

# FRACCIONAMIENTO DE TEJIDOS E IDENTIFICACIÓN DE SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES

Gabriel Castro, Juan Barbosa <sup>†</sup>

*Departamento de Química. <sup>†</sup> Departamento de Física. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.*

**ABSTRACT:** The extraction and analysis of biological components such as carbohydrates, lipids and proteins is of vital importance for medicine and biochemistry. Because of this importance, qualitative tests have been developed, such as Lugol, Molish, Saponification, Benedict, Biuret and Ninhydrin, being these the ones studied on this document using animal tissues, to identify the presence of carbohydrates, lipids and proteins in the different samples. In order to isolate these compounds we carried out a tissue fractionation using centrifuge related procedures. Results show the presence of carbohydrates, lipids and proteins in all the studied samples. Nevertheless there are contradicting results associated to specific tests and samples, that made impossible to accurately relate the results from the different tissues.

## ■ INTRODUCCIÓN

La extracción y/o análisis de componentes biológicos cómo lo son los carbohidratos, los lípidos y las proteínas es de vital importancia para la medicina y la bioquímica, ya que permite detectar ciertas enfermedades o caracterizar la composición de diferentes órganos para ver estos cómo pueden ser afectados por diferentes agentes externos. Muchas de las técnicas de análisis de estos componentes son de carácter cualitativo, y dependen de cambios de color o de apariencia para comprobar la presencia de estos compuestos en diversas muestras orgánicas.

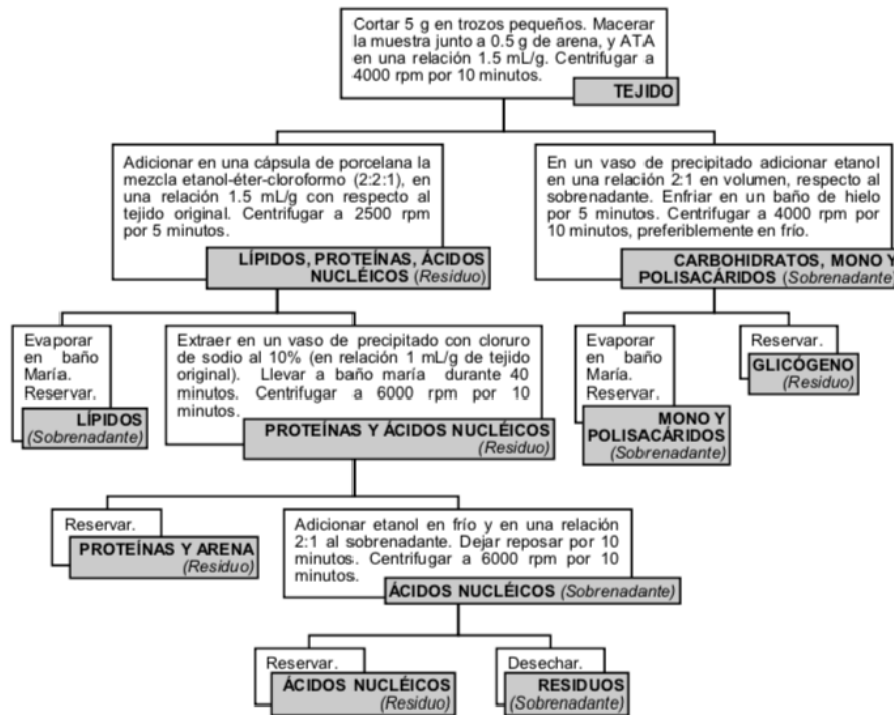
La técnica más antigua relevante a este trabajo es la saponificación. La saponificación es un método usado desde la antigüedad para fabricar jabón, en el cual se convierten ácidos grasos en sales metálicas de estos mismos ácidos [1], los cuales son usados como jabón debido a que estas sales tienen tanto una parte hidrofóbica como una parte hidrofílica [1]. Al formarse un producto fácilmente observable al ser agitado en solución acuosa, el proceso de saponificación es útil para el análisis cualitativo de lípidos [2]. Este proceso también puede ser utilizado para la separación de metales de tierras raras [3]. Cronológicamente sigue la prueba con el reactivo de Lugol, desarrollado en 1829 por el químico francés Jean Lugol [4] el cual tiene diversos usos médicos cómo la detección de cáncer de cerviz [5], la detección de displasia esofágica [6] y la disminución de sangrado intraoperatorio [7]. Este reactivo es utilizado tanto para estas pruebas médicas como indicador de carbohidratos debido a que el yodo presente en el reactivo se añade a la estructura de polisacáridos, polisacáridos cuya concentración disminuye en tejido enfermo como el tejido del cáncer de cerviz.

