpha_2\beta_2$ para indicar que posee dos cadenas α y dos cadenas β. Los adultos sanos también tienen un 2-3% de HbA_2, que está compuesta por dos cadenas α, como las de la HbA, y dos cadenas δ, se representa como α2δ2. Las cadenas δ son diferentes de las cadenas β. La Hb fetal (HbF) es el componente principal de la Hb del recién nacido. Posee dos cadenas γ en lugar de dos cadenas β, y se representa como $\alpha_2\gamma_2$. La HbF está adaptada al ambiente materno-fetal y debe fijar el O_2 mucho más fuerte para competir por el O_2 con la HbA materna.

Procedimiento experimental

La caracterización electroforética de las diferentes hemoglobinas se realizará utilizando como soporte acetato de celulosa. Esto permitirá ver diferencias en la migración de las moléculas de hemoglobina basadas en su carga.

Muestras para estudiar:
Hemoglobina adulta (normal)
Hemoglobina S (paciente con anemia falciforme)
Hemoglobina fetal

1) Preparar la solución amortiguadora de corrida TBE 1× (tris-borato-EDTA) a pH 8,9 a partir de una solución 10× previamente preparada como se señala a continuación: pesar 108 gramos de Tris y 55 gramos de ácido bórico; agregar 750 mL de agua destilada y disolver; agregar a la preparación 40 mL de EDTA disódico 0,5 M (7,5 gramos) y llevar a 1 litro utilizando una probeta.

2) Colocar las tiras de acetato de celulosa en la solución amortiguadora de corrida para quitar el metanol en el que se conservan. Secar bien las tiras de acetato de celulosa con papel de filtro antes de montarlas en la cuba.

3) Montar las tiras de acetato de celulosa en la cuba de electroforesis con la superficie absorbente hacia arriba (cara mate no brillante) y con los extremos tocando la solución amortiguadora de corrida. Realizar un corte diagonal de referencia en la tira en el ángulo inferior derecho.

4) Sembrar las muestras a 2 cm del polo negativo (cátodo). Cerrar la cuba de electroforesis en forma hermética.

5) Correr las muestras a 200V por 45 minutos para la hemoglobina. La hemoglobina es coloreada, por lo que se podrá seguir la electroforesis sin necesidad de agregar ningún colorante para visualizar las proteínas.

Análisis de los resultados

¿Cuál es la principal diferencia entre la hemoglobina A (adulto normal) y la hemoglobina S? ¿Por qué sería útil la determinación electroforética? ¿Cuál es la diferencia entre la hemoglobina adulta y la fetal?

Bibliografía

Álvarez de Cienfuegos Rodríguez, A., y Tevar Sánchez, M. I. (2017). Electroforesis de proteínas plasmáticas: proteinograma. *Revista de la SVR, 7*(1), 5-7.

Walls, D., y Loughran, S. T. (Eds.) (2017). *Methods in Molecular Biology: Vol. 1485. Protein Chromatography: Methods and Protocols*. Humana Press. doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3

Irvine, G. B. (2000). Determination of molecular size by size-exclusion chromatography (gel filtration). *Current protocols in cell biology, 6*(1), 5.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2019). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En *Principios de bioquímica* (5.ª ed., pp. 75-115). Omega.

Mahadevarao Premnath, S., y Zubair, M. (2024). Chromatography. *StatPearls*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599545/

Universidad de Alcalá. (s.f.). Simulador de electroforesis en acetato de celulosa. *Biomodel*. https://biomodel.uah.es/lab/acetato/

Voet, D., Voet, J. G., y Pratt, C. W. (2010). The amino acids of proteins. En *Biochemistry* (4.ª ed., pp. 1019-1087). John Wiley & Sons.

CAPÍTULO 6

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.1. Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico a partir de una pequeña cantidad de material de partida. La técnica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Se utiliza una ADN polimerasa particular, la Taq polimerasa, que no se desnaturaliza a altas temperaturas dado que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus,* que vive a altas temperaturas (79˚C a 85˚C).

Los cebadores, también conocidos como *primers,* son cortas secuencias de ADN o ARN que sirven como punto de inicio para la síntesis de una nueva cadena de ADN por la ADN polimerasa. Estas moléculas se diseñan específicamente para ser complementarias a regiones flanqueantes de la secuencia objetivo que se desea amplificar o copiar. La ADN polimerasa requiere de un extremo 3'OH libre para añadir nucleótidos y comenzar la síntesis. Los cebadores proporcionan este extremo 3'OH al unirse de manera específica y complementaria a la hebra de ADN. En el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan dos cebadores, un cebador directo *(forward primer),* que es complementario a una región de la hebra en sentido 5' a 3' y un cebador inverso *(reverse primer),* complementario a la hebra complementaria del ADN en sentido 3' a 5'. Estos cebadores definen el segmento de ADN que será amplificado y son esenciales para dirigir la especificidad y eficiencia de la reacción (figura 6.1).

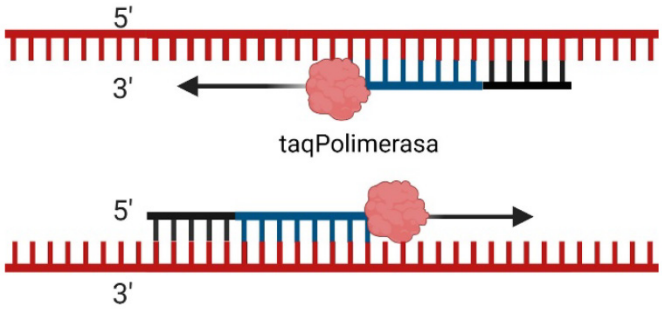


Figura 6.1. El ADN es copiado por la Taq polimerasa. La secuencia esquematizada en rojo corresponde al ADN. Las secuencias complementarias en negro corresponden a los oligonucleótidos (cebador) que limitan la región que se va a amplificar, en sentido directo o inverso. El amplicón está esquematizado en color azul. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

Es necesario diagramar el tubo de reacción al momento de planificar una PCR ya que implica varios componentes. En el tubo de reacción deben estar presentes los desoxinucleótidos adenina (dATP), timina (dTTP), citosina (dCTP) y guanina (dGTP), junto con el cebador directo y el cebador inverso específicos para la secuencia de ADN que se quiere replicar. Además, deben establecerse las condiciones óptimas para que la enzima funcione adecuadamente, incluyendo un pH específico (una solución amortiguadora), cantidades definidas de magnesio, necesario para el correcto funcionamiento de la ADN polimerasa, y, en algunos casos, otras sales o reactivos, dependiendo de la polimerasa utilizada.

La secuencia de ADN que ha sido amplificada se denomina amplicón. Luego de realizar una amplificación por PCR, normalmente se analiza el resultado con una electroforesis en gel de agarosa (ver sección 5.1.2.1). Esto permite conocer la especificidad de la reacción, observando si se obtienen bandas secundarias además de la correspondiente al producto principal de la amplificación. Por otro lado, se puede estimar la cantidad de producto obtenido por comparación con las bandas del marcador de peso molecular. Muchas veces también se puede cuantificar el ADN obtenido y caracterizarlo por otras técnicas, como la secuenciación.

La amplificación por PCR es una herramienta relevante para una gran variedad de aplicaciones. En la clínica, se utiliza para el diagnóstico de enfermedades infecciosas mediante la detección del ADN de patógenos en muestras de pacientes. También se puede usar para estudiar la presencia de mutaciones que pueden llevar al desarrollo de una patología. En la medicina forense se usa para identificar el donador de una muestra biológica de interés, como sangre, pelo o semen. En estos casos, se utiliza el análisis de repetidos cortos en tándem (STR), que son segmentos de ADN que contienen secuencias de 2-7 pb que se repiten en un número variable de veces y están dispersas en el genoma humano. El número de repetidos en tándem en muchos STR varía genéticamente y es heredable, por lo que son un marcador genético de individualidad.

6.2. Procedimiento experimental

1) Diseñar los cebadores directo e inverso.

a) Se debe conocer el gen o fragmento de interés que se va a estudiar y seleccionar las regiones de interés. Por ejemplo, identificando en qué región se encuentra una mutación que se desea estudiar.

b) El cebador directo es complementario a la hebra directa en sentido 5' a 3', mientras que el cebador inverso es complementario a la hebra opuesta (la hebra antisentido) y se diseña en dirección opuesta, también en sentido 5' a 3'. Es importante que los cebadores cumplan ciertos criterios, como un tamaño de 18-25 nucleótidos, un contenido equilibrado de bases G y C (40-60 %) para asegurar estabilidad, temperaturas de anillamiento (Tm) similares entre ambos cebadores, y evitar secuencias con formación de dímeros o estructuras secundarias que puedan interferir con la amplificación.

2) Planificar el tubo de reacción.

3) Amplificación del fragmento de interés. La PCR se desarrolla en tres pasos, que se esquematizan en la figura 6.2, y para realizarla se utiliza un equipo denominado termociclador.

Paso 1. Desnaturalización. Separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar (desnaturalización del ADN). Para esto se debe calentar el tubo de reacción a una temperatura de 95-96 ˚C. Las monocadenas actuarán como molde para la Taq polimerasa.

Paso 2. Hibridación de las cadenas complementarias. Unión de los cebadores a la secuencia complementaria. Ocurre a 68˚C.

Paso 3. Elongación de la cadena. La generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la Taq polimerasa ocurre a 72 ˚C. En una PCR se consigue una amplificación de la muestra de 2^n, n es el número de ciclos de la reacción. El número de ciclos depende de cada PCR y es parte de lo que se debe poner a punto en el momento de realizar la técnica. Usualmente, se van a generar productos de amplificación hasta que alguno de los reactivos se agote, eso implica entre 30 y 35 ciclos de amplificación.

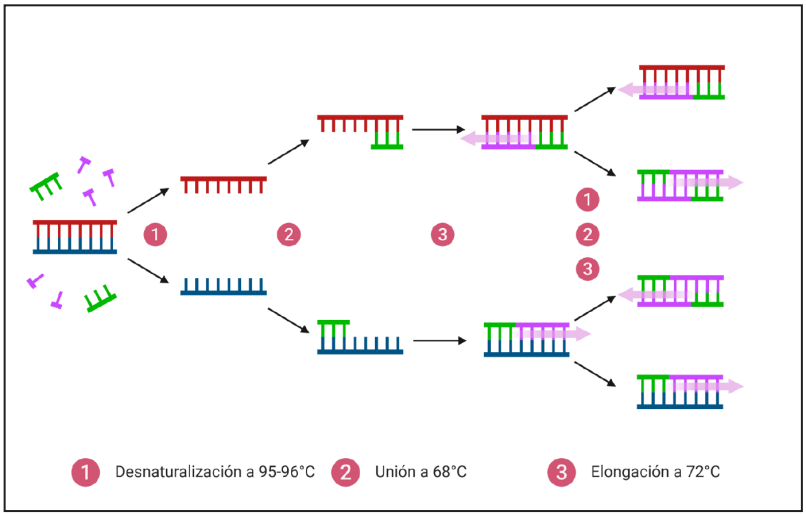


Figura 6.2. Esquema de reacción en cadena de la polimerasa. Se esquematizan los pasos que ocurren durante una PCR. Paso 1. Desnaturalización de la hebra de ADN a 95˚C. Paso 2. Hibridación de la hebra de ADN a 68˚C. Paso 3. Elongación de la cadena a 72˚C. (Este esquema fue creado usando el programa BioRender.)

