

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES

Guía de Trabajos Prácticos
QUÍMICA BIOLÓGICA
FISIOLOGÍA VEGETAL
ASPECTOS
INTERDISCIPLINARIOS

TERESA ARGÜELLES Y ANDRÉS
RICARDO E. CALLABA

ELDORADO - MISIONES - 2008



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

San Luis 1870

Posadas - Misiones – Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra

Coordinación de la edición: Nicolás Capaccio

Armado de interiores y tapa: Roberto Acuña

Corrección: Hedda Giraudó

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Universidad Nacional de Misiones

Posadas, 2004

De los autores:

Teresa Argüelles y Andrés obtuvo su Licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Literaria de Valencia; su Maestría en Ciencias en la Universidad de Florida (Gainesville). Es profesora titular de Química Biológica y Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones. Su área de especialización en investigación es en la Química de Proteínas.

Ricardo Eugenio Callaba es Técnico Agrónomo. Docente de la Escuela Aerotécnica de Eldorado y de la Facultad de Ciencias Forestales. Su área de especialización es la investigación sobre el cultivo de hongos comestibles.

La compaginación y diagramación de este trabajo, así como las ilustraciones, han estado a cargo del Sr. Nicolás Gustavo Rudolph, profesor en Disciplinas Tecnológicas, egresado del Instituto Superior del Profesorado Tecnológico de Córdoba. Actualmente es alumno avanzado de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales.

ÍNDICE

QUÍMICA BIOLÓGICA

Ácidos carboxílicos secuestradores	7
Reconocimiento de grupos aldehído y cetona	11
Pruebas generales para la identificación de carbohidratos	15
Determinación cuantitativa de azúcares por el método de Bertrand	20
Pruebas para la sacarosa: inversión de la sacarosa y detección del fenómeno por medios diversos	23
Hidrólisis ácida del almidón	25
Identificación de los productos de la hidrólisis ácida del almidón mediante cromatografía ascendente en papel	27
Saponificación-pruebas para ácidos grasos	31
Prueba para el glicerol	33
Método semi-industrial para la obtención de jabón	34
Reacciones de caracterización de proteínas	36
Algunas características de las proteínas	41
Medida de la actividad enzimática de las peroxidases	45
Actividad enzimática de la alfa-amilasa	49
Medida de la actividad enzimática de la catalasa	52
Actividad enzimática de las pectinesterasas	56
Actividad enzimática de la fosfatasa ácida	59
Inactivación de enzimas	62
Algunos aspectos de la cinética de la acción enzimática	64
Estudio de la hidrólisis ácida de una proteína mediante cromatografía	67
Identificación de un aminoácido problema mediante separación por cromatografía sobre papel	70
Aislamiento de ADN a partir de bazo de cerdo	72
Separación de nucleótidos mediante electroforesis utilizando el método de Markham y Smith	74
Reacciones histoquímicas para la caracterización y el dosaje de los ácidos nucleicos en tejidos	77
Reacciones químicas utilizadas para el dosaje de los ácidos nucleicos	
a) Dosaje de los azúcares	79
b) Precipitación de los ácidos nucleicos como sales de lantano	81

FISIOLOGÍA VEGETAL

Ósmosis, difusión y permeabilidad de membrana	85
Determinación de la transpiración	88
Determinación de potencial agua	91

Medida y cálculo del espacio libre aparente (ELA)	94
Análisis de la composición química de los vegetales	96
a) sodio y potasio por fotometría de llama	98
b) determinación de nitrógeno total	101
c) determinación de polisacáridos estructurales (fibra)	104
d) determinación de grasas	105
Carencias de elementos minerales en plantas	107
Velocidad de descomposición de restos vegetales	110
Medición del crecimiento	112
Efecto de los reguladores químicos sobre la senescencia de las hojas	114
Efecto de la longitud de onda de la luz visible sobre la regulación del crecimiento: El fitocromo	117
Método de la media hoja de Sach para medir fotosíntesis y respiración	118
Reacción de Hill: fotorreducción en los cloroplastos	119
Determinación del punto de compensación luminoso	121
Consumo de oxígeno durante la respiración	122
Test de viabilidad de semillas: lixiviación de nutrientes al medio	124
Test de viabilidad de semillas empleando el cloruro de tetrazolio	126
Cultivo "in vitro" de células y tejidos. Meristemas apicales	135
Injertos	137
Medida y control del medio ambiente	140
 ASPECTOS INTERDISCIPLINARIOS	
Microbiología del suelo	143
Análisis cualitativo de la microflora total de un suelo	147
Fijadores simbióticos de nitrógeno atmosférico: aislamiento y cultivo de <i>Rhizobium</i> a partir de nódulos	148
Análisis cualitativo de <i>Azotobacter</i>	149
Análisis cuantitativo de <i>Azotobacter</i>	151
Fijadores anaeróbicos de nitrógeno atmosférico género <i>Clostridium</i>	153
Presencia de <i>Actinomicetos</i> en el suelo	154
Poder amonificante de los suelos	155
Poder nitrificante de un suelo	157
Poder desnitrificante de un suelo	159
Poder proteolítico de un suelo	160
Poder amilolítico de un suelo	161
 BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	
	162



**Química
Biológica**

AGENTES QUELANTES

ÁCIDOS CARBOXÍLICOS SECUESTRADORES

Objetivo

Los secuestradores químicos son compuestos que poseen la propiedad de unirse a los iones metálicos, formando moléculas estables y solubles llamadas quelatos.

Al añadir un secuestrador adecuado a una solución de un determinado metal, desaparecen las propiedades características de dicho metal, y a pesar de que el metal sigue en la solución, no reacciona con la mayoría de los reactivos que normalmente sirven para identificarlo: el metal está secuestrado.

En los quelatos, el ion metálico se encuentra unido por dos o más enlaces, formando con el agente quelante una estructura en anillo. La forma de estos compuestos se compara con la de un cangrejo que sostiene un objeto con sus pinzas: el cuerpo del cangrejo es el quelante; las pinzas, unas agrupaciones atómicas que se dirigen hacia el metal; y este, el objeto atenazado. Estas características hacen de los agentes secuestradores elementos de gran utilidad en numerosos campos de la ciencia y de la técnica.