La siguiente es la prueba de Biuret, descrita por el científico polaco Gregor van Piotrowski en 1857 [8] la cual es usada para la determinación de proteínas en muestras biológicas al formarse complejos de coordinación morados en presencia de péptidos [9]. La prueba de Biuret es utilizada para cuantificar la proteína en suero biológico con incertidumbres aceptables [10] y para la detección de proteínas en acero quirúrgico con tal de prevenir la transmisión de priones iatrogénicos [11].

Sigue la prueba Liebermann-Burchard, desarrollada entre 1885 y 1889 [12] utilizada para la detección de lípidos, principalmente colesterol, en muestras orgánicas [13]. En la prueba el ácido sulfúrico reacciona con el grupo hidroxilo del colesterol para formar colestapolenos conjugados que dan la coloración verde esperada [12, 14]. En la actualidad también se utiliza la prueba de Zak, la cual tiene un mecanismo de oxidación similar al de la prueba Liebermann-Burchard pero utiliza  $\text{Fe}^{3+}$  para formar colestapolenos de color rojo [14].

Entre 1908 y 1910 se desarrollaron 3 diferentes métodos de análisis de diversos componentes biológicos, el primero de estos fue la prueba de Benedict, desarrollada en 1908 [15] por el químico estadounidense Stanley Benedict. Esta prueba es utilizada para identificar azúcares reductores simples debido a que estas azúcares pueden reducir el  $\text{Cu(II)}$  presente en el reactivo de benedict a  $\text{Cu(I)}$  [16], causando un cambio de coloración de azul a rojo intenso.

El segundo de estos métodos desarrollados a principios del siglo XX fue la prueba de Molisch, cuyo principio básico fue investigado por Van Ekestein y Blanksma en 1909 [17]. La prueba requiere de la formación de furfural o 5-hidroximetilfurfural a partir de pentosas y hexosas respectivamente, las cuales se unen a moléculas de  $\alpha$ -naftol presentes en el reactivo para formar un compuesto con coloración morada [18].



**Figura 1.** Procedimiento realizado para el fraccionamiento del tejido.

El último de estos métodos de análisis de componentes biológicos de muestras biológicas es la prueba con Ninhidrina, cuyo reactivo principal fue descubierto por el químico alemán Siegfried Ruhemann en 1910 [19, 20]. La ninhidrina reacciona con el grupo amino de los aminoácidos para formar un producto de coloración morada, el cual es conocido como morado de Ruhemann. Puede ser usado tanto cualitativamente como cuantitativamente, siendo la ninhidrina utilizada para detectar glifosatos con espectroscopía Raman [21], para realizar secuenciación de péptidos [22] y para determinar el sexo de una persona a partir de residuos encontrados en huellas dactilares [23].

Todos estos métodos varían en términos de especificidad y precisión, pero todos son útiles a la hora de determinar la presencia de los diversos compuestos que se desean encontrar en diferentes tejidos humanos y animales, por lo que el objetivo del presente es demostrar la presencia de diversas clases de carbohidratos, lípidos y proteínas en muestras biológicas y compararlas en función de su composición.

## ■ SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 1.1 Preparación de las soluciones

Se prepararon las soluciones como se describe a continuación:

1. **Ácido clorhídrico al 10 % v/v:** Se tomaron 2.7 mL de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y se llevó a 10 mL con agua.

