

FRACCIONAMIENTO DE TEJIDOS E IDENTIFICACIÓN DE SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES

Gabriel Castro, Juan Barbosa [†]

Departamento de Química. [†] Departamento de Física. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

ABSTRACT:

■ 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 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 Cu(II) presente en el reactivo de benedict a 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 α -naftol presentes en el reactivo para formar un compuesto con coloración morada [18].

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.

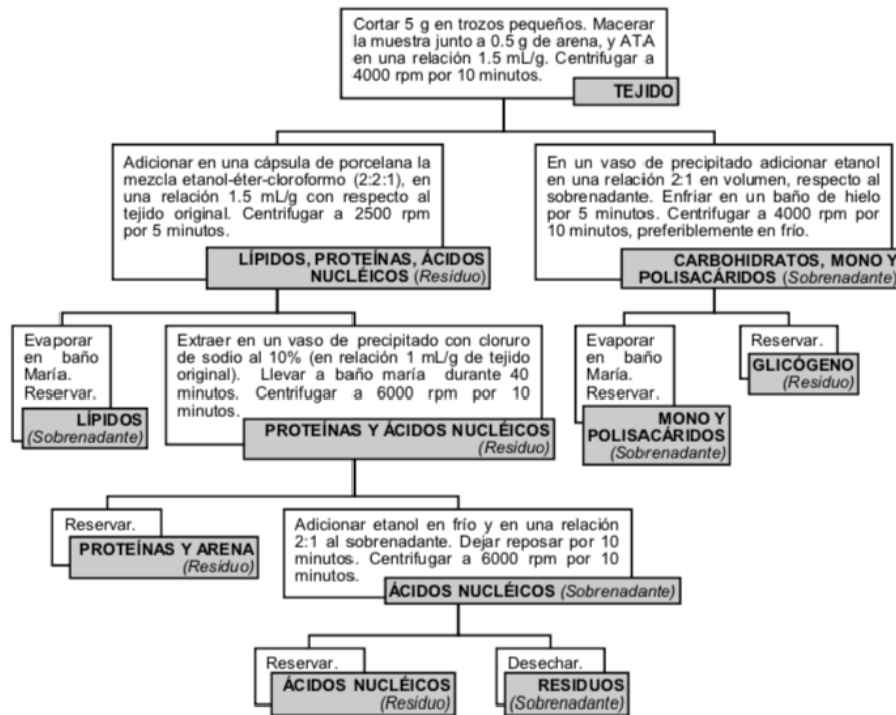


Figura 1. Procedimiento realizado para el fraccionamiento del tejido.

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 α -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 nihidrina 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

■ CONCLUSIONES

■ 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 Sneader. *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 ω -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 α -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.