Estructuras quelantes típicas son las de los ácidos: dibásicos inorgánicos, dicarboxílicos, orgánicos disulfónicos, ácidos alfa-hidroxicarboxílicos y alfa-aminocarboxílicos, alfa-hidroxioximas, compuestos beta-hidroxicarbonílicos.

En la presente práctica se verán algunos aspectos de la acción de estas sustancias.

Materiales

Gradilla con ocho tubos de ensayo. Solución de EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), solución de ácido tartárico, solución de una sal de hierro, solución de una sal de calcio, sulfocianuro potásico o ferrocianuro potásico, solución de oxalato potásico, solución de ácido cítrico.

Procedimiento

Poder secuestrador del EDTA

Se toman cuatro tubos de ensayo y se numeran del uno al cuatro.

En los tubos 1 y 2 se introducen 3 ml de solución de sal de hierro, y en los tubos 3 y 4, 3 ml de solución de la sal de calcio.

Se toman los tubos 1 y 3, y se añade a ellos 0.5 ml de la solución de EDTA, se agita. A los tubos 2 y 4 que se tratan como blancos se les añade 0.5 ml de agua, y se agita.

A continuación se toman los tubos 1 y 2 y se añade, a cada uno de ellos, dos gotas de la solución de sulfocianuro o ferrocianuro potásico. Se observan los resultados.

Se toman los tubos 3 y 4, y se añade a cada uno dos gotas de solución de oxalato potásico. Se observan los resultados.

I	II	III	IV
3 ml de sal de Fe	3 ml de sal de Fe	3 ml de sal de Ca	3 ml de sal de Ca
0.5 ml de EDTA	0.5 ml de agua	0.5 ml de EDTA	0.5 ml de agua
2 gotas de sulfocianuro de potasio	2 gotas de sulfocianuro de potasio	2 gotas de oxalato potásico	2 gotas de oxalato potásico

Otros secuestradores

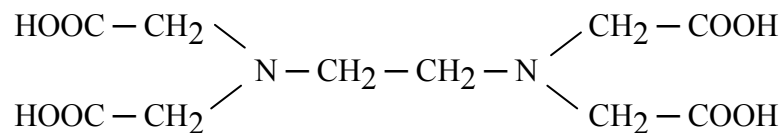
Se toman dos tubos de ensayo y se numeran. Se introduce en cada uno de ellos 3 ml de la solución de la sal de calcio. Se añade a uno de los tubos 1 ml de disolución de ácido tartárico y se agita. Al otro tubo la misma cantidad de agua (blanco), y se agita. Se agregan a ambos tubos 2 gotas de solución de oxalato potásico. Se observan los resultados.

I	II
3 ml de sal de Ca	3 ml de sal de Ca
1 ml de ácido tartárico	1 ml de agua
2 gotas de oxalato de potasio	2 gotas de oxalato de potasio

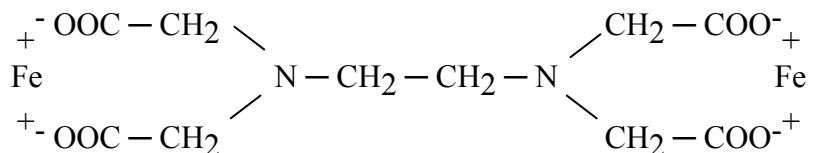
Se repite la experiencia usando ácido cítrico en lugar de ácido tartárico. Se observan los resultados.

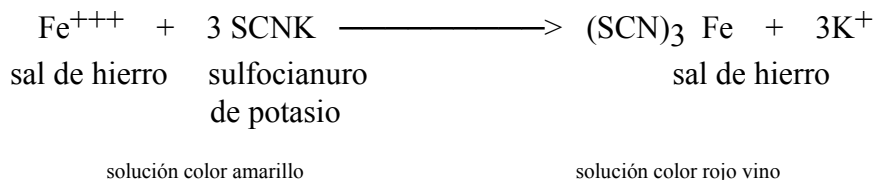
Fórmulas y reacciones

EDTA (ácido etilen- diamino- tetra-acético)



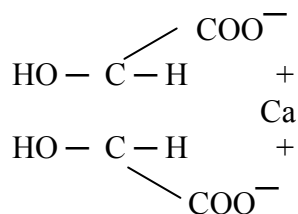
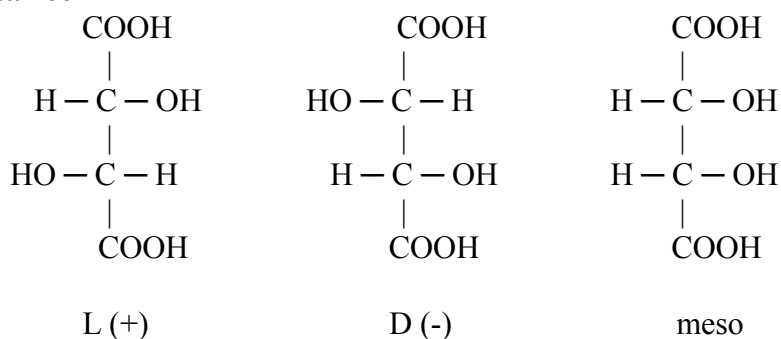
EDTA Fe₂





¿Cuando el Fe está secuestrado por el EDTA, hay cambio de color?

Ácido tartárico



Acido tartárico como secuestrador

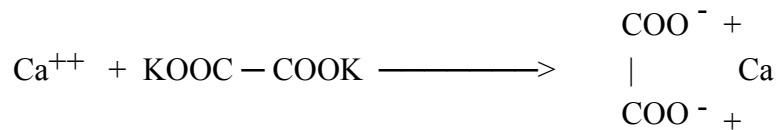
Acido oxálico



Oxalato potásico



la reacción con el calcio:

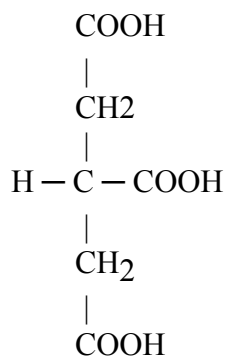


Blanco transparente

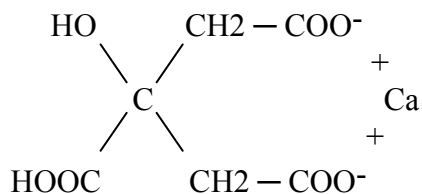
Enturbiamiento blanco

¿Cuando el Ca está secuestrado por el ácido tartárico, ocurre el enturbiamiento?