2. **Hidróxido de sodio al 15 % p/v:** Se tomaron 1.5 g de hidróxido de sodio y se llevó a 10 mL con agua.
3. **Reactivo de Benedict:** Se pesaron 0.18 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado, 0.5 g de carbonato de sodio y 0.85 g de citrato de sodio, y se llevó a 10 mL de agua. Agite bien.
4. **Reactivo de Biuret:** Se disolvieron 15 mg de sulfato de cobre (II) pentahidratado y 60 mg de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, en 5 mL de agua. Se añadió luego 2 mL de la solución de hidróxido de sodio al 15 % preparada anteriormente. Posteriormente se adicionó 10 mg de yoduro de potasio. Finalmente se llevó a 10 mL con agua. El reactivo fue almacenado en una botella ámbar pequeña.
5. **Reactivo de Molisch:** Se disolvieron 0.1 g de  $\alpha$ -Naftol en 1 mL de etanol absoluto.
6. **Lugol:** Se disolvieron 18 mg de yodo sólido en polvo y 32 mg de yoduro de potasio en polvo en 5 mL de agua. Se agitó vigorosamente hasta la disolución completa de los reactivos. Se cubrió el beaker con papel aluminio.
7. **Nihidrina al 0.2 %:** Se disolvieron 10 mg de ninhidrina en 5 mL de etanol absoluto.
8. **Cloruro de sodio al 10 %:** Se tomó 1 g de cloruro de sodio y se llevó a 10 mL con agua.

9. **Éter-Etanol-Cloroformo (2:2:1):** Se Mezclaron 4 mL de éter etílico, 4 mL de etanol absoluto y 2 mL de cloroformo.
10. **Ácido tricloroacético al 10 %:** Se pesó 1 g de ácido tricloroacético y se llevó a 10 mL con agua.

## 1.2 Fraccionamiento del tejido

Se realizó el fraccionamiento de los órganos por grupos independientes siguiendo la [Figura 1](#). Los órganos estudiados de manera independiente por los grupos de laboratorio, incluyen: hígado de res, cerebro de res, hígado de pollo y corazón de pollo.

## 1.3 Pruebas de identificación

Con las muestras obtenidas se realizaron las siguientes pruebas de identificación:

### 1.3.1 Análisis de carbohidratos

La muestra se dividió en cuatro fracciones:

1. A la primera se le agregaron 3 gotas de Lugol y se observó el cambio de coloración de la muestra.
2. A la segunda se le adicionó 1 mL de la solución de ácido clorhídrico al 10% y se colocó al baño María por 25 minutos. Se dejó enfriar y se agregaron 3 gotas de Lugol, se observó el cambio de coloración de la muestra.
3. A la tercera se le adicionó 1 mL de agua destilada y 3 gotas del reactivo de Molisch. Luego se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado sin mezclar las dos fases formadas. Se observó la coloración de la muestra.
4. Se ubicó la cuarta fracción al baño María por 2 minutos, luego se adicionaron 2 mL del reactivo de Benedict. Se observó la coloración en ese momento y 10 minutos después de dejarse en calentamiento.

### 1.3.2 Análisis de lípidos

La muestra se dividió en 2 fracciones:

1. A la primera se le adicionó 3 mL de cloroformo y se mezcló. Luego se adicionó 1 mL de anhídrido acético. Tras esto se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico. Se observó la coloración de la interfase tras 1 minuto, y después de 15 minutos.
2. A la segunda se le agregaron 3 mL de hidróxido de sodio al 15%. Luego se ubicó al baño maría durante 20 minutos. Finalmente se adicionaron 3 mL de agua destilada y se agitó fuertemente.

### 1.3.3 Análisis de proteínas

La muestra se dividió en 2 fracciones:

1. A la primera se le adicionó 1 mL de agua destilada y se suspendió la muestra. Se agregó 1 mL del reactivo de Biuret y se observó el cambio de coloración.