Cuando se esté diseñando y poniendo a punto la técnica, es importante tener en cuenta lo siguiente:

a) Ajustar las temperaturas y los tiempos de cada paso considerando el diseño de los cebadores y la longitud de la región objetivo. Es necesario determinar la temperatura media de desnaturalización de los cebadores, al igual que la longitud, dado que los fragmentos más largos se deben dejar más tiempo para que la polimerasa pueda formar la cadena complementaria. Idealmente, el amplicón no debe superar los 1000pb, los fragmentos ideales tienen entre 100 y 500 pb.

b) Utilizar controles negativos (todo menos ADN) y positivos (con ADN de control) para asegurar la validez de los resultados.

c) Después de realizar la PCR se debe hacer una electroforesis en gel de agarosa sembrando la muestra y un marcador de peso molecular, así se visualizan los productos obtenidos y se confirma el producto de la PCR.

6.3. Ejercicios de rutina en el laboratorio

6.3.1. Diseño de cebadores

La PCR se puede utilizar para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, como la enfermedad de Chagas. Para esto se debe usar una secuencia conservada en el parásito causante de esta enfermedad *(Trypanosoma cruzi)* como la que se muestra a continuación.

5´-
GAGCTCTTGCCCACACGGGTGCTGCACTCGGCTGATCGTTTTCGAGCGGCTGCTGCATCACA
CGTTGTGGTCCAAATTTTTGTTTCCGATTGTGAATGGTGGGAGTCAGAGGCACTCTCTGTCAA
TATCTGTTTGCGTGTTCACACACTGGACACCAAACAACCCTGAACTATCCGCTGCTTGGAGG
AATTTCG-3´

a) Indicar qué cebador directo de los que se muestran a continuación podría utilizarse en una PCR para diagnóstico de infección por *Trypanosoma cruzi*.

1. 5´-CTCTTGCCCACACGGGTGCTGCA-3´
2. 5´-GAGAACGGGTGTGCCCACGA-3´
3. 5´--AAGGAGGTTCGTCGCCTATCA -3´
4. 5´-GAGAAC-3´

b) Diseñar un cebador inverso para esta PCR.

Resolución

El par de cebadores está compuesto por un *cebador directo* complementario a una de las hebras en sentido 5' a 3'. En general, este cebador *(primer foward)* se diseña con la misma secuencia que la hebra sentido, por lo que es complementario a la hebra antisentido. El *cebador inverso (primer reverse)* se diseña generando una secuencia reversa complementaria a la hebra sentido, por lo que es complementario a la hebra sentido. Es importante que los cebadores cumplan ciertos criterios, como un tamaño de 18-25 nucleótidos.

Como se observa a continuación, el cebador directo que cumple estas condiciones es el de la opción

5´GAGCTCTTGCCCACACGGGTGCTGCACTCGGCTGATCGTTTTCGAGCGG
CTGCTGCATCACACGTTGTGGTCCAAATTTTTGTTTCCGATTGTGAATGGTG
GGAGTCAGAGGCACTCTCTGTCAATATCTGTTTGCGTGTTCACACACTGGAC
ACCAAACAACCCTGAACTATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCG-3´

Un ejemplo de cebador inverso, secuencia reverso complementaria a la hebra proporcionada, es la siguiente: CTGCTGCATCACACGTTGTGG

6.3.2. Análisis de resultados de una PCR

Se realizaron 3 amplificaciones por PCR utilizando 3 pares de cebadores diferentes marcados en la figura 6.3 con diferentes colores (rojo, verde y anaranjado). Los amplicones obtenidos se analizaron mediante un gel de agarosa y se obtuvo una banda por cada carril. Indique en qué carril se analizó el amplicón obtenido con cada par de cebadores, asumiendo que las PCR funcionaron correctamente y fueron específicas.

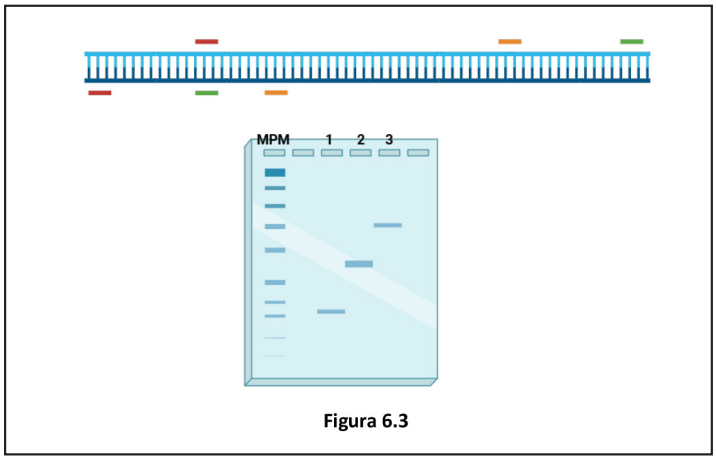


Figura 6.3

Resolución

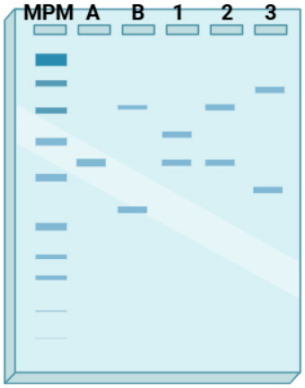
En este ejercicio se debe relacionar el tamaño del fragmento de ADN amplificado por cada par de cebadores con la migración de las bandas observadas en cada carril. Mirando el esquema podemos ver en qué región del ADN se une cada *primer* y, por lo tanto, estimar el tamaño del amplicón que se obtendrá con cada par de cebadores. Para este ejercicio no es necesario saber con exactitud el tamaño en pares de bases de cada fragmento, sino que es posible indicar a qué par de cebadores corresponde cada carril simplemente comparando los tamaños esperados de cada amplicón.

De este modo, podemos concluir que el fragmento más pequeño se obtendrá con el par de cebadores rojo y que el fragmento de mayor tamaño se obtendrá con el par de cebadores verdes. El fragmento obtenido con los cebadores anaranjados será de un tamaño intermedio entre los otros dos fragmentos. Por lo tanto, podemos concluir que en el carril 1 se analizó el resultado de la PCR realizada con los cebadores rojos, en el carril 3 se analizó el resultado de la PCR realizada con los cebadores verdes y en el carril 2 la realizada con los cebadores anaranjados.

6.3.3. Análisis de resultados de una PCR

El análisis de STR se utiliza en medicina forense para identificar o descartar parentescos. En la figura 6.4 se muestra el resultado del análisis de un STR por PCR que busca identificar al hijo o hija de los donantes A y B.

¿Cuál de las personas que donaron las muestras del 1 al 3 podría ser hijo de los donantes A y B?



Resolución

Los STR son repetidos en tándems que varían el número de repeticiones entre individuos. El análisis por PCR de un determinado STR presente en el genoma dará lugar a dos fragmentos, uno por alelo. Estos fragmentos pueden ser de igual longitud si los alelos del STR son iguales o de diferente longitud si los alelos son diferentes. Por ejemplo, en el gel del ejercicio, se observa que el individuo A tiene un solo fragmento para este STR, lo cual implica que es homocigoto para este alelo. Debido a que los STR son parte del genoma y se heredan del genoma de los progenitores, cada individuo tiene un alelo del genoma paterno y un alelo del genoma materno. Por lo tanto, la muestra de la 1-3 que corresponde al hijo/a de A y B debe tener un alelo de cada uno. Eso ocurre con el individuo 2.

Recordatorio: Compartir un alelo de un solo STR no confirma parentesco. Las pruebas utilizadas en medicina forense analizan un número alto de STR, por lo tanto, para confirmar parentesco es necesario verificar varios STR.

6.4. Actividad experimental

6.4.1. Amplificación de la subunidad β de la hemoglobina

Objetivo

Amplificar por PCR un fragmento del gen de la β globina humana a partir de ADN genómico de sangre de individuos sanos.

Introducción

Las hemoglobinas son proteínas globulares presentes en altas concentraciones en los eritrocitos, que a nivel de los alvéolos pulmonares fijan oxígeno (O_2) y lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Cada una

de las cadenas polipeptídicas de la Hb (denominadas globinas) cuenta con genes propios: α, β, δ, y γ. Los genes α y β son independientes y se ubican en cromosomas distintos. El grupo α se localiza en el brazo corto del cromosoma 16, mientras el grupo β se localiza en el brazo corto del cromosoma 11. Los genes funcionales de la globina comparten una estructura general que consiste en 3 exones y 2 introns.

Más del 95% de la hemoglobina del adulto y de los niños mayores de 7 meses es A (HbA). Su estructura se designa como $\alpha_2\beta_2$ para indicar que posee dos cadenas α y dos β. Los adultos sanos también tienen un 2-3% de HbA_2, la cual está compuesta por dos cadenas α como las de la HbA y dos cadenas δ. Se representa como $\alpha_2\delta_2$. Las cadenas δ son diferentes de las cadenas β y están bajo control genético independiente.

Procedimiento experimental

1) Diseñar los cebadores para amplificar un fragmento del gen HBB. El gen de la subunidad β de la hemoglobina humana tiene 1608 nt y está organizado en 3 exones (marcados en violeta) y dos introns. Contiene además una secuencia no traducida 5' (5'UTR) y una secuencia 3' no traducida (3'UTR).

Gen HBB hemoglobin subunit β (*Homo sapiens* [human]):

AACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACAC
CATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGC
AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCA
AGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGA
CAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGT
CTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTC
TTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTA
AGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGG
CTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCACT
GTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACG
CTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAG
GGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGC
ATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCATAA
CAATTGTTTTCTTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTT
TTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTC
TGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTAC
ATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACT
TTATTTTCTTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTT
AAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTT
TGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTAT
CTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAA
TGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGG
TTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTA
ACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT
TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCT
AGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAGCTCCTG
GGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCC
CACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCC
TGGCCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAA
GGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGG
CCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA

La región que se quiere amplificar está subrayada y los cebadores diseñados para amplificar son los siguientes:

Cebador directo: 5' ACACAACTGTGTTCACTAGC 3'
Cebador inverso: 5' TCTCCACATGCCCAGTTTCTA 3'

2) Obtener ADN genómico (ADNg) a partir de muestras de sangre de pacientes para diagnóstico.