Acido cítrico



ácido cítrico como secuestrador



Informe

En su contenido, el informe debe describir los fenómenos ocurridos. Decir a qué se deben las diferencias observadas en los distintos tubos y escribir las reacciones químicas que tienen lugar en cada tubo de ensayo.

PROPIEDADES DE GRUPOS

RECONOCIMIENTO DE GRUPOS ALDEHÍDO Y CETONA

Objetivo

Aldehídos y cetonas constituyen dos series importantes dentro de la Química Orgánica. El grupo carbonilo que tienen en común les confiere un buen número de puntos de contacto, tanto en sus métodos generales de preparación como en su comportamiento químico frente a diversos reactivos. No obstante, la distinta localización de la función permite diferenciar perfectamente ambos tipos de sustancias.

En la presente práctica se estudian algunas de las propiedades más importantes que presentan estas dos series, estudio que aplicaremos en el siguiente trabajo práctico para el reconocimiento de azúcares.

- a) Propiedades reductoras de los aldehídos
- b) Reacción de los aldehídos con amoníaco concentrado
- c) Combinación bisulfítica.
- d) Reconocimiento de grupos metil-cetona.

Materiales

Gradilla con 12 tubos de ensayo, mechero y trípode, vaso de vidrio Pirex de 100 ml, baño, cuentagotas, pipeta de 5 ml de capacidad.

Formaldehído (35/40%; y 10%), acetaldehído, benzaldehído, acetona, bisulfito sódico al 10%, nitrato de plata 0.1 N, hidróxido de sodio (0.1N y 0.5N), permanganato de potasio al 0.3%, solución de Fehling I (solución de sulfato de cobre) y solución de Fehling II (solución de tatrato sódico-potásico).

Preparación de reactivos

Reactivo de TOLLENS: se toman 5 ml de solución acuosa de AgNO_3 0.1 N, y se añade a ella NH_3 conc. hasta que se disuelva el precipitado inicial. A continuación se agrega 1 ml de NaOH 2.5N.

Reactivo de FEHLING: se disuelven 34.54 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 300 o 400 ml de agua, y se afora a 500 ml. Esta solución se etiqueta como solución de Fehling I.

Se prepara otra solución disolviendo 173 g de tartrato sódico-potásico (sal de Rochelle) y 65 g de NaOH , en 400 ml de agua, y se afora a 500 ml. Esta solución se etiqueta como

solución de Fehling II. Al hacer los ensayos, cuando se recomienda usar la solución de Fehling, se utilizan volúmenes iguales de las soluciones I y II.

Solución de YODO - YODURO potásico: se disuelven 25 g de yodo en una disolución de 50 g de yoduro potásico en 200 ml de agua.

Procedimiento

Propiedades reductoras de los aldehídos

Los aldehídos se oxidan con más facilidad que los alcoholes primarios de donde proceden, y por su tendencia a transformarse en ácidos, actúan como reductores. Agentes oxidantes tan débiles como los iones Ag^+ , Cu^+ Bi^{+++} , oxidan a los aldehídos en medio alcalino. La formación del espejo de plata con el reactivo de Tollens y la reducción del reactivo de Fehling, constituyen ejemplos de este tipo. También el permanganato oxida a los aldehídos. Las cetonas en cambio no reducen, lo que sirve para distinguirlas de los aldehídos.

1. Oxidación con permanganato de potasio

Se toman tres tubos de ensayo y se numeran. Se añade a cada tubo dos gotas de la solución de permanganato de potasio al 0.3%. A continuación se añade a uno de los tubos unas gotas de solución acuosa de formaldehído al 10%, al segundo tubo unas gotas de benzaldehído, y al tercero unas gotas de acetona. Se anotan los cambios observados.

I	II	III
2 gotas de permanganato	2 gotas de permanganato	2 gotas de permanganato
5 gotas de formaldehído	5 gotas de benzaldehído	5 gotas de acetona

2. Oxidación con el reactivo de Fehling

Se toman tres tubos de ensayo y se numeran. Se añade a cada tubo 1 ml de cada una de las soluciones I y II de Fehling, que reemplaza al permanganato como agente oxidante. A continuación se procede como en *1*, añadiendo a cada tubo el formaldehído, el benzaldehído y la acetona, respectivamente. Anotar los cambios observados.

3. Oxidación con el reactivo de Tollens

Se procede como anteriormente, reemplazando el agente oxidante por 2 ml de licor de Tollens en cada tubo.

Reacción de los aldehídos con amoníaco. Obtención de urotropina

En un recipiente de vidrio de boca ancha, por ejemplo en un pequeño vaso de precipitados, se vierten 5ml de formaldehído al 40% (formalina), a los que se añaden 2 ml de NH₃ conc. La mezcla se evapora a sequedad, en un baño de María, dentro de la vitrina de gases. Se debe observar el aspecto del residuo y sacar conclusiones.

Combinación bisulfítica

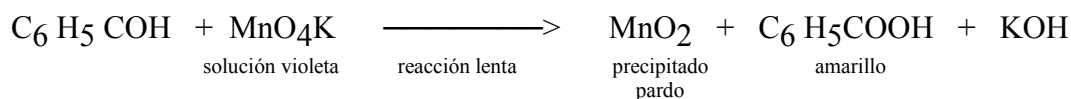
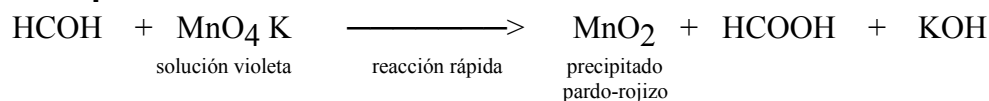
En un tubo de ensayo donde se ha vertido 1 ml de agua destilada, se añaden unas gotas de benzaldehído y se agita. A este mismo tubo, se añade gota a gota, una solución saturada de bisulfito sódico recién preparada, hasta que aparezca un precipitado. A continuación se agita el contenido y se separa en dos fracciones, a una de ellas se añade 2 ml de agua, a la otra fracción unas gotas de HCl diluido. Se observan los cambios. ¿Es esta reacción específica del benzaldehído?