2. A la segunda se le agregó 1 mL de la solución de ninhidrina y se calentó al baño María por 10 minutos.

## ■ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos para el análisis de carbohidratos, los cuales se muestran en la [Tabla 1](#), se pudo descartar la presencia de polisacáridos en la muestra, puesto que no se observó el cambio de coloración en la muestra a causa de la adición del Lugol. Lo anterior debido a que esta última es producto de la introducción del yodo, presente en el reactivo, en la estructura molecular de los polisacáridos, por lo que no es posible identificar monosacáridos por medio de esta prueba. Adicionalmente, los resultados obtenidos con la segunda muestra, luego del tratamiento con ácido clorhídrico, permiten confirmar la ausencia de polisacáridos en la misma, puesto que los enlaces glucosídicos se hidrolizan con facilidad por acción de ácidos como el ácido clorhídrico, al ser un ácido prótico que promueve la hidrólisis de la unión covalente del enlace glucosídico de los carbohidratos presentes en la muestra, por lo que la ausencia de coloración es congruente con los resultados obtenidos anteriormente.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la prueba con Lugol sólo permite la identificación o presencia de polisacáridos en una muestra, por lo que se llevó a cabo una tercera prueba por medio de la adición del reactivo de Molisch. Se observó la formación de un anillo de color morado en la interfase de las dos fases distinguibles, puesto que en general los azúcares se deshidratan en presencia del ácido sulfúrico concentrado, promoviendo de esta manera la formación de compuestos furfúricos que reaccionan con el alfa naftol presente en el reactivo de Molisch, causando la coloración observada; de manera que se puede confirmar la presencia de carbohidratos en la muestra. Adicionalmente, la falta de coloración del medio en la cuarta muestra nos permite confirmar la ausencia de azúcares reductores (esto sería teniendo en cuenta que reportaron mal los resultados y en realidad había una tenue coloración azul). Sin embargo, fue posible observar que los resultados diferían en otros grupos durante la experimentación, para los cuales el cambio de color variaba entre azul y verde, lo que se puede explicar porque los grupos reductores aldehídos de algunos azúcares reducen los iones de Cobre a Oxido Cuproso bajo la acción del calor y en medio alcalino, produciendo un cambio en el color del medio desde azul, pasando por verde, naranja y rojo, lo cual depende directamente de la concentración de sustancias reductoras en la muestra y para lo cual se interpreta el azul como negativo, el verde como la presencia de trazas y el amarillo, naranja y rojo como positivo. Cabe resaltar que existe una relación positiva entre los resultados de cada grupo, a pesar de diferir entre sí, por lo que se puede confirmar la ausencia de azúcares reductores en la muestra.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos para los distintos tejidos con las pruebas específicas a carbohidratos.

Tejido	1. Prueba Lugol	2. Prueba ácido + lugol	3. Reacción de Molish	4. Reacción de Benedict
<b>Hígado de pollo</b>	La solución inicial de coloración amarilla no presentó ningún cambio	Tampoco se evidenció algún cambio en la solución	Se observó la formación de un anillo color violeta	La solución inicial presentaba una coloración azul. Se observó la formación de un precipitado verde
<b>Hígado de pollo</b>	La coloración amarilla de la solución inicial se mantuvo, la prueba no dió	Tampoco dió	Se observó la formación del anillo morado esperado	No se observó el cambio de coloración esperado o la formación de un precipitado verde, la prueba no dió
<b>Hígado de res</b>	La solución no cambio su coloración amarilla inicial, pero en la parte inferior del tubo se tornó amarillo mas intenso	La solución tampoco cambio su coloración amarilla inicial, y la parte inferior del tubo también se tornó amarillo mas intenso	Se observó la formación de un anillo color morado en la parte inferior	Primero se observó una coloración azul tenue en la parte superior y azul fuerte en la parte inferior del tubo. Después de calentamiento tomo una coloración verde tenue en la parte superior y fuerte en la inferior.
<b>Hígado de res</b>	La solución tomó un color amarillo pálido correspondiente a la adición del reactivo, no se observa ningún cambio	No se observa un cambio aparente con respecto a su color inicial (amarillo pálido)	Se observa la formación de un anillo de color morado entre las fases presentes	La muestra es incolora, al adicionar el reactivo toma un color azul y luego de 10 minutos de calentamiento vira al verde
<b>Corazón de pollo</b>	La solución arrojó una coloración cafe rojizo	Color amarillo sin algun cambio representativo	Se formaron dos fases y un anillo violeta	No hubo precipitado, ni cambio de color
<b>Corazón de pollo</b>	La solución se mantuvo amarilla, no hubo cambio en la coloración	No se vio cambio de color	Se formaron dos fases y en la interfase se vio un anillo morado	No reacciona. Sin cambio de color y sin precipitado rojo.
<b>Cerebro de res</b>	No dió	Inicialmente se presentó una coloración amarilla en el fondo, la cual fue desapareciendo con el tiempo.	Se observó la formación de un anillo color amarillo tenue.	La prueba arrojó coloración azul
<b>Cerebro de res</b>	No se observó un cambio de color	No se observó un cambio de color	Se observó la formación de dos fases. La fase que estaba en la parte más superficial se tornó de un color rojo. Tras la adición de una mayor cantidad de ácido sulfúrico se observó lentamente la formación del anillo color negro en la interfase	No se observó un cambio de color