La purificación de ADN genómico (ADNg) se realiza con el reactivo DNAzol. Este reactivo se basa en el uso de una solución de lisis con el detergente guanidinio, que permite una precipitación selectiva del ADN del lisado celular. La muestra es lisada (u homogeneizada) en el reactivo DNAzol y luego el ADNg es precipitado con etanol. Luego se realiza un lavado con etanol 70% (para remover sales) y el ADN es resuspendido en agua o en NaOH 8 M. El ADNg aislado puede ser utilizado sin purificaciones adicionales para otras aplicaciones, como el clonado molecular o la PCR. Es necesario cuantificar el ADN obtenido midiendo a 260 nm y utilizando para ADN doble cadena una concentración de 50 µg/mL por unidad de absorbancia.

3) Amplificación por PCR.

a) Preparación de la mezcla madre de reacción para la PCR.

i) La mezcla madre de reacción contiene todos los componentes comunes de la PCR sin el ADN. Esta mezcla madre se repartirá en cada tubo de PCR y se completará el tubo con el agregado de ADN específico de cada tubo.

ii) Antes de preparar las reacciones de PCR es necesario identificar los tubos con marcador permanente y mezclar bien la solución amortiguadora, los dNTP, el $MgCl_2$ y los cebadores.

iii) Preparar un tubo con todos los componentes como se indica en la tabla 6.1. El volumen final de la mezcla madre se calcula tomando en cuenta que la reacción final de cada tubo de reacción es de 25 µL. En este caso, son 4 muestras que se realizan por duplicado, lo que da un total de 200 µL.

Tabla 6.1

Componentes	Volumen del stock (µL)	Concentración final
Solución amortiguadora	20	1×
$MgCl_2$ (50 mM)	12	3 mM
Cebador directo (10 µM)	8	0,4 µM
Cebador inverso (10 µM)	8	0,4 µM
dATPs (10 mM)	4	200 µM
dGTPs (10 mM)	4	200 µM
dCTPs (10 mM)	4	200 µM
dTTPs (10 mM)	4	200 µM
Taq ADN polimerasa (5 U/µL)	12	0,3 U/µL
H_2O	124	

b) Preparación de cada tubo de PCR:

i) Prepare los tubos de PCR rotulando correctamente. Considere cada muestra por duplicado:

1) Paciente sano.

2) Control positivo: una muestra que se conoce que efectivamente contiene el gen HBB.

3) Control negativo: una muestra que contenga ADN, pero que no contenga el gen HBB.

ii) Agregue 25 µL de solución madre a cada tubo.

iii) Agregue una concentración de su muestra entre 20 a 40 ng de ADN.

c) Programar el termociclador con el protocolo de ciclado de la tabla 6.2 y colocar los tubos en el equipo.

Tabla 6.2

Etapa	Temperatura (°C)	Duración	Número de ciclos
Desnaturalización del ADN fina	95	2 min	1
Desnaturalización del ADN	95	15 s	25
Annealing	52	15 s	25
Extensión	72	20 s	25
Extensión final	72	3 min	1

d) Análisis de los productos de la PCR.

i) Preparar las muestras con buffer de la muestra como se explica en la sección 5.1.2.1, «Electroforesis en gel de agarosa».

ii) Preparar gel de agarosa 2%:

1) Pesar 1 g de agarosa y mezclarlo con 50 mL de tris-acetato 1× (TAE 1×).

Ver sección 5.1.2.1, «Electroforesis en gel de agarosa».

2) Calentar al microondas hasta que la agarosa esté disuelta.

3) Agregar 5µL de bromuro de etidio al matraz.

4) Verter la mezcla en el soporte para hacer el gel con el peine correspondiente.

5) Esperar que solidifique el gel a temperatura ambiente.

iii) Colocar el gel de agarosa solidificado en el soporte electroforético correspondiente.

iv) Agregar solución de corrida (TAE 1×) hasta completar la cuba electroforética.

v) Sembrar las muestras.

vi) Realizar la corrida electroforética a 100 voltios.

vii) Visualizar utilizando un transiluminador.

Análisis del resultado

Verificar la presencia de banda en las muestras por duplicado del paciente sano.

Analizar lo sucedido comparando con las muestras control.

Bibliografía

Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Comps.), Ecología molecular (pp. 517-552). Instituto Nacional de Ecología. Semarnat; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Peñuela, O. A. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica, 36*(3), 215-225. https://doi.org/10.25100/cm.v36i.3.366

Reinoso, E., Dieser, S., y Moliva, M. (2022). *Manual de herramientas moleculares: Conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana* (1.ª ed.). Universidad Nacional de Río Cuarto.

Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. En *Molecular Cloning: Vol. 2* (pp. 8.1-8.24). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Voet, D., y Voet, J. G. (2010). Nucleic Acids, Gene Expression, and Recombinant DNA Technology. En *Biochemistry*. (4.ª ed., pp. 82-128). John Wiley & Sons.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., y Losick, R. (2022). Técnicas de biología molecular. En *Biología molecular del gen* (7.ª ed., 148-190). Editorial Médica Panamericana.

Capítulo 7

Actividades experimentales

La tendencia educativa general que se mantiene es aceptar que la práctica de laboratorio añade una dimensión a la enseñanza de las ciencias que va más allá de lo que puede obtenerse escuchando las explicaciones de un docente u observando pasivamente demostraciones de laboratorio. Incluso aquellos autores que señalan distintos aspectos negativos de las actividades experimentales en determinados contextos, mantienen en común la firme convicción de que la práctica de laboratorio es imprescindible para un adecuado proceso de enseñanza y aprendizaje de las disciplinas científicas.

En este capítulo se recopilan actividades experimentales que se desarrollan en las diferentes unidades curriculares y optativas en las que participa la Unidad Académica Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Hasta el momento, en este manual se utilizaron dos estrategias para el aprendizaje de los diferentes conceptos y técnicas de laboratorio, los ejercicios de rutina y las actividades experimentales paso a paso. Los primeros buscan que el estudiantado aprenda y aplique de forma teórica las técnicas de laboratorio necesarias para resolver problemas específicos. Mientras que las actividades experimentales paso a paso tienen como objetivo la adquisición de la destreza fina y el aprendizaje de la manipulación de los equipos y las técnicas. En este tipo de actividades experimentales se busca la adquisición de aptitudes, como el uso de una bureta, de un espectrofotómetro, de un pHmetro o la realización de un gel electroforético. Se desarrolla la observación y el reconocimiento de los diferentes equipos y se promueve que cada estudiante logre sacar conclusiones sencillas de lo manipulado.

En todos ellos se sigue un protocolo experimental que ordena al estudiante para que siga determinados pasos con el fin de aprender una técnica en particular. Este tipo de actividades experimentales, de tipo *receta,* se limitan a un guion estructurado y el estudiantado no tiene la posibilidad de tomar decisiones sobre el protocolo que llevan a cabo. Este tipo de actividad cumple con el fin de buscar el aprendizaje de habilidades y técnicas particulares.

Las actividades experimentales que se describen en este capítulo tienen por objetivo la adquisición del pensamiento crítico y la construcción de conocimiento, se proponen propiciar la búsqueda de la indagación. Cada estudiante debe armar sus protocolos experimentales utilizando lo aprendido previamente para plantear un procedimiento experimental y el análisis de los resultados obtenidos. Se trata de actividades experimentales en las que se fusionan los ejercicios sencillos y las actividades experimentales de tipo receta. Se plantean problemas menos estructurados que permiten elaborar hipótesis, posibles diseños y el análisis crítico de los resultados. En este capítulo se busca que el estudiantado, al realizar estas actividades, aplique el método científico utilizando las diferentes técnicas, las destrezas y los conocimientos teóricos previamente adquiridos.

Este tipo de actividades experimentales deberían brindar a cada estudiante la posibilidad de aprender a partir de sus propias experiencias, lo que las convierte en un importante

recurso para el aprendizaje de muchos de los contenidos conceptuales, procedimentales y actitudinales.

7.1. Estudio de caso: Julia en el laboratorio

Julia está rotando en el laboratorio clínico del Hospital Maciel. Tiene que realizar un frotis sanguíneo a partir de un concentrado de glóbulos rojos. No recuerda la concentración de cloruro de sodio (NaCl) que debe tener la solución que va a utilizar, por lo que prepara tres soluciones distintas:

— NaCl 0,09 % m/v
— NaCl 0,9 % m/v
— NaCl 9 % m/v

Su docente le pide que realice la descripción del procedimiento, indicando solutos, solventes y la interacción entre ambos, y la justificación de la estrategia usada para preparar las tres soluciones.

Para determinar cuál solución es la indicada para estudiar los glóbulos rojos, Julia mezcla unas gotas del concentrado de hematíes en cada una de las soluciones que preparó y extiende una muestra de cada mezcla en distintos portaobjetos. Obtiene resultados distintos en cada uno de los frotis.

Si tiene dudas sobre cómo realizar la actividad experimental, vea el capítulo 2, «Preparación de soluciones». Tome en cuenta que a nivel intracelular la concentración osmolar es entre 280 y 310 mOsm, por lo que concentraciones iguales se consideran isotónicas con el medio intracelular.

7.2. Estudio de caso: soluciones amortiguadoras

Federica es estudiante de la Licenciatura en Biología Humana y está llevando a cabo experimentos con albúmina humana, la principal proteína del plasma sanguíneo. Para trabajar con esta proteína *in vitro* es fundamental utilizar una solución amortiguadora. Leandro es compañero de Federica y le dejó preparadas varias soluciones en el laboratorio, pero se olvidó de etiquetarlas. Las soluciones son las siguientes:

— Solución amortiguadora fosfato 150 mM, pH 7,0
— NaCl 0,9 % m/v
— Solución amortiguadora acetato 150 mM, pH 4,0

Para identificar cada una de las soluciones, Federica diseña un plan considerando que cuenta con un pHmetro y una solución de NaOH 1M. Luego, debe determinar cuál de las tres soluciones es la que debe usar para trabajar con la albúmina. ¿Cuál es el par ácido/base conjugado de la solución buffer elegida y la concentración de cada uno de sus componentes?

Si tiene dudas sobre cómo resolver el caso, vea el capítulo 3, «pH». Tome en cuenta la definición de las soluciones amortiguadoras y su capacidad para amortiguar los cambios de pH frente a agregados de bases como el NaOH.

7.3. Cuantificación de proteínas en muestras de plasma y orina de pacientes

Objetivos

1) Diseñar un protocolo experimental para la cuantificación de proteínas utilizando métodos en el rango visible.

2) Determinar la concentración proteica de dos soluciones problema utilizando el protocolo experimental diseñado.