Reconocimiento del grupo metil-cetona. Reacción del yodoformo

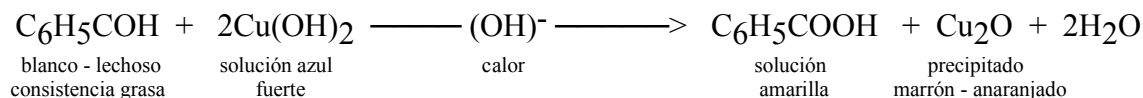
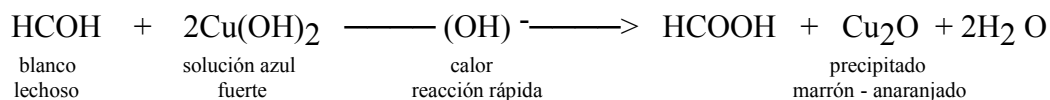
Se toman dos tubos de ensayo y se numeran. Se añade 0.5 ml de acetona al tubo n° 1 y 0.5 ml de formaldehído al tubo n° 2, además de 2 ml de agua destilada a cada uno. Se agrega a ambos tubos 2 ml de NaOH al 5% y a continuación gota a gota 3 ml de la solución yodo-yoduro potásico. En un ensayo positivo desaparece el color pardo y se separa un precipitado amarillo de yodoformo que puede reconocerse también por su olor característico.

Fórmulas y reacciones

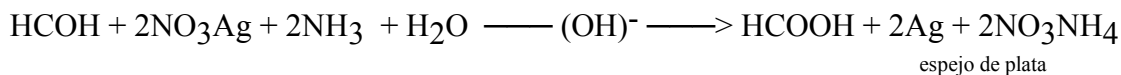
Con el MnO₄ K



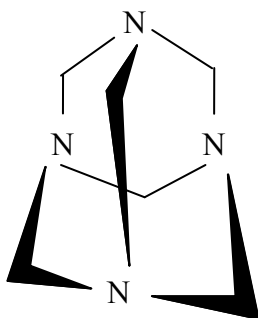
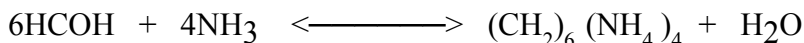
Con el licor de Fehling



Con Tollens

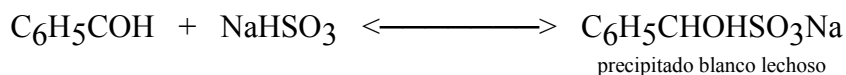


Reacción de los aldehídos con amoníaco



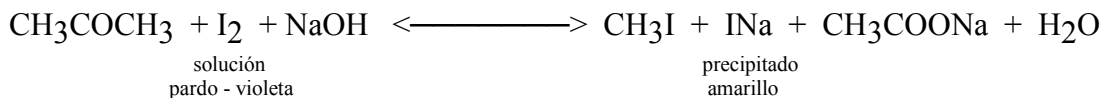
Residuo blanco - ceroso de
HEXAMETILENTETRAAMINA

Combinación bisulfítica



Al agitar aparece un precipitado blanco lechoso. Al añadir HCl el precipitado desaparece y se regenera de nuevo el benzaldehído.

Reacción del Yodoformo



La reacción del yodoformo es característica de las metil-cetonas y sirve para separarlas de otras cetonas.

Informe

No debe obviar una buena descripción del aspecto de los precipitados y las reacciones químicas que han tenido lugar en cada uno de los tubos de reacción.

AZÚCARES

PRUEBAS GENERALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Prueba de Molisch

Objetivo

El ácido sulfúrico concentrado hidroliza los enlaces glicosídicos, cuyo resultado es la aparición de monosacáridos, que pueden ser luego deshidratados para dar furfural y sus derivados. Estos productos se combinan luego con α -naftol sulfonado originando un complejo púrpura.

Esta reacción es general para los hidratos de carbono y sirve por lo tanto para determinar la presencia de estos en una muestra. Sin embargo, no es específica, ya que algunos otros compuestos orgánicos dan también furfural cuando son tratados con ácido sulfúrico concentrado.

Materiales

Gradilla con tubos de ensayo, pipetas, H_2SO_4 conc., α -naftol (50 g/L de α -naftol en etanol, prepárese fresco).

Procedimiento

Se toman 3 tubos de ensayo y se pone en cada uno de ellos 2 ml de la sustancia problema, más dos gotas de la solución de α -naftol. Se añade cuidadosamente, haciéndolo resbalar por las paredes del tubo, 1 ml de H_2SO_4 conc. hasta que se formen dos capas. Se repite el experimento usando agua en vez de la solución de azúcares.

Observe cuidadosamente cualquier cambio de color en la interfase de los dos líquidos.

Reacción de la antrona

Objetivo

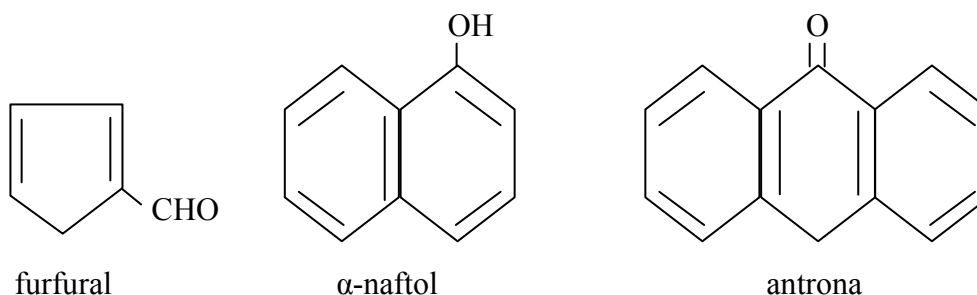
La reacción de la antrona es otra prueba general para hidratos de carbono. El fundamento es el mismo que en la prueba anterior, excepto que el furfural reacciona con la antrona (10-ceto 9,10 - dihidroantraceno) dando un complejo azul-verdoso.