Por otro lado, en cuanto a las pruebas realizadas para lípidos, las cuales se observan en la [Tabla 2](#), fue posible observar una congruencia general en los resultados obtenidos por todos los grupos. En el caso de la prueba de Salkowsky el anhídrido acético puede reaccionar con el colesterol y otros esteroides en presencia de ácidos fuertes, formando de esta manera un complejo verde-azul al reaccionar con el grupo hidroxilo del compuesto presente en la muestra, por otro lado, es posible determinar la presencia de ácidos grasos en una muestra por medio de la adición de hidróxido de sodio para dar lugar a la saponificación de los mismos, lo cual da lugar a la formación de miscelas, las cuales dependiendo de su concentración pueden observarse como otra fase, con características de viscosidad distintas a la fase acuosa, como reporta un grupo con hígado de pollo.

Finalmente, para las proteínas se obtuvieron los resultados que se muestran en la [Tabla 3](#). En particular, se puede observar que todas las pruebas de Biuret dieron positivas, esto se debe a que el cobre (II) en solución básica reacciona con las aminas de los enlaces peptídicos, dando lugar a un complejo de coordinación, en donde los pares electrónicos libres del nitrógeno forman enlaces de coordinación con el átomo de cobre que acepta la densidad electrónica, como se observa en el [Esquema 1](#).

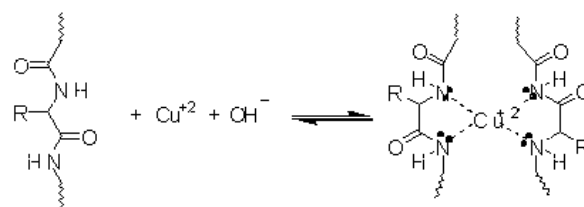
Respecto a la prueba con ninhidrina, tanto para el hígado de pollo, e hígado de res, los resultados se contradicen entre ellos. Si bien ambas pruebas son generales, para las proteínas se debe tener en cuenta, que en el caso de la ninhidrina, la reacción ocurre únicamente con el residuo terminal de un polipéptido, específicamente con el grupo amino libre. La reacción se muestra en el [Esquema 2](#), y procede de la

**Tabla 2.** Resultados obtenidos para los distintos tejidos con las pruebas específicas a lípidos.

Tejido	1. Prueba Salkowsky	2. Prueba NaOH
Hígado de pollo	Se observó la formación de dos capas, la superior de color verde claro y la inferior rojiza	Se observó la formación de dos capas, la superior con textura espesa. Tras calentar se tornó rojiza.
Hígado de pollo	No se observó la formación de las dos fases esperadas, la prueba no dió	Se observó un cambio de coloración a un color verde oscuro, el cual cambió a café al calentarse, la prueba dió.
Hígado de res	Se observó la formación de dos capas, la superior verde muy tenue casi blanco, la inferior café claro y una pequeña capa café oscura entre las dos anteriores	Al inicio se tenían tres capas de coloración vinotinto, rojiza y amarilla muy tenue, pero después de calentamiento tomó una coloración café/verde
Hígado de res	La muestra presenta una coloración rojiza luego de la adición del ácido, cuando se calienta se torna de color café	Se observa en un inicio una solución de color rojo intenso, a medida que se calentó tomó un color verde
Corazón de pollo	Se observó la formación de dos capas: de color café claro y blanco	Se observó una solución poco turbia y de color café verdoso
Corazón de pollo	Al minuto se vio la formación de dos fases separadas por un anillo naranja. Después de 15 minutos el anillo se había tornado café	La solución se volvió verde, con el calentamiento se tornó café y finalmente volvió a tomar coloración verdosa
Cerebro de res	No se observó precipitado	La muestra cambió a verde, al calentar se tornó café y por último volvió a verde
Cerebro de res	Tras la adición de cloroformo se formaron dos fases y la muestra se tornó color pastel. Después de adicionar anhídrido acético se obtuvo una fase. Finalmente, al agregar ácido sulfúrico se observa la formación de una tercera fase con un anillo color negro en la interfase	Al agregar NaOH la muestra cambió a un color verde. Conforme el tiempo pasó, se formaron dos fases. La superior con un color verde oscuro y la inferior con un color verde claro. Con calentamiento la fase superior cambió a color rojo mientras que la inferior cambiaba lentamente a un color amarillo. Finalmente, tras la adición de agua y agitación se formaron dos fases: una verde uniforme y otra blanca de apariencia espumosa.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos para los distintos tejidos con las pruebas específicas a proteínas.