Introducción

En medicina, así como en muchas otras disciplinas de la ciencia, conocer la concentración de un compuesto en un compartimento es de gran utilidad. En este sentido, conocer y cuantificar la concentración de proteínas en plasma y en orina es una información muy valiosa para la evaluación de la salud de un paciente. La concentración total de proteínas en plasma normal es de 7 g/dL y de orina menores a 20 mg/dL.

Problema experimental

En el laboratorio llegaron dos muestras de orina y dos de plasma de dos pacientes diferentes. Se cuenta únicamente con espectrofotómetros que miden en el rango visible.

Diseñar un protocolo experimental para determinar la concentración de proteínas de las muestras. Para ello en el laboratorio se cuenta con:

— reactivo de Bradford;
— reactivo de Biuret;
— solución de albúmina bovina (2 mg/mL);
— solución de albúmina bovina (10 mg/mL);
— buffer fosfato 50 mM pH 7,4.

Recuerde que al trabajar con muestras biológicas debe utilizar equipamiento de protección personal, como guantes y túnica. También debe desechar las puntas en recipientes de descarte adecuados.

Si tiene dudas sobre qué método utilizar para cuantificar la concentración de proteínas en las muestras, vea la sección 4.2, «Cuantificación de proteínas». Tome en cuenta que deberá utilizar el método de Bradford para analizar la concentración de proteína en la orina ya que este método es más sensible y permite detectar menores concentraciones, pero para el caso del plasma, debe utilizar el protocolo experimental de Biuret ya que la concentración es mayor.

7.4. Efecto del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por la enzima invertasa

Objetivos

1) Determinar la velocidad inicial de una reacción catalizada por la enzima invertasa en condiciones de velocidad máxima a pH y temperatura óptimos.

2) Observar el efecto en la velocidad inicial de la reacción al modificar las condiciones experimentales (cambios en la concentración de sustrato, la temperatura y el pH).

Introducción

El sustrato principal de la β-fructofuranosidasa, también conocida como invertasa, es la sacarosa. Esta enzima cataliza la reacción de hidrólisis de la sacarosa a fructosa y glucosa.

Para determinar la velocidad inicial de la reacción catalizada por una enzima se debe medir la desaparición del sustrato o la aparición del producto. En el caso de la reacción catalizada por la invertasa, la sacarosa es un azúcar no reductor, por lo cual, una forma de determinar la velocidad de reacción es medir la aparición del poder reductor de sus productos (glucosa o fructosa). Para ello, se utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), un reactivo que es reducido por los glúcidos reductores y cambia de color amarillo a anaranjado, y que se puede cuantificar midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm.

La velocidad inicial corresponde al tramo inicial recto del gráfico de concentración de producto en función del tiempo. La pendiente de ese tramo inicial corresponde a la velocidad inicial.

La enzima se encuentra en condiciones de velocidad máxima cuando está saturada de sustrato, es decir, no hay enzima libre en la solución. Se deben utilizar concentraciones de sustrato al menos diez veces mayores a la concentración del parámetro K_M para encontrarse en condiciones de velocidad máxima. En el caso de esta enzima, el K_M aproximado es de 30 mM.

Se cuenta con la información de la figura 7.1 con respecto a la velocidad inicial en función del pH y de la temperatura para la enzima invertasa.

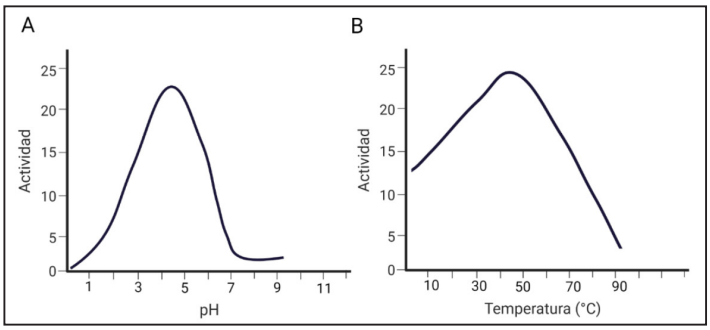


Figura 7.1. Actividad en función del pH (A) y la temperatura (B) para la enzima invertasa.

Materiales

En el laboratorio se cuenta con los siguientes materiales para cumplir con los objetivos planteados:

— solución amortiguadora de acetato de sodio 0,05 M pH 4,5;
— solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4;
— hidróxido de sodio (NaOH) 2 M;
— ácido clorhídrico (HCl) 2 M;
— sacarosa 500 mM;
— invertasa;
— solución de DNS;
— glucosa 20 mM;
— baños a 4˚C, 37˚C y 90˚C.

Procedimiento experimental

a) Defina cómo va a realizar el tubo de reacción para determinar la velocidad inicial de una reacción catalizada por la enzima invertasa en condiciones de velocidad máxima, a pH y temperatura óptimos, teniendo en cuenta que el volumen final será 2 mL y que debe colocar 200 µL de enzima.
b) Defina el tubo de reacción para otra concentración de sustrato para determinar la velocidad inicial de la reacción a igual pH y temperatura que la condición anterior. Mantenga la misma concentración de enzima y volumen de reacción.
c) Diseñe el tubo de reacción para otra condición experimental (modificación del pH o la temperatura). Mantenga la misma concentración de enzima y volumen de reacción.

Si tiene dudas sobre cómo confeccionar los tubos de reacción, vea la sección 4.5, «Determinación de la velocidad de reacción. Cinética enzimática».

d) Luego de tener prontos los tres tubos de reacción en las diferentes condiciones experimentales, incubar los tubos de reacción con todos los componentes menos la enzima por 5 minutos a la temperatura seleccionada.
e) Para seguir la reacción en el tiempo, es necesario ir tomando alícuotas (100µL) de esos tubos de reacción y pasarlas a tubos de vidrio que contengan 900 µL de DNS. Debe definir los tiempos en los que se tomarán las alícuotas. Para ello, primero hay que rotular los tubos de vidrio con los tiempos elegidos y los tubos correspondientes (A, B o C) y luego agregar en cada uno de ellos 900µL de DNS.
f) Realizar la curva de calibración utilizando glucosa. Diseñar la tabla correspondiente utilizando concentraciones en el rango de 2 a 10 mM.

Si tiene dudas sobre cómo confeccionar la curva de calibración, vea la sección 4.3, «Cuantificación de glúcidos reductores».

A) Calentar en baño a 100˚C todos los tubos con DNS, tanto los de la curva de calibración como los de la reacción, durante 5 minutos.
B) Prender el espectrofotómetro y fijar la longitud de onda en 570 nm. Realizar el blanco con el tubo marcado como blanco.
C) Medir la absorbancia de cada tubo a 570 nm y registrar las absorbancias para todos los tubos. Completar la tabla 7.1 con los datos obtenidos.

Tabla 7.1. Registro de absorbancias a 570 nm de los tubos de reacción (A, B y C) para la determinación de la concentración de glucosa (o glúcido reductor) por el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

	Velocidad inicial tubo A		Velocidad inicial tubo B		Velocidad inicial tubo C	
Tiempo (min)	Abs 570 nm	[Glucosa] (mM)	Abs 570 nm	[Glucosa] (mM)	Abs 570 nm	[Glucosa] (mM)
0						

Resultados

a) Con los datos de la curva de calibración, realizar el gráfico de absorbancia a 570 nm en función de la concentración de glucosa y determinar la ecuación de la recta. La pendiente de este gráfico corresponde con el epsilón (ε) para el DNS reducido a 570 nm.

b) Con el ε del DNS obtenido previamente y utilizando la ley de Lambert-Beer, determinar la concentración de glucosa + fructosa para cada tiempo del tubo de reacción. Para obtener la concentración de glucosa en cada tubo se debe dividir el valor de [glucosa + fructosa] entre 2, ya que en cada reacción se forma una molécula de glucosa y una de fructosa, y ambas reducen el DNS en estas condiciones.

Si tiene dudas sobre cómo utilizar la ley de Lambert-Beer, vea la sección 4.1.5, «Ley de Lambert y Beer».

c) Con los datos de los tubos de reacción (tabla 7.1), realizar el gráfico de concentración de glucosa en función del tiempo para las diferentes condiciones.

Discusión

a) Determinar hasta qué punto se encuentra en condiciones de velocidad inicial y determinar la pendiente para ese tramo inicial.

b) Determinar la velocidad máxima y la velocidad inicial que se obtuvo al modificar la condición experimental.

Si tiene dudas sobre cómo determinar los parámetros cinéticos, vea la sección 4.5.4, «Cinética enzimática. Determinación de parámetros cinéticos».

7.5. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima β-fructofuranosidasa (invertasa o sacarasa) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Objetivos

1) Evaluar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por la invertasa.

2) Determinar los parámetros cinéticos (K_M y Vmáx) de la invertasa purificada a partir de un cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fundamento teórico

Para determinar la actividad de una enzima se debe medir la velocidad de desaparición del sustrato o la velocidad de aparición del producto. Es importante encontrar un método que permita medir el sustrato o el producto, es decir, una característica que los diferencie y que sea detectable. Se debe conocer la reacción que cataliza la enzima y plantear el método de detección según sean sus productos o sustratos. En esta actividad se trabaja con la enzima invertasa, que cataliza la reacción de hidrólisis de la sacarosa a fructosa y glucosa.

En el caso de la reacción catalizada por la enzima invertasa, la propiedad que diferencia el sustrato de los productos es el poder reductor. La sacarosa es un azúcar no reductor, mientras que la glucosa y la fructosa sí lo son. Para ello, se utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), un reactivo que es reducido por los glúcidos reductores, y se cuantifica midiendo la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro. De esta forma, se puede determinar la concentración de producto (glucosa o fructosa) en el tiempo y determinar la velocidad inicial para cada tubo de reacción.

Para determinar los parámetros cinéticos de una enzima, es necesario realizar un gráfico de Michaelis-Menten, es decir, velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. A partir de la información del gráfico obtenido y del gráfico secundario, doble recíproco, se pueden determinar los parámetros cinéticos.

Diseño experimental

Diseñar un protocolo experimental que permita determinar los parámetros cinéticos de la enzima invertasa.

Tomar en consideración que, para determinar los parámetros cinéticos de una enzima, es necesario obtener el gráfico de Michaelis-Menten, es decir, velocidad inicial en función de la concentración de sustrato (sacarosa). Por lo que se tendrán que realizar varios tubos con concentraciones diferentes de sustrato, a los cuales se debe medir la velocidad inicial.

Además, se deberá tomar en cuenta un valor aproximado de K_M 30 mM para la sacarosa, 1 mL de reacción como volumen final y 100 µL de volumen agregado para el preparado enzimático (invertasa).

Si tiene dudas sobre cómo elegir las concentraciones de sustrato para los tubos de reacción o sobre cómo diseñar el protocolo experimental, vea la sección 4.5.4, «Cinética enzimática. Determinación de parámetros cinéticos».