Materiales

Gradilla y tubos de ensayo. Solución de antrona (2 g/L en ácido sulfúrico concentrado).

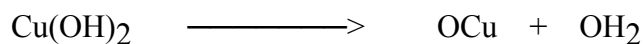
Procedimiento

A aproximadamente 2 ml del reactivo de antrona, se agregan 5 gotas de la solución problema, se mezcla vigorosamente y se observa el cambio de color.



Pruebas para la identificación de los azúcares reductores

Si se calienta una suspensión de hidróxido de cobre en solución alcalina, se forma óxido cúprico de color negro.



Sin embargo, en presencia de sustancias reductoras se precipita óxido cuproso de coloración pardo-rojiza.



Los hidratos de carbono que poseen un aldehído libre (o potencialmente libre) tienen propiedades reductoras en solución alcalina, pero además los monosacáridos actúan como agentes reductores aún en soluciones débilmente ácidas.

Prueba de Fehling

En un tubo de ensayo se coloca 1 ml de la solución de Fehling I y 1 ml de Fehling II. Se calienta hasta ebullición para descartar la auto-reducción (si se observa precipitado pardo-rojizo desechar).

Se deja enfriar ligeramente y se agregan 2 ml de la solución problema. Se calienta y se observa.

Prueba de Tollens

En un tubo de ensayo se colocan 2 ml del reactivo de Tollens más 2 ml de la solución problema, se agita, se calienta, y se observa la deposición de plata metálica en forma de espejo sobre la pared del tubo.

Prueba de Benedict

En la modificación de la prueba de Fehling introducida por Benedict, se usa únicamente una solución, lo cual la hace mucho más simple, con la ventaja de que el reactivo es mucho más estable que el de Fehling.

Preparación del reactivo de Benedict: disolver 173 g de nitrato de sodio y 100 g de carbonato de sodio anhidro en 800 ml de agua caliente. Se filtra a través de papel de filtro a una probeta de 1000 ml y se completa con agua hasta 850 ml. Separadamente se disuelven 17.3 g de sulfato de cobre (II) en 100 ml de agua y se completa hasta 150 ml. Se vierte la primera solución en un vaso de 2 litros de capacidad y se añade lentamente la solución de sulfato de cobre agitando continuamente.

Método: se agregan cinco gotas de la solución problema a 2 ml del reactivo de Benedict, y se colocan en baño de agua hirviendo durante cinco minutos.

Examine la sensibilidad de la prueba de Benedict usando diluciones crecientes de glucosa.

Prueba de Barfoed

El reactivo de Barfoed es débilmente ácido y solamente puede ser reducido por monosacáridos. Por lo tanto sirve como prueba de reconocimiento de estos. Hay que tener cuidado, ya que si se deja hervir durante largo tiempo existe la posibilidad de hidrolizar disacáridos, dando así reacciones falsamente positivas. El precipitado de óxido cuproso es menos denso que el de los métodos previos y se recomienda dejar el tubo hasta que el precipitado sedimente. El color del óxido cuproso es también diferente, tendiendo más a rojo ladrillo que al pardo-naranja obtenido en la prueba de Benedict.

Preparación del reactivo de Barfoed: disolver 13.3 g de acetato cúprico en aproximadamente 200 ml de agua, y se agregan 1.8 ml de ácido acético glacial.

Método: a 2 ml del reactivo de Barfoed, se añade 1 ml de la solución problema, se hierve durante un minuto y se deja reposar.

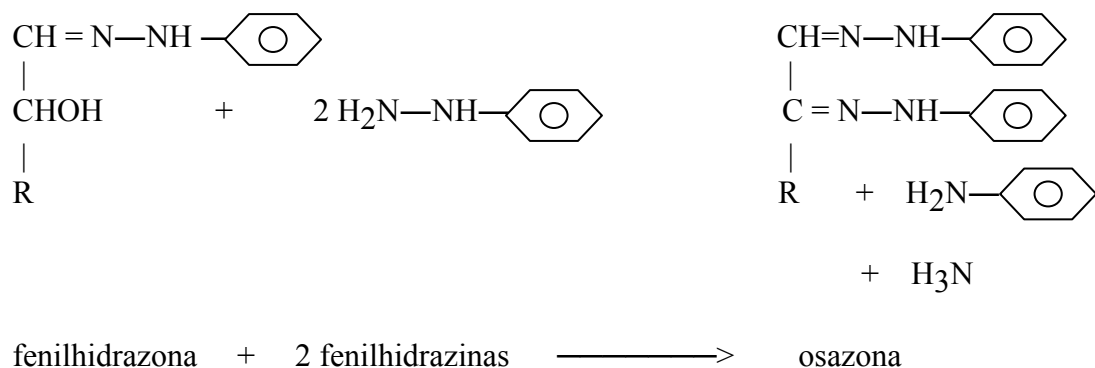
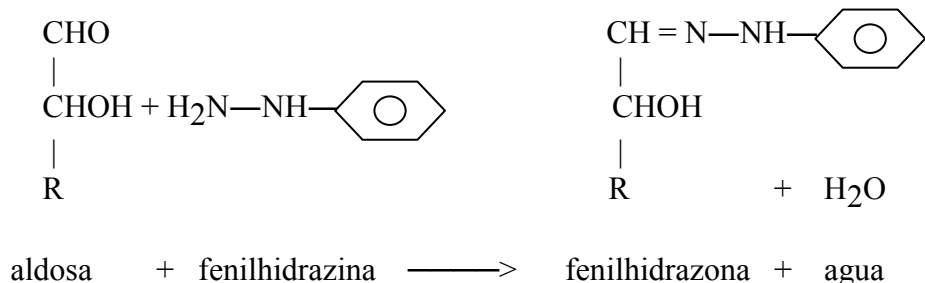
Prueba de las osazonas

Los compuestos que contienen el grupo -CHO-CHOH- forman osazonas cristalinas con fenilhidrazina. Los cristales de osazona tienen forma y puntos de fusión característicos, lo cual ayuda a la identificación de los azúcares reductores. Otros datos que pueden ayudar son el tiempo de formación de los cristales y la precipitación de la osazona en frío o en caliente.