Tejido	1. Prueba de Biuret	2. Prueba de Ninhidrina
Hígado de pollo	La solución se tornó color violeta	La solución se tornó color violeta
Hígado de pollo	La solución se tornó color violeta	No hubo cambio de color
Hígado de res	La solución se tornó color violeta	La solución se tornó color violeta
Hígado de res	La solución se tornó color violeta	No hubo cambio de color
Corazón de pollo	La solución se tornó color violeta	No hubo cambio de color
Corazón de pollo	La solución se tornó color violeta	No hubo cambio de color
Cerebro de res	La solución se tornó color violeta	La solución se tornó color violeta
Cerebro de res	La solución se tornó color violeta	Inicialmente se observó la formación de una fase color anaranjado. Finalmente, tras un tiempo se observó la formación de una fase color morado con mayor extensión a la naranja

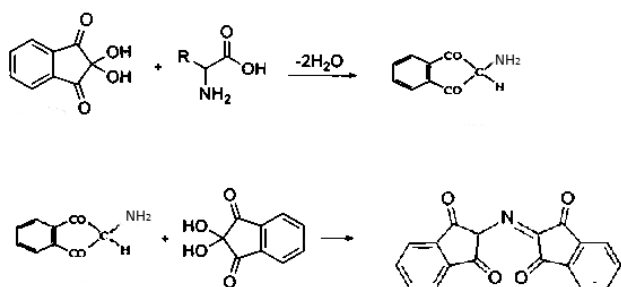
**Esquema 1.** Reacción de Biuret.

Sin embargo, por ejemplo para el caso del cerebro de res, es posible que la reacción haya tenido lugar inicialmente con prolina, puesto que a partir de este aminoácido se obtiene un compuesto anaranjado.

Una posible explicación al por qué los resultados de la ninhidrina contradicen los de Biuret, se encuentra relacionada con la concentración de los cromóforos, dado que la prueba de Biuret puede reaccionar potencialmente con todos los enlaces peptídicos de la muestra, mientras que la ninhidrina únicamente reacciona una vez con cada polipéptido.

siguiente manera: la ninhidrina oxida y desamina el aminoácido, formando 2-amino-1,3-indandiona, la cual posteriormente reacciona con una nueva molécula de ninhidrina, dando lugar a la formación del cromóforo violeta de Rheumann's.





**Esquema 2.** Reacción de los aminoácidos con la ninhidrina.

## ■ CONCLUSIONES

Fue posible determinar la presencia de carbohidratos, lípidos y proteínas por duplicado para hígados de pollo y res, corazón de pollo y cerebro de res. En el caso de los carbohidratos, en general la prueba de Lugol fue negativa en todos los casos, salvo por una muestra de corazón de pollo, mientras que Molish siempre fue positivo sin importar el grupo ni el tejido confirmando la presencia de carbohidratos. La prueba de Benedict fue positiva para el hígado de res de manera consistente, sin embargo, para el hígado de pollo se obtuvieron resultados contradictorios, de manera análoga a la prueba de Salkowsky. Finalmente, en el caso de las proteínas, se pudo determinar la presencia de las mismas en los tejidos usando la prueba de Biuret, la cual dio positiva en todos los casos, mientras que la reacción con ninhidrina en el caso del hígado de pollo tuvo resultados contradictorios. Para terminar, se argumenta que no es posible una comparación entre tejidos, si los resultados para un mismo tejido, en una prueba cualitativa da lugar a distintas conclusiones, razón por la cual, no se discute al respecto.