Tome en cuenta que deberá elegir concentraciones menores, en el entorno y mayores al K_M y deberá alcanzar condiciones de velocidad máxima, es decir, 10 veces mayores al valor de K_M.

Determinación de las condiciones de velocidad inicial

Las velocidades para determinar de cada tubo de reacción deben estar en condiciones iniciales, lo que implica que no se consuma más del 10% de la concentración de sustrato inicial y que la velocidad se mantenga constante (recta). Para decidir el tiempo de incubación, y asegurarse de estar en condiciones de velocidad inicial, se debe realizar previamente un tubo de reacción en condiciones de velocidad máxima e ir tomando alícuotas a tubos con DNS el mayor tiempo posible, de forma de construir un gráfico de concentración de producto (glucosa) en tiempo y lograr determinar hasta qué minuto se encuentra en condiciones de velocidad inicial. Posteriormente, para el resto de los tubos de reacción (para determinar los parámetros cinéticos), solo se debe tomar dos alícuotas dentro del tiempo en condiciones de velocidad inicial.

Si tiene dudas sobre cómo realizar el tubo de reacción en condiciones de velocidad máxima y obtener el tiempo en el que se encuentra la velocidad en condiciones iniciales, vea la sección 4.5.3, «Determinación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima».

Preparación de los tubos de reacción

Para organizar los tubos de reacción, se debe completar la tabla 7.2 con los tubos de reacción para determinar los parámetros cinéticos K_M y Vmáx para la invertasa.

Tomar 1mL de reacción como volumen final y 100 µL de volumen agregado para el preparado enzimático (invertasa).

En el laboratorio se cuenta con los siguientes reactivos para cumplir con los objetivos planteados:

— solución de sacarosa 500 mM;
— solución amortiguadora acetato pH 4,5;
— preparado enzimático (se agrega en todos los tubos 100 µL).

Tabla 7.2. Preparación de los tubos de reacción

Tubo				
Blanco				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

Si tiene dudas sobre cómo confeccionar la tabla 7.2, vea la sección 4.5.3, «Determinación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima». En la sección hay un apartado

específico donde encontrará sugerencias para confeccionar la tabla y para determinar los parámetros cinéticos. Tome en cuenta que deberá elegir concentraciones por debajo, cercanas y superiores a la concentración de K_M y deberá alcanzar condiciones de velocidad máxima, es decir, 10 veces mayores al valor de K_M.

Si tiene dudas sobre cómo determinar los volúmenes para cada tubo a partir de una solución más concentrada, vea el capítulo 2, «Preparación de soluciones».

Luego de completar la tabla:

1) Rotular los tubos y agregar los volúmenes correspondientes de sacarosa y solución amortiguadora acetato pH 4,5. **NO agregar la enzima hasta que haya terminado de preparar todos los tubos.**
2) La reacción comienza cuando se agrega la enzima (100 µL) y los tubos se incuban el tiempo que corresponda a 37˚C. El agregado de enzima debe hacerse lo más rápido posible para que no haya diferencias entre los tubos. Para contabilizar los tiempos elegidos, encender el cronómetro inmediatamente después del agregado de enzima y luego colocar los tubos en la estufa a 37˚C.
3) Realizar la curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa, tomando un rango de 2 a 10 mM. Cada tubo de la curva debe tener un volumen final de 100 µL al cual se le tiene que agregar 900 µL de DNS.

Si tiene dudas sobre cómo realizar la curva de calibración, vea la sección 4.3, «Cuantificación de glúcidos reductores».

4) Luego de tomar todas las alícuotas de los tubos de reacción y de realizar la curva de calibración, incubar todos los tubos de ensayo con DNS a 100˚C durante 5 minutos.
5) Medir la absorbancia de todos los tubos en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm, contra el tubo blanco (concentración de sacarosa = 0 mM).
6) Completar la tabla 7.3 con los valores de absorbancia obtenidos.

Tabla 7.3

Tubo	[Sacarosa] (mM)	Abs *tiempo 1*	[Glucosa + Fructosa] (mM) *tiempo 1*	[Glucosa] (mM) *tiempo 1*	Abs *tiempo 2*	[Glucosa + Fructosa] (mM) *tiempo 2*	[Glucosa] (mM) *tiempo 2*
Blanco	0	0	0	0	0	0	0
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							

Procesamiento de los datos obtenidos

1) Con los datos de la curva de calibración, realizar el gráfico de absorbancia a 570 nm en función de la concentración de glucosa y determinar a partir de la ecuación de la recta el epsilón (ε) para el DNS reducido por la glucosa.

2) Con el ε del DNS obtenido previamente y utilizando la ley de Lambert-Beer, determinar la concentración de glucosa + fructosa para cada tiempo del tubo de reacción. Para obtener la concentración de glucosa en cada tubo se debe dividir el valor de [glucosa + fructosa] entre 2, ya que en cada reacción se forma una molécula de glucosa y una de fructosa, y ambas reducen el DNS en estas condiciones.

Si tiene dudas sobre cómo determinar el ε o cómo utilizar la ley de Lambert-Beer, vea la sección 4.1.5, «Ley de Lambert y Beer».

3) Para determinar la velocidad inicial para cada tubo de reacción con diferente concentración de sacarosa, se debe graficar la concentración de glucosa en función del tiempo. Cabe recordar que hay tres valores de tiempo para cada tubo, que corresponden a tiempo 0, tiempo 1 y tiempo 2. Linealizar y obtener la ecuación de la recta para cada gráfico anterior. La pendiente obtenida de la recta de cada gráfico corresponde a la velocidad inicial de formación de glucosa.

Si tiene dudas sobre cómo determinar la velocidad inicial, vea la sección 4.5.3, «Determinación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima».

4) Diseñar y completar una tabla que resuma la concentración de sustrato de cada tubo y los valores de velocidades iniciales obtenidos.

Discusión de los resultados

Determinar los parámetros cinéticos K_M y Vmáx del preparado enzimático de invertasa estudiado en el práctico.

a) Graficar velocidad inicial (Vo) en función de la concentración de sustrato ([S]).

b) Graficar 1/Vo en función de 1/[S], gráfico de doble recíproco. A partir de la ecuación de la recta, determinar los parámetros cinéticos.

Si tiene dudas sobre cómo realizar los gráficos y determinar los parámetros cinéticos, vea la sección 4.5.4, «Cinética enzimática. Determinación de parámetros cinéticos», donde se explica cómo determinar los parámetros cinéticos a partir del gráfico de doble recíproco.

7.6. Determinación de parámetros cinéticos y efectos de un inhibidor sobre la enzima xantina oxidasa

Objetivos

1) Determinar los parámetros cinéticos K_M y Vmáx de la enzima xantina oxidasa.

2) Estudiar la inhibición de la xantina oxidasa por el flavonoide quercetina.

Fundamento teórico

La xantina oxidasa (XO) es una enzima que participa en el catabolismo de bases púricas guanosina monofosfato (GMP) y adenosina monofosfato (AMP), transformando la hipoxantina en xantina y, a su vez, la xantina en ácido úrico, que es un producto que se

desecha a través de la orina. Se trata de una enzima que se encuentra fundamentalmente en el hígado y enterocitos, y en menor medida en el endotelio vascular.

La xantina oxidasa cataliza la siguiente reacción de oxidorreducción (figura 7.2).

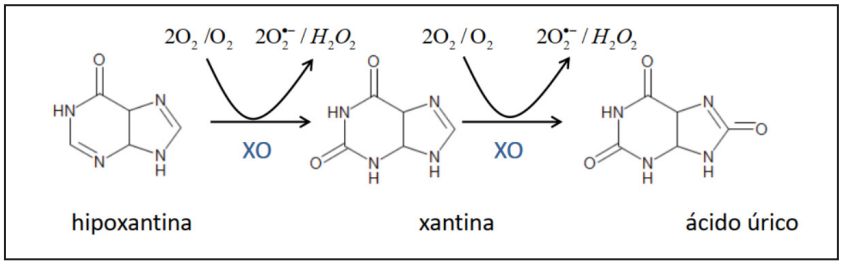


Figura 7.2. Reacciones catalizadas por la xantina oxidasa.

Los equivalentes de reducción son utilizados para reducir finalmente una molécula de oxígeno a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o dos moléculas de oxígeno a dos de anión superóxido ($O_2^{\bullet}$).

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima se puede determinar de dos formas:

1) Midiendo el consumo de sustrato en función del tiempo.

2) Midiendo la aparición del producto en función del tiempo.

En este práctico se medirá la aparición del producto ácido úrico en el tiempo, considerando que tiene la capacidad de absorber luz a una longitud de onda de 292 nm.

La concentración de ácido úrico puede verse aumentada en condiciones patológicas como el síndrome de lisis tumoral, cuando se produce una ruptura masiva de células neoplásicas ante tratamientos quimioterápicos, o en artritis microcristalinas como la gota, artropatía generada por depósito de cristales de ácido úrico en articulaciones, ante lo cual se desencadena una reacción inflamatoria que se acompaña de signos fluxivos (edema, rubor, calor y dolor). Por lo tanto, la inhibición de la xantina oxidasa posee gran interés médico y se han desarrollado diferentes inhibidores que se utilizan en la práctica clínica. El compuesto alopurinol se utiliza como un inhibidor de la enzima xantina oxidasa, que lo utiliza como sustrato y produce oxipurinol, el cual queda fuertemente unido a la forma reducida de la enzima.

También se está tratando de desarrollar nuevos inhibidores, entre ellos se destacan los compuestos flavonoides, una amplia familia de compuestos naturales distribuidos en alimentos de origen vegetal. Estos compuestos tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante, se consumen con diferentes alimentos o incluso como suplementos alimenticios. Entre ellos, la quercetina, presente en el vino tinto, el té verde y las manzanas, entre otros alimentos, actúa como inhibidor reversible de la xantina oxidasa, y se están realizando ensayos clínicos para su uso en pacientes con gota.

Diseño experimental

Parte 1. Determinación de los parámetros cinéticos de la xantina oxidasa

Diseñar los tubos de reacción para determinar los parámetros cinéticos de la xantina oxidasa. Confeccionar una tabla con las concentraciones de xantina que se pondrán en los tubos de reacción. *Considerar un valor de K_M alrededor de 4-5 µM para el sustrato xantina.*

Si tiene dudas sobre cómo confeccionar la tabla, vea la sección 4.5.4, «Cinética enzimática. Determinación de parámetros cinéticos». Tome en cuenta que deberá elegir concentraciones por debajo, cercanas y superiores a la concentración del K_M, y deberá alcanzar condiciones de velocidad máxima, es decir, 10 veces mayores al valor de K_M.

Si tiene dudas sobre cómo determinar los volúmenes para cada tubo a partir de una concentración más concentrada, vea la sección 2.2, «Preparación de una solución por dilución».