La fenilhidrazina reacciona con el grupo de los azúcares dando la fenilhidrazona que a su vez reacciona con dos moléculas más de fenilhidrazina para dar la osazona.

A continuación se describe la formación de una osazona a partir de una aldosa; sin embargo, el mecanismo de la reacción es más complejo de lo que aquí se muestra.

La reacción de una cetosa es bastante similar.



Método: se acidifican 5 ml de la solución de los azúcares con 10 gotas de ácido acético glacial, o con 0.5 ml de HCl conc., a continuación se añade 1 ml de la solución de fenilhidrazina y 0.6 g de acetato sódico. Se añaden 4 ml de agua y se agita. Se tapan los tubos suavemente con algodón y se colocan en un baño con agua hirviendo. Se agita de vez en cuando, y se toma nota del tiempo que tarda en precipitar la osazona en cada uno de los tubos. Se recogen cuidadosamente los cristales formados, se secan y se examinan al microscopio.

Preparación de la solución de fenilhidrazina: diluir 0.25 g de la sustancia en un poco de agua acidulada con HCl, aforar a 100 ml.

Pruebas para carbohidratos individuales

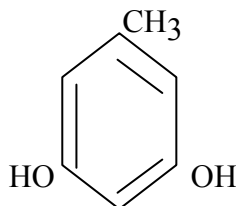
Prueba de Bial para las pentosas

Cuando se calientan pentosas con HCl concentrado se forma furfural que se condensa con orcinol en presencia de iones férricos para dar un complejo de color verde-azulado. La reacción no es absolutamente específica para las pentosas, aunque sirve para diferenciarla de las hexosas. Sin embargo, hay que tener cuidado, pues un calentamiento prolongado de algunas hexosas produce hidroxi-metil furfural que también reacciona con orcinol dando complejos coloreados.

Preparación del reactivo de Bial: se disuelve 1.5 g de orcinol en 500 ml de HCl concentrado y se añade a continuación 20 gotas de solución de FeCl₃ al 10%.

Método: en un tubo de ensayo se vierten 2.5 ml del reactivo de Bial, al que se añade 1 ml de la muestra, se calienta hasta el comienzo de la ebullición. La aparición de una coloración azul-verde indica resultados positivos. Enfriar el tubo y agregar 2 - 3 ml de alcohol amílico. Agitar. Observar los resultados

orcinol (3,5 - dihidroxitolueno)



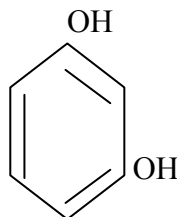
Prueba de Seliwanoff para las cetosas

Las cetosas se deshidratan más rápidamente que las aldosas dando derivados del furfural que se condensan con resorcinol para formar un complejo rojo, por lo que debe evitarse un calentamiento prolongado de la muestra que se está estudiando.

Preparación del reactivo de Seliwanoff: disolver 3.5 ml de resorcinol al 0.5% en 12 ml de HCl concentrado. Se lleva a 35 ml con agua. Se prepara antes de usar.

Método: a 5 ml del reactivo de Seliwanoff se agrega 1 ml de la solución de carbohidrato, se calienta durante un minuto, en un baño de agua hirviendo, se observa la aparición de un color rojo intenso.

resorcinol (m- dihidroxibenceno)



AZÚCARES

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DE BERTRAND

Objetivo

Casi todos los métodos de análisis cuantitativo de azúcares se basan en la reducción de Cu^{++} a Cu^+ en medio alcalino. Existen varios métodos para medir la cantidad de cobre reducido. En el de Bertrand, la cantidad de OCu_2 formado se determina fundamentándose en que este último, en contacto con una solución ácida de sulfato férrico pasa a sal cúprica, dando lugar a una cantidad de sal ferrosa equivalente. Valorando con permanganato de potasio la sal ferrosa formada, se deduce la cantidad de OCu_2 y, mediante unas tablas, la de azúcares reductores presentes en la muestra.

En la presente práctica se trata de determinar los azúcares reductores y totales de un zumo de naranja.

Materiales

Matraces aforados de 200 ml, y de 100 ml; 2 embudos de 8 cm de diámetro; un aro con nuez de 6 cm de diámetro; 1 erlenmeyer de 200 ml y de 300 ml; pipeta de 10 ml y otra graduada de 5 ml; soporte; trípode; rejilla y mechero; embudo; placa filtrante G-4; baño; termómetro de 0°C a 100°C ; bureta de 25 ml; soporte de pie; 2 pinzas de bureta; 1 kitasatos de 250 ml.

Solución cúprica: Fehling I y Fehling II.

Solución de sulfato férrico: disolver 50 g de sulfato férrico (exento de iones ferrosos), en 200 ml de ácido sulfúrico concentrado y aforar hasta 1000 ml con agua.

Solución de permanganato de potasio 0.1N: se pesan 3.2 g, se disuelven en agua y se aforan a 1000 ml. Se halla su factor con oxalato sódico.

Solución saturada de acetato de plomo. Zumo de naranja.

Procedimiento

Azúcares reductores

Se ponen 25 ml de la muestra en un matraz aforado de 200 ml. Se diluye con unos 100 ml de agua y se defeca con un ligero exceso de la solución de acetato de plomo neutra. Se afora con agua y se filtra.

Se separa el exceso de plomo con sulfato disódico u oxalato potásico. Se filtra ⁽ⁱ⁾, se toman con una pipeta 10 ml del filtrado y se vierten en un erlenmeyer de 200 ml de capacidad.

(ii) Se añaden al erlenmeyer 20 ml de Fehling I y 20 ml de Fehling II. Se calienta hasta ebullición y se continúa hirviendo suavemente durante tres minutos exactamente. Se enfría y se deja reposar el precipitado.

Se filtra con succión suave a través del embudo de placa filtrante (se recomienda no filtrar hasta que todo el precipitado se haya depositado, con el objeto de que pase la mínima cantidad al Gooch). Se lavan las paredes del erlenmeyer y la superficie del precipitado con 5 - 10 ml de agua, se deja reposar y se decanta.

Se repite esta operación dos o tres veces hasta que el filtrado no tenga reacción alcalina. Se desecha el filtrado y se lava el kitasatos con agua.