## ■ REFERENCIAS

- [1] Walter C Preston. The modern soap industry. *Journal of Chemical Education*, 2(11):1035, 1925.
- [2] Hugo AL Souza, Lilian RB Mariutti, and Neura Braganolo. Microwave assisted direct saponification for the simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in shrimp. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 169:88–95, 2017.
- [3] Yamin Dong, Xiaoqi Sun, Yanliang Wang, Chao Huang, and Zeyuan Zhao. The sustainable and efficient ionic liquid-type saponification strategy for rare earth separation processing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3):1573–1580, 2016.
- [4] Walter Sneider. *Drug discovery: a history*. John Wiley & Sons, 2005.
- [5] Emil Novak. Pseudomalignant and precancerous lesions of the cervix. *Journal of the American Medical Association*, 108(14):1145–1151, 1937.
- [6] Jingjing Li, Ruiping Xu, Mengfei Liu, Hong Cai, Changqi Cao, Fangfang Liu, Fenglei Li, Chuanhai Guo, Yaqi Pan, Zhonghu He, et al. Lugol chromoendoscopy detects esophageal dysplasia with low levels of sensitivity in a high-risk region of china. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(10):1585–1592, 2018.
- [7] Yeliz Yilmaz, Kemal Erdinc Kamer, Orhan Ureyen, Erdem Sari, Turan Acar, and Onder Karahalli. The effect of preoperative lugol's iodine on intraoperative bleeding in patients with hyperthyroidism. *Annals of medicine and surgery*, 9:53–57, 2016.
- [8] Gustav von Piotrowski. *Eine neue Reaction auf Eiweisskörper und ihre näheren Abkömmlinge:(Mitthlg adkk physiol. Inst.?? Krakau.)(Aus d. Aprilh. 1857 d. Sitzgsber. dm-nat. Cl. der k. Ak. d. Wiss. XXIV. Bd. S. 335)*. 1857.
- [9] Ferdinand Rose. Ueber die verbindungen des eiweiss mit metalloxyden. *Annalen der Physik*, 104(5):132–142, 1833.
- [10] Kangle Zheng, Liqing Wu, Zhangjing He, Bin Yang, and Yi Yang. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement*, 112:16–21, 2017.
- [11] IP Lipscomb, HE Pinchin, R Collin, K Harris, and CW Keevil. The sensitivity of approved ninhydrin and biuret tests in the assessment of protein contamination on surgical steel as an aid to prevent iatrogenic prion transmission. *Journal of Hospital Infection*, 64(3):288–292, 2006.
- [12] Quanbo Xiong, William K Wilson, and Jihai Pang. The liebermann–burchard reaction: sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids*, 42(1):87–96, 2007.
- [13] M Carmo Barreto. Lipid extraction and cholesterol quantification: A simple protocol. *Journal of chemical education*, 82(1):103, 2005.
- [14] RW Burke, BI Diamondstone, RA Velapoldi, and O Menis. Mechanisms of the liebermann–burchard and zak color reactions for cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(7):794–801, 1974.
- [15] Stanley R Benedict. A reagent for the detection of reducing sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 5(5):485–487, 1909.
- [16] Ralph Daniels, Clyde C Rush, and Ludwig Bauer. The fehling and benedict tests. *Journal of Chemical Education*, 37(4):205, 1960.
- [17] W Alberda van Ekenstein and JJ Blanksma. Über das  $\omega$ -oxymethyl-furfurol als ursache einiger farbreaktionen der hexosen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 43(2):2355–2361, 1910.

- [18] Arthur W Devor. Carbohydrate tests using sulfonated  $\alpha$ -naphthol. *Journal of the American Chemical Society*, 72(5):2008–2012, 1950.
- [19] Siegfried Ruhemann. Cxxxii.-cyclic di-and tri-ketones. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 97:1438–1449, 1910.
- [20] Siegfried Ruhemann. Ccxii.-triketohydrindene hydrate. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 97:2025–2031, 1910.
- [21] Meng-Lei Xu, Yu Gao, Yali Li, Xueliang Li, Huanjie Zhang, Xiao Xia Han, Bing Zhao, and Liang Su. Indirect glyphosate detection based on ninhydrin reaction and surface-enhanced raman scattering spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 197:78–82, 2018.
- [22] Mendel Friedman. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(3):385–406, 2004.
- [23] Erica Brunelle, Crystal Huynh, Anh Minh Le, Lenka Halamkova, Juliana Agudelo, and Jan Halamek. New horizons for ninhydrin: Colorimetric determination of gender from fingerprints. *Analytical chemistry*, 88(4):2413–2420, 2016.