En el laboratorio se cuenta con los siguientes reactivos para cumplir con los objetivos planteados:

— xantina oxidasa;
— xantina (500 µM);
— DCPIP (0,4 mM);
— quercetina (500 µM);
— solución amortiguadora Tris 50 mM pH 7,4.

Completar la tabla 7.4 con los volúmenes y concentraciones de xantina que va a estudiar. Se sugiere comenzar con al menos una concentración de xantina por debajo del valor de K_M y no alcanzar valores de xantina por encima de los 60 µM debido a la inhibición por sustrato que experimenta la enzima.

Tabla 7.4. Preparación de los tubos de reacción

Tubo	[Xantina] (µM)	Volumen de xantina 500 µM (µL)	Volumen de solución amortiguadora (µL)	Volumen de xantina oxidasa (µL)
1				30
2				30
3				30
4				30
5				30
6				30

Para completar la tabla 7.4, se debe considerar que para calcular el volumen de xantina de cada tubo de reacción hay que tomar en cuenta la siguiente relación:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

La suma de xantina y solución de amortiguadora Tris/HCl 50 mM pH 7,4 de cada tubo es 970 µL. Se obtiene un volumen final de 1000 µL tras agregar los 30 µL de xantina oxidasa.

Luego de completar la tabla:

1) Rotular los tubos Eppendorf y agregar los volúmenes correspondientes de xantina y solución amortiguadora. **NO agregar la enzima hasta que se haya terminado de preparar todos los tubos.**

2) Trasvasar la mezcla de reacción del tubo Eppendorf a una cubeta de espectrofotómetro. Posteriormente, agregar el volumen de enzima, mezclar y colocar la cubeta en el espectrofotómetro. La reacción comienza cuando se agrega la enzima (30 µL).

3) Medir la absorbancia en el espectrofotómetro cada 15 segundos durante 3 minutos.

Parte 2. Inhibición de la xantina oxidasa por el flavonoide quercetina

Proceder como en la parte 1, pero preparando tubos en presencia de 0, 2 y 4 µM de quercetina. Completar la tabla 7.5.

Tabla 7.5. Preparación de los tubos de reacción en presencia de quercetina

Tubo	[Xantina] (µM)	Volumen de xantina (µL)	Volumen de solución amortiguadora (µL)	[Quercetina] (µM)	Volumen de quercetina 500 µM (µL)	Volumen de xantina oxidasa (µL)
1				0		30
2				0		30
3				0		30
4				0		30
5				0		30
6				2		30
7				2		30
8				2		30
9				2		30
10				2		30
11				4		30
12				4		30
13				4		30
14				4		30
15				4		30

Con los datos obtenidos:

a) Graficar absorbancia (UA) en función de tiempo (segundos) para cada una de las condiciones. Obtener la velocidad inicial para cada una de las condiciones.

b) Graficar velocidad inicial en función de la concentración de xantina, en ausencia de inhibidor. Determinar los parámetros cinéticos K_M y Vmáx, ajustando el gráfico o realizando el doble recíproco.

Si tiene dudas sobre cómo realizar los gráficos para determinar la velocidad inicial para cada tubo y cómo determinar los parámetros cinéticos de la enzima, vea la sección 4.5, «Determinación de la velocidad de reacción. Cinética enzimática».

c) Determinar cuál es la actividad específica de la enzima (U/mg de proteína) utilizando como referencia la concentración de proteína 0,5 mg obtenida previamente.

Si tiene dudas sobre cómo realizar este paso, vea la sección 4.5.5, «Actividad enzimática (U) y actividad específica (U/mg)». Recuerde que una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma 1 µmol de sustrato por minuto bajo condiciones de velocidad máxima y que la actividad específica es la actividad sobre la concentración de proteínas en mg.

d) Realizar los gráficos de velocidad inicial en función de la concentración de xantina en presencia de la quercetina. Determinar el tipo de inhibición reversible ejercida por la molécula.

7.7. Estudio de una ruta metabólica: la glucólisis

Objetivo general

Evidenciar la glucólisis en un cultivo de levaduras utilizando glucosa como sustrato y evaluando el consumo del sustrato y la producción de CO_2.

Objetivos específicos

1) Evaluar el consumo de glucosa en un cultivo de levaduras en ausencia y en presencia de un inhibidor ($HgCl_2$) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

2) Evaluar la producción de CO_2 por un cultivo de levaduras en ausencia y en presencia de un inhibidor ($HgCl_2$) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Fundamento teórico

Las vías metabólicas difieren en los distintos organismos, sin embargo, la glucólisis se encuentra altamente conservada en la evolución. La glucólisis, vía inicial del catabolismo de los carbohidratos, está formada por 10 reacciones que transforman la molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es sustrato de otros destinos metabólicos.

La ecuación global de la glucólisis es la siguiente:

$$\text{Glucosa} + 2\ NAD^+ + 2\ ADP + 2\ Pi \rightarrow 2\ \text{Piruvato} + 2\ NADH + 2H^+ + 2\ ATP + 2\ H_2O$$

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta un metabolismo mixto aeróbico-fermentativo regulado principalmente por los niveles de glucosa. A concentraciones altas de glucosa, la levadura lleva a cabo principalmente la fermentación alcohólica en la que el piruvato, formado en la glucólisis, es convertido a etanol en dos pasos:

1) la descarboxilación no oxidativa del piruvato a acetaldehído catalizada por la piruvato descarboxilasa: piruvato → acetaldehído + CO_2
2) la reducción del acetaldehído a etanol a expensas de NADH por la acetaldehído deshidrogenasa.

Estrategia experimental

Antes de comenzar con la actividad experimental contestar las siguientes preguntas:

— Discutir y diseñar cómo se podría evidenciar el consumo de glucosa por la vía glucolítica en un cultivo de levaduras.

Si tiene dudas sobre cómo cuantificar un glúcido reductor como la glucosa, vea la sección 4.3, «Cuantificación de glúcidos reductores».

— Discutir por qué los objetivos plantean la formación de CO_2 como manera de evidenciar esta ruta. ¿Conocen alguna estrategia que permita determinar la producción de CO_2 por un cultivo celular?

Dato: El CO_2 es el único gas que en solución actúa como ácido débil:

$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

— ¿Por qué se plantea el uso de un inhibidor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa? ¿Qué aporta esto a la medida de consumo de glucosa o de formación de CO_2 como manera de evidenciar la glucólisis?

— Usando la guía y sus conocimientos previos, diseñar el protocolo experimental para cumplir con los objetivos de la práctica planteando los pasos que hay que seguir. Indicar qué resultados se espera obtener según el diseño experimental planteado.

Procedimiento experimental

A) Evaluación del consumo de glucosa

1. Preparación del cultivo de levaduras para evaluar consumo de glucosa

— Preparar 2 matraces (A y B) con 0,5g de levadura seca *(Saccharomyces cereviseae)* en 40 mL de solución de glucosa 10 mM. Agregar al matraz B 1 mL de $HgCl_2$ 100 mM.

— Tomar la muestra de tiempo 0 de cada matraz (ver punto 2) y colocar el cultivo en la estufa de cultivo a 30°C.

2. Toma de muestras de los cultivos de levadura (figura 7.3)

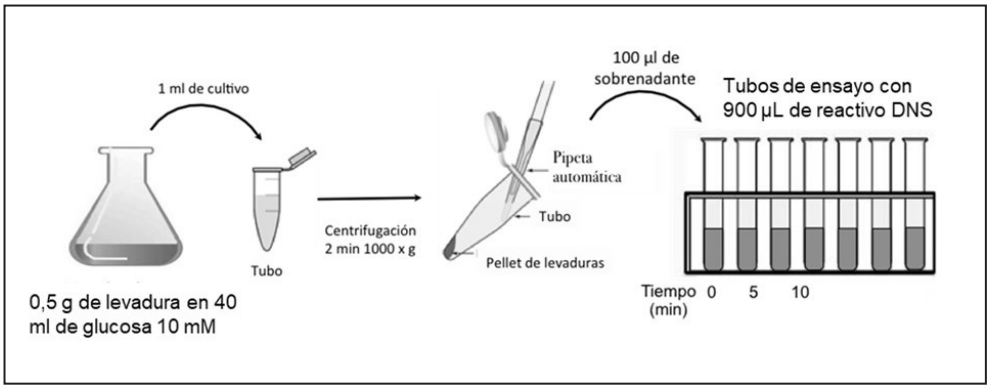


Figura 7.3. Procedimiento para la toma de muestras de los cultivos de levadura.

Las muestras de los cultivos se tomarán a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Seguir las siguientes indicaciones para la toma de muestras:

— Tomar muestras de 1 mL del cultivo de levaduras del matraz (A y B) y pasarlas a tubos previamente rotulados con nombre de matraz y tiempo.

Recordar: hay que agitar los cultivos antes de la toma de cada muestra.

— Centrifugar cada tubo a 1000 ×g durante 2 minutos inmediatamente luego de la toma de muestra.

— Pasar 100 µL de cada sobrenadante a un tubo de vidrio que ya contenga 900 µL de DNS para realizar más tarde la determinación de la concentración de glucosa.

Importante: hay que recordar devolver el cultivo a la estufa de cultivo inmediatamente tras la toma de cada muestra.

3. Determinación de la concentración de glucosa por un método espectrofotométrico.

— Diseñar un protocolo para determinar la concentración de glucosa en los sobrenadantes de los matraces.

— Armar las tablas correspondientes para la curva de calibración y para las muestras a diferentes tiempos.

Si tiene dudas sobre cómo cuantificar un glúcido reductor como la glucosa, vea la sección 4.3, «Cuantificación de glúcidos reductores».

B) Evaluación de la producción de CO_2 por un cultivo de levaduras

— Preparar 6 matraces (A, B, C, D, E y F) con 2 g de levadura seca *(Saccharomyces cereviseae)*.

Matraz A (cultivo de levaduras). Agregar 40 mL de glucosa 300mM y mezclar. Colocar dentro del matraz un tubo con 2mL de una solución de rojo fenol pH 7,0 preparada en agua.

Matraz B (cultivo de levaduras con inhibidor). Agregar 40 mL de glucosa 300 mM y mezclar. Agregar en el cultivo de levaduras 3 mL de $HgCl_2$ 100 mM. Colocar dentro del matraz un tubo con 2mL de una solución de rojo fenol pH 7,0 preparada en agua.

Matraz C (cultivo de levaduras). Agregar 40 mL de glucosa 300 mM y mezclar. Colocar dentro del matraz un tubo con 2 mL de una solución de rojo fenol preparado en solución amortiguadora de fosfato pH 7,0.

Matraz D (cultivo de levaduras con inhibidor). Agregar 40 mL de sacarosa 300 mM y mezclar. Colocar dentro del matraz un tubo con 2mL de una solución de rojo fenol pH 7,0 preparada en agua.