Al matraz donde está el precipitado se añaden 15 ml de la solución férrica y se agita. Se filtra con succión suave por el embudo de placa filtrante usado anteriormente. En caso de que no se haya disuelto todo el precipitado, se añade más solución férrica.

Se valora la sal ferrosa formada con la solución de permanganato de potasio 0.1N. Se expresa el resultado en porcentaje de azúcar usando las tablas de Bertrand.

Azúcares totales

Proceder como para azúcares reductores hasta el punto (i). Del filtrado de donde anteriormente se tomaron 10 ml, ahora se toman 50 ml. A estos 50 ml se añaden 5 ml de HCl concentrado. Se calienta en baño de María hasta que la solución alcance los 68°C, procurando llegar a esa temperatura en 15 minutos. Se enfría rápidamente, se afora a 100 ml, y a continuación se procede a partir de (ii), o sea se ensaya con Fehling, etc.

Informe

Escribir un informe completo de los procedimientos y resultados. No olvidar mencionar cuáles son las sustancias que se separan al defecar con plomo, de qué están formados todos los precipitados que se mencionan, y porqué es necesario recurrir a una tabla empírica en la valoración de azúcares reductores y no se determinan por una relación estequiométrica a partir del cobre reducido.

TABLA DE BERTRAND

Miligramos de Cu reducidos por						Miligramos de Cu reducidos por					
mg de azúcar	Glucosa	Azúcar invertido	Galactosa	Maltosa	Lactosa	mg de azúcar	Glucosa	Azúcar invertido	Galactosa	Maltosa	Lactosa
10	20.4	20.6	19.3	11.2	14.4	46	88.2	88.3	84.3	50.6	63.3
11	22.4	22.6	21.2	12.3	15.8	47	90.0	90.1	86.0	51.7	64.4
12	24.3	24.6	23.0	13.4	17.2	48	91.8	91.9	87.7	52.8	65.9
13	26.3	26.5	24.9	14.5	18.6	49	93.6	93.6	89.5	53.9	67.2
14	28.3	28.5	26.7	15.6	20.0	50	95.4	95.4	91.2	55.0	68.5
15	30.2	30.5	28.6	16.7	21.4	51	97.1	97.1	92.9	56.1	69.8
16	32.2	32.5	30.5	17.8	22.8	52	98.9	98.8	94.6	57.1	71.1
17	34.2	34.5	32.3	18.9	24.2	53	100.6	100.6	96.3	58.2	72.4
18	36.2	36.4	34.2	20.0	25.6	54	102.3	102.3	98.0	59.3	73.7
19	38.1	38.4	36.0	21.1	26.9	55	104.1	104.0	99.7	60.3	74.9
20	40.1	40.4	37.9	22.2	28.4	56	105.8	105.7	101.6	61.4	76.2
21	42.0	42.3	39.7	23.3	29.8	57	107.6	107.4	103.2	62.5	77.5
22	43.9	44.2	41.6	24.4	31.1	58	109.3	109.0	105.0	63.5	78.8
23	45.8	46.1	43.4	25.5	32.5	59	111.1	110.9	106.6	64.6	80.1
24	47.7	48.0	45.2	26.6	33.9	60	112.8	112.6	108.3	65.7	81.1
25	49.6	49.8	47.0	27.7	35.2	61	114.5	114.3	110.0	66.8	82.7
26	51.5	51.7	48.9	28.9	36.6	62	116.2	115.9	111.6	67.9	83.9
27	53.4	53.6	50.7	30.0	38.0	63	117.9	117.6	113.3	68.9	85.2
28	55.3	55.5	52.5	31.1	39.4	64	119.6	119.2	115.0	70.0	86.5
29	57.2	57.4	54.4	32.2	40.7	65	121.3	120.9	116.6	71.1	87.6
30	59.1	59.3	56.2	33.3	42.1	66	123.0	122.6	118.3	72.2	89.0
31	60.9	61.1	58.0	34.4	43.4	67	124.7	124.2	120.0	73.3	90.3
32	62.8	63.0	59.7	35.5	44.8	68	126.4	125.9	121.7	74.3	91.6
33	64.6	64.8	61.5	36.5	46.1	69	128.1	127.5	123.3	75.4	92.8
34	66.5	66.7	63.3	37.6	47.4	70	129.8	129.2	125.0	76.5	94.1
35	68.3	68.5	65.0	38.7	48.7	71	131.1	130.8	126.6	77.6	95.4
36	70.1	70.3	66.8	39.8	50.1	72	133.1	132.4	128.3	78.6	96.6
37	72.0	72.2	68.6	40.9	51.4	73	134.7	134.0	130.0	79.7	97.9
38	73.8	74.0	70.4	41.9	52.7	74	136.3	135.6	131.5	80.8	99.1
39	75.7	75.9	72.1	43.0	54.1	75	137.9	137.2	133.1	81.8	100.4
40	77.5	77.7	73.9	44.1	55.4	76	139.6	138.9	134.8	82.9	101.7
41	79.3	79.5	75.6	45.2	56.7	77	141.2	140.5	136.4	84.0	102.9
42	81.1	81.2	77.4	46.3	58.0	78	142.8	142.1	138.0	85.1	104.2
43	82.9	83.0	79.1	47.4	59.3	79	144.5	143.7	139.7	86.1	105.4
44	84.7	84.8	80.8	48.5	60.6	80	146.1	145.3	141.3	87.2	106.7
45	86.4	86.5	82.5	49.5	61.8	81	147.7	146.9	142.9	88.3	107.9

AZÚCARES

PRUEBAS PARA LA SACAROSA: INVERSIÓN DE LA SACAROSA Y DETECCIÓN DEL FENÓMENO POR MEDIOS DIVERSOS

Objetivo

La sacarosa es el único disacárido común no reductor, y por lo tanto no reduce las soluciones alcalinas de cobre ni forma osazonas. La hidrólisis de la sacarosa en solución ácida es un fenómeno muy instructivo debido a los cambios que, como consecuencia de ella, tienen lugar en las propiedades de la disolución, cambios tanto en la magnitud como en el sentido de su actividad óptica, (fenómeno llamado inversión) y aparición del poder reductor.