Matraz E (cultivo de levaduras con inhibidor). Agregar 40 mL de agua y mezclar. Colocar dentro del matraz un tubo con 2 mL de una solución de rojo fenol pH 7,0 preparada en agua.

Matraz F (cultivo de levaduras con inhibidor). Agregar 40 mL de lactosa 300 mM y mezclar. Colocar dentro del matraz un tubo con 2 mL de una solución de rojo fenol pH 7,0 preparada en agua.

Para evitar el intercambio gaseoso con el exterior, se colocará un globo en la boca de cada matraz.

— Incubar los matraces en la estufa de cultivo a 30˚C. Observar 1,5 horas después de realizar los cultivos las variaciones de color en la solución de rojo fenol y los cambios en el globo (si se infla o no se infla).

— Completar la tabla 7.6 con los resultados obtenidos.

Tabla 7.6. Resultados obtenidos para la evaluación de la producción de CO_2 por un cultivo de levaduras

Condición	Color solución rojo fenol	Globo (inflado/no inflado)
Matraz A		
Matraz B		
Matraz C		
Matraz D		
Matraz E		
Matraz F		

El rojo fenol es un indicador de pH, vira de color frente a cambios de pH, por lo que permite evidenciar la formación de dióxido de carbono ya que acidifica las soluciones al hidratarse. Si tiene dudas sobre cómo visualizar la acidificación de una solución utilizando un indicador de pH como el rojo fenol, vea la sección 3.3.2, «Métodos colorimétricos (utilizando indicadores de pH)».

Procesamiento y análisis de resultados en el informe

1) Realizar una gráfica de concentración de glucosa (mM) en función del tiempo (min) superponiendo los datos de los matraces en un mismo par de ejes.
2) Analizar los resultados obtenidos en el estudio de producción de CO_2: indicador de pH y globo (tabla 7.6).
3) Analizar los resultados de consumo de sustrato y formación de producto en ausencia y en presencia del inhibidor ($HgCl_2$) de la glucólisis.

7.8. Determinación de la concentración de glucosa y proteínas plasmáticas en plasma y orina

Objetivo general

Adquirir destrezas básicas de laboratorio que permitan identificar metabolitos alterados en plasma y en orina en situaciones patológicas.

Objetivos específicos

1) Discutir el caso clínico que se presenta y determinar qué pruebas de laboratorio serán necesarias para completar el diagnóstico.

2) Realizar los distintos ensayos de laboratorio utilizando las muestras proporcionadas y los protocolos disponibles.

Fundamento teórico

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglicemia). La insulina es una de las hormonas secretadas por el páncreas encargada de regular la concentración de glucosa en sangre. En pacientes con diabetes mellitus, la secreción de insulina o su accionar, o ambos, se ven alterados. Si esta patología no se controla, puede generar riesgo de complicaciones microvasculares por la alta concentración de glucosa en la sangre, como problemas cardíacos, daño renal y pérdida de la visión. Una forma de detectar el daño renal es a través la presencia de proteínas y glucosa en la orina, y la observación de la disminución de proteínas en el plasma sanguíneo.

La albúmina, la proteína plasmática más abundante, es sintetizada por el hígado y tiene una vida media de 20 días. La albúmina en el plasma cumple principalmente dos roles, mantener la presión osmótica en el compartimento vascular y transportar diferentes biomoléculas (ácidos grasos, hormonas liposolubles, bilirrubina, fármacos, drogas, entre otras). La disminución de la albúmina en sangre puede deberse tanto a un defecto en su síntesis a nivel hepático (fallo hepático agudo, cirrosis hepática, entre otros) como a causas extrahepáticas (desnutrición, neuropatías, enteropatías, daño renal o trastornos hormonales) por las que existe un problema en la absorción proteica o por la pérdida de proteínas en la orina (proteinuria).

La electroforesis en papel de las proteínas del suero o proteinograma es un método semicuantitativo de análisis que permite la evaluación de la concentración y proporción de las proteínas plasmáticas, lo cual ayuda en el diagnóstico y monitoreo de diversas enfermedades y trastornos.

Las pruebas más comunes de laboratorio para conocer si existe daño hepático son las de detección de actividad de las enzimas hepáticas en el plasma, como la actividad de la alanina transaminasa y la de la aspartato transaminasa. La alanina transaminasa cataliza la reacción reversible de transaminación entre la alanina y el α-cetoglutarato para dar como producto piruvato y glutamato. El K_M aproximado para la alanina es de 0,5 mM. El DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) es un reactivo que se utiliza para la detección de α-cetoácidos como el piruvato en medio básico, por lo que se puede seguir la reacción de formación de producto de la enzima utilizando el reactivo.

Valores de referencia de proteínas en plasma:

Proteínas totales: 6,0-8,0 g/dL

Albúmina: 3,5-5,0 g/dL

Valor de referencia de proteínas en orina:

Proteínas totales: menos de 150 mg/dL en orina de 24 horas.

Valores de referencia de glucosa en plasma en ayunas:

Glucosa: 70-99 mg/dL (3,9-5,5 mM)

Valores de referencia de glucosa en orina:

Normalmente, no debería haber glucosa en orina en un examen de orina normal. Valores detectables pueden indicar hiperglucemia o problemas renales.

Problema

Una paciente presenta un diagnóstico inicial de una posible diabetes mellitus avanzada. En este caso se cuenta con una muestra de plasma en ayunas y orina del paciente. Diseñar

qué estudios paraclínicos se deben realizar para confirmar el diagnóstico con los materiales que cuenta. El laboratorio tiene los siguientes equipos y reactivos:

Equipos:

— Proteinograma electroforético
— Espectrofotómetro UV/Visible

Reactivos:

— 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
— Glucosa
— Solución amortiguadora de corrida
— Solución de 0,5% de rojo Ponceau
— DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina)
— NaOH
— Solución amortiguadora fosfato pH 7,4
— Alanina
— α-cetoglutarato
— Piruvato
— Albúmina

Preguntas guías

— Para tener indicios de si el paciente presenta una diabetes mellitus se deberá confirmar si en la muestra de plasma, tomada en condiciones de ayuno, hay concentración elevada de glucosa. ¿Qué método se podría utilizar para determinar si el paciente presenta una concentración de glucosa elevada?

Para resolver el problema, tome en cuenta que en el laboratorio dispone de un espectrofotómetro y del reactivo DNS, que detecta la presencia de glúcidos reductores como la glucosa. Recuerde que deberá realizar una curva de calibración con glucosa como estándar.

Si tiene dudas sobre cómo resolver este problema, vea la sección 4.3, «Cuantificación de glúcidos reductores».

— Para poder confirmar el diagnóstico de daño renal se deberá confirmar si en la muestra de orina hay proteínas presentes y si en la muestra de plasma la concentración de proteínas es baja. ¿Qué método se podría utilizar para detectar proteínas en las muestras de orina?

Tome en consideración que en el laboratorio cuenta con un espectrofotómetro que mide en el rango UV y, además, dispone de albúmina que puede utilizarse como estándar.

Si tiene dudas sobre cómo resolver este problema, vea la sección 4.2, «Cuantificación de proteínas».

— ¿Qué método se podría utilizar para detectar una disminución de proteínas en el plasma?

En el laboratorio cuenta con la posibilidad de realizar una electroforesis en acetato de celulosa, que permite comparar la cantidad de proteínas presentes en el plasma. Para esto dispone de una muestra de plasma control para comparar.

Si tiene dudas sobre cómo resolver y realizar este ensayo, vea la sección 5.1.1, «Electroforesis en papel».

— Para confirmar el diagnóstico de daño hepático se deberá confirmar la presencia de la enzima alanina transaminasa en el plasma. ¿Cómo podría detectar la presencia de la enzima en el plasma? ¿Qué método se podría utilizar para detectar la presencia de esta enzima en el plasma?

Primero deberá diseñar el tubo de reacción con los sustratos de la enzima en condiciones de velocidad máxima (para determinar la actividad) en solución amortiguadora. Recuerde que para encontrarse en condiciones de velocidad máxima debe colocar en el tubo de reacción una concentración de alanina 10 veces mayor a las del KM. Se aconseja 200 mM de alanina y 2 mM de α-cetoglutarato en solución amortiguadora fosfato 0,1 M, pH 7,4.

Si tiene dudas sobre cómo diseñar el tubo de reacción, vea la sección 4.5.3, «Determinación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima».

Para determinar la concentración del producto en el tiempo y poder seguir la reacción, se tendrá que tomar volúmenes del tubo de reacción a diferentes tiempos y determinar la concentración de piruvato (producto de la reacción). Tendrá que realizar una curva de calibración con piruvato como patrón. Aconsejamos repasar la sección 4.4. «Cuantificación de α-cetoácidos».

7.9. Detección de anemia falciforme por PCR

Objetivos

1) Amplificar por PCR un fragmento del gen de la β globina humana a partir de ADN genómico de sangre de individuos sanos e individuos con anemia falciforme.

2) Realizar una digestión enzimática del producto de la PCR para detectar la mutación en el gen de la β globina humana.

3) Analizar el resultado de la digestión enzimática mediante electroforesis en gel de agarosa.

Introducción

La hemoglobina opera como vehículo de intercambio gaseoso, capta oxígeno molecular a nivel de los alvéolos pulmonares y lo cede en los tejidos. En simultáneo, capta dióxido de carbono de los tejidos y lo cede al aire a nivel de los alvéolos pulmonares. La hemoglobina es un tetrámero, con dos dímeros que se mantienen unidos mediante interacciones débiles ($\alpha_2\beta_2$). Cada monómero contiene un grupo hemo.

El gen HBB codifica para la β globina. Una mutación de una base en su secuencia (A por T) genera un cambio del sexto aminoácido en la cadena (ácido glutámico por valina, o E por V). Esta enfermedad se da en alrededor de 1 cada 500 nacimientos de afrodescendientes y en 1 de cada 1000 nacimientos de hispanoamericanos. Al ser una enfermedad autosómica recesiva, para que se exprese se necesitan ambos alelos en el individuo heterocigoto portador.

La anemia falciforme es un desorden genético que afecta la forma y función de los eritrocitos. Dicho desorden produce una hemoglobina anormal que ocasiona un cambio de forma en la célula, que pasa de discoidal a una forma de hoz. Estos eritrocitos deformes son frágiles, poco flexibles y se rompen fácilmente. Tienen dificultades al viajar por el torrente sanguíneo, bloquean así el flujo y reducen el abastecimiento de oxígeno a los tejidos.

El diagnóstico se realiza mediante técnicas de biología molecular, lo que implica el amplificado por PCR y la posterior digestión enzimática del amplicón, que permite verificar la presencia de la mutación.

Procedimiento experimental

1) Diseñar los cebadores sentido y antisentido necesarios para la realización de una PCR que permita amplificar la región del gen de la β globina humana que contenga la mutación que se va a estudiar.

Gen HBB hemoglobin subunit β (*Homo sapiens* [human]):

AACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACAC
CATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGC
AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCA
AGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGA
CAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGT
CTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTC
TTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTA
AGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGG
CTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCACT
GTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACG
CTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAG
GGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGC
ATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCATAA
CAATTGTTTTCTTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTT
TTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTC
TGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTAC
ATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACT
TTATTTTCTTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTT
AAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTT
TGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTAT
CTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAA
TGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGG
TTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTA
ACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT
TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCT
AGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAGCTCCTG
GGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCC
CACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCC
TGGCCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAA
GGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGG
CCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCA TTGCAA

Tome en cuenta las sugerencias del capítulo 6. Por ejemplo, elegir un fragmento de 100 a 500 pb para amplificar. Ambos cebadores deben tener longitudes y temperatura de melting similares. A modo de sugerencia, se subrayaron las regiones a partir de las cuales se podrían diseñar los cebadores directo e indirecto.

2) Obtener el ADN genómico a partir de muestras de sangre de pacientes para diagnóstico.

La purificación de ADN genómico se realiza con el reactivo DNAzol. La muestra es lisada con el reactivo y luego el ADN genómico es precipitado con etanol. Posteriormente, se realiza un lavado con etanol 70% y el ADN es resuspendido en agua. Para cada muestra se realiza el mismo procedimiento.

3) Amplificar la secuencia de interés por PCR.

a) Diseñar cada tubo tomando en cuenta la preparación de una mezcla madre común a todos los tubos inicialmente.

Si tiene dudas sobre cómo diseñar la amplificación por PCR, vea el capítulo 6, «Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)».

b) Preparar las muestras. Colocar en cada tubo bien rotulado las muestras correspondientes a los pacientes que se van a estudiar. Debe tener al menos un control positivo y un control negativo. Idealmente, realice duplicado de cada muestra.

c) Armar el protocolo del termociclador tomando en cuenta todos los pasos para una PCR. Colocar las muestras y comenzar la PCR.

Si tiene dudas sobre cómo diseñar la amplificación por PCR, vea el capítulo 6, «Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)».

4) Realizar la digestión enzimática de los productos de la PCR.

El cambio de un nucleótido en el gen HBB tiene como consecuencia la pérdida de reconocimiento de la enzima de restricción Eco81. Esta enzima de restricción reconoce la siguiente secuencia presente en el gen y corta en las posiciones indicadas por la flecha:

5´...CC↓TNAGG...3´

3´...GGANT↑CC...5´

Una manera de distinguir si el individuo presenta la mutación en el gen es realizar una digestión con la enzima de restricción con los productos amplificados. Si el gen presenta la mutación (cambio de A por T), el fragmento no será cortado.

a) Preparación de la mezcla madre de reacción para la digestión. La mezcla madre tiene todos los componentes comunes de la digestión menos el producto amplificado de PCR de cada muestra. Para la digestión se utiliza un kit de digestión comercial que contiene la enzima y la solución amortiguadora concentrada 10×.

Componente	Volumen del stock (µL)
Solución amortiguadora 10×	12
Enzima de restricción Eco81	6
H_2O	42

b) Agregar 10 µL de la mezcla madre en cada tubo.

c) Agregar 10 µL del producto de PCR correspondiente.

d) Incubar a 37˚C en baño de agua por 15 minutos.

5) Corrida electroforética de las muestras.

a) Preparar el gel de agarosa 2 % en TBE 1×, incluir en la preparación el bromuro de etidio.

b) Preparar todas las muestras con buffer de la muestra.

c) Llenar la cuba electroforética con TBE 1×.

d) Sembrar las muestras en el gel de agarosa. Agregar un marcador de peso molecular.
e) Realizar la corrida electroforética a 100V. Ir observando el frente de corrida.
f) Visualizar la corrida en el transiluminador.

Si tiene dudas sobre cómo se realiza el análisis mediante gel de agarosa y su construcción, vea la sección 5.1.2.1, «Electroforesis en gel de agarosa».

Discusión de los resultados

a) Analice las bandas obtenidas de cada muestra.
b) Determine si los pacientes tienen el gen HBB mutado.

Bibliografía

Barberá, Ó., y Valdés, P. (1996). El trabajo práctico en la enseñanza de las ciencias: una revisión. *Enseñanza de las Ciencias: Revista de Investigación y Experiencias Didácticas, 14*(3), 365-379.

Voet, D., Voet, J. G., y Pratt, C. W. (2010). Energy Metabolism: Integration and Organ Specialization. En *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (4.ª ed., 1088-1106). John Wiley & Sons.

Zorrilla, E. G., y Mazzitelli, C. A. (2021). Trabajos prácticos de laboratorio y modelos didácticos: una propuesta de clasificación. *Didáctica de las Ciencias Experimentales y Sociales,* (40), 133-148.

Glosario de abreviaturas y símbolos

Abs. Absorbancia. La absorbancia es la cantidad de luz que absorbe una molécula o sustancia a una determinada longitud de onda. Depende de forma directamente proporcional de la concentración de la molécula o sustancia.

ADN. Ácido desoxirribonucleico. Hebra bicatenaria de desoxinucleótidos.

ARN. Ácido ribonucleico. Hebra monocatenaria de ribonucleico.

BCA. Del inglés *Bicinchoninic Acid*. El ácido bicinconínico es ampliamente utilizado para la cuantificación de proteínas.

DCPIP. Del inglés *Dichlorophenolindophenol*. Es un aceptor de electrones artificial ampliamente utilizado para seguir reacciones de óxido-reducción.

desoxiHb. Desoxihemoglobina. Proteína tetramérica. Corresponde a la hemoglobina no oxigenada.

DNPH. Del inglés *2,4-Dinitrophenylhydrazine*. Es un reactivo ampliamente utilizado para detectar los compuestos α-cetoácidos.

DNS. 3,5-dinitrosalicílico. El reactivo de DNS preparado en condiciones alcalinas permite la cuantificación de glúcidos reductores.

ELISA. Del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Es una técnica de laboratorio utilizada para detectar y cuantificar la presencia de moléculas específicas, como proteínas, anticuerpos, antígenos u hormonas, en una muestra biológica.

g. Gramo(s). Unidad de medida de masa del Sistema Internacional de Unidades. 1 gramo equivale a 1000mg (miligramos).

Hb. Hemoglobina. Proteína globular tetramérica que posee un grupo hemo en cada monómero. Es la proteína mayoritaria de los glóbulos rojos y una de sus funciones es el transporte de los gases en el torrente sanguíneo.

$\mathbf{K_{0,5}}$. Constante 0,5. Es un parámetro cinético de las enzimas con cinética del tipo no michaeliano (sigmoide) y corresponde a una concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción catalizada es la mitad de la velocidad máxima.

$\mathbf{K_M}$. Constante de Michaelis-Menten. Es un parámetro cinético de las enzimas con cinética del tipo michaeliano y corresponde a una concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción catalizada es la mitad de la velocidad máxima.

$\mathbf{K_W}$. Constante de disociación del agua que corresponde a un valor de 1×10^{-14} M^2. La letra W corresponde a la inicial en inglés de *water* (agua).

L. Litro(s). Un litro equivale a 1000 mL (mililitros), a 10 dL (decilitros) y a 10^6 µL (microlitros).

M. Molaridad. La molaridad corresponde a la cantidad de moles de soluto por litro presentes en una solución. Es una unidad de concentración.

min. Minuto(s). Unidad de medida de tiempo, 60 minutos equivalen a 1 hora.

nm. Nanómetro(s). Unidad de medida muy utilizada para la longitud de onda.

Osm. Osmolaridad y osmolar. La osmolaridad es una unidad de concentración que corresponde a la cantidad de partículas osmóticamente activas presentes en un litro de solución. Osmolar es la unidad correspondiente. 1 Osm equivale a 1000 mOsm.

OxiHb. Oxihemoglobina. Corresponde a la hemoglobina oxigenada.

PAGE. Del inglés *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica de laboratorio ampliamente utilizada para separar macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos según su tamaño o carga eléctrica.

pb. Número de pares de bases. Corresponde al conteo total de las parejas de bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina, guanina) que se encuentran en una cadena de ADN de doble hélice. Cada par de bases está formado por dos bases complementarias, como la adenina con la timina (A-T) y la citosina con la guanina (C-G).

PBS. Del inglés *Phosphate-Buffered Saline*. El PBS es una solución amortiguadora ampliamente utilizada en el laboratorio. Tiene una concentración en el entorno de los 310mOsm y pH 7,4 y permite simular condiciones fisiológicas.

PCR. Del inglés *Polymerase Chain Reaction*. Es una técnica de biología molecular utilizada para amplificar de manera rápida y específica fragmentos de ADN.

PM. Peso molecular. Corresponde a la suma de las masas atómicas que forman la molécula.

PSA. Persulfato de amonio. Este compuesto actúa como un iniciador de radicales libres, necesarios para la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida en presencia de un catalizador como el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina).

SDS. Dodecilsulfato de sodio, SDS por su sigla en inglés. Es un detergente aniónico utilizado principalmente en electroforesis desnaturalizantes. Su función principal es desnaturalizar proteínas y conferirles una carga negativa uniforme, lo que permite que la separación en el gel se base exclusivamente en el tamaño molecular.

UV. Ultravioleta. Las ondas UV son un tipo de radiación electromagnética con una longitud de onda más corta que la luz visible, en el rango de los 200 a los 400nm.

V. Voltio(s). El voltio es la unidad de medida del potencial eléctrico, la diferencia de potencial o la fuerza electromotriz en el Sistema Internacional de Unidades.

Vmáx. Velocidad máxima. La velocidad máxima de una reacción catalizada por una enzima ocurre cuando en la condición experimental la enzima se encuentra saturada por la concentración de sustrato. De forma experimental se accede a condiciones de velocidad máxima cuando se supera en más de diez veces la concentración de sustrato del parámetro K_M o $K_{0,5}$.

WB. Del inglés *western blot*. Técnica utilizada para la detección de proteínas en una muestra. Primero se corre la muestra en gel electroforético donde se separan las moléculas por peso y por carga; luego se transfiere a una membrana donde, mediante el uso de anticuerpos que detectan la proteína de interés, se identifica la presencia de la proteína.

Esta publicación cuenta con el apoyo de la Comisión Sectorial de Enseñanza y Educación Permanente.
Forma parte de la serie Manuales de Aprendizaje, que tiene como objetivo mejorar las condiciones de aprendizaje de las y los estudiantes y, al mismo tiempo, propiciar la autoformación docente mediante la reflexión sobre sus prácticas y sobre el estado del arte en su disciplina. Secundariamente, esta publicación pretende colaborar en la constitución de tradiciones disciplinares y culturas educativas nacionales.

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

Prorrectorado de **Enseñanza**

ISBN: 978-9974-0-2372-7