El objetivo del siguiente práctico consiste en provocar la hidrólisis por medio de diversos agentes, comprobar dicho fenómeno mediante la detección de las nuevas propiedades de la disolución y mediante la cromatografía en capa fina.

Materiales

Gradilla con doce tubos de ensayo, mechero y trípode con rejilla, baño y termómetro, placas de vidrio de 20 x 20 cm, estufa de desecación, pinzas de madera, polarímetro, soluciones de Fehling I y II. Solución de glucosa, fructosa y sacarosa. Solución de HCl al 10%. Solución de invertasa al 2%, silica gel. Solución de acetato de sodio 0.02M. Disolvente para cromatografía: acetato de etilo - isopropanol - agua (65 / 23.5 / 11.5 en volumen). Revelador: 50 ml de ácido acético glacial + 1 ml de ácido sulfúrico concentrado + 0.5 ml de anisaldehído.

Preparación de las placas para cromatografía en capa fina: la masa de silica gel se prepara de la siguiente manera: se pesan 25 g de silica gel que se vierten en un erlenmeyer, se añaden 50 ml de acetato de sodio 0.02M, y se agita la mezcla vigorosamente procurando evitar los grumos. Preparada la mezcla, se vierten en el extendedor de capa fina, y se hace la extensión sobre la fila de placas previamente preparadas. Se introducen en un desecador hasta que desaparezca el brillo acuoso. Por último se activan en estufa durante 30 minutos a 110°C.

Nota: no debe dejarse transcurrir un intervalo de tiempo mayor a 100 segundos desde que se prepara la masa hasta que se extiende sobre las placas.

Procedimiento

Hidrólisis ácida de la sacarosa

Se preparan seis tubos de ensayo que contengan cada uno de ellos 5 ml de solución de sacarosa al 5% y se numeran. Se añaden 5 ml de agua a uno de ellos (prueba en blanco) y la

misma cantidad de ácido clorhídrico al 10% a los restantes. A continuación los tubos se sumergen en un baño de agua a 70°C donde se dejan durante cinco minutos.

Comprobación de la hidrólisis

Por la aparición del poder reductor: transcurrido el tiempo arriba indicado, se ensaya una fracción (por ejemplo 1 ml) del contenido de los tubos y del blanco, con el reactivo de Fehling, como se hizo anteriormente. Se observan los resultados.

Mediante cromatografía en capa fina: sobre una línea imaginaria trazada a lo largo de la placa a 1 cm aproximadamente de uno de los lados paralelos a la dirección en que se hizo la extensión, se hace la siembra mediante pequeños toques, del hidrolizado, del blanco, de soluciones de sacarosa sin hidrolizar, y de soluciones de glucosa y de fructosa.

A continuación la placa se lleva a la cámara de cromatografía en la que se ha introducido el eluyente 24 horas antes (acetato de etilo - isopropanol - agua). La placa se ubica de tal forma que la base más próxima a las siembras quede sumergida en el eluyente, pero sin que este llegue a tocar la siembra. Se tapa la cámara lo más rápidamente posible y se espera el tiempo suficiente hasta que el eluyente haya recorrido unos 18 cm de la placa.

Se retira la placa de la cámara de cromatografía, se deja secar y se revela con la solución de anisaldehído (esta operación debe efectuarse dentro de la campana de gases). Se introducen las placas en la estufa a 110°C, hasta que aparezcan las manchas. Observe y copie sobre papel las manchas obtenidas, especifique a qué azúcar corresponden. Calcule el Rf de cada una de ellas.

Detección de la inversión óptica

Se determina la rotación óptica de 40 ml de una solución de sacarosa 0.5 M. Inmediatamente después se le añade 3 ml de HCl concentrado, se agita y se deja a una temperatura de 30 a 50°C durante 20 minutos. No olvidar hacer un blanco con 40 ml de agua, el que sufrirá exactamente los mismos tratamientos que la solución de sacarosa. Transcurridos los 20 minutos efectuar otra lectura.

Hidrólisis enzimática

Se toman tres tubos de ensayo y se numeran. A los tubos 1 y 2 se les añade 5 ml de sacarosa al 5%, y al tubo número 3 la misma cantidad de agua. A continuación se añaden 1 ml de la solución de invertasa en los tubos 1 y 3, y de agua al tubo 2 como control. Calentar los tubos a 35°C en baño de María durante 15 minutos (el ensayo en blanco se lleva a cabo para comprobar que la solución del enzima no tiene poder reductor). Concluido el tiempo de reacción, ensayar con el reactivo de Fehling para la presencia de azúcares reductores.

AZÚCARES

HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL ALMIDÓN

Objetivo

El almidón es el glúcido de reserva más importante en los vegetales. Originado durante la fotosíntesis como principal producto de acumulación, se deposita sobre todo en tubérculos, raíces y semillas. En el orden estrictamente químico, el almidón no es en realidad un polímero único, sino que está formado por una mezcla de dos constituyentes distintos: la amilosa y la amilopectina. Ambos son homopolímeros derivados de la α -D-glucosa, pero la amilosa es de tipo lineal, con uniones 1 \rightarrow 4 exclusivamente, mientras que la amilopectina contiene al menos dos tipos de uniones 1 \rightarrow 4 y 1 \rightarrow 6, lo que da lugar a una disposición ramificada. Es muy característica la coloración azul que produce el almidón (la amilosa) con las disoluciones de yodo, incluso a grandes diluciones. Se trata de un producto de absorción intermicelar del metaloide sobre el almidón, y sólo se produce en presencia de agua.

En este práctico haremos uso de esta última característica para poner de manifiesto la presencia de almidón y también comprobaremos la naturaleza de los productos resultantes de la hidrólisis ácida del mismo.

Materiales

Vaso de precipitados de 250 ml, tela para filtrar, 6 erlenmeyers de 125 ml, vidrios de reloj, buretas. Papas, HCl, Fehling I y II, NaOH al 40%, azul de metileno al 1%, solución de glucosa al 10%.

Preparación de la solución de Lugol: 1 g de yodo en cristales más 2 g de IK, en 200 ml de agua.

Procedimiento

Preparación del engrudo de almidón

Se lava y pela una papa mediana. A continuación se ralla recogiendo el líquido y la papilla en un vaso de precipitados de 250 ml. Se agregan 100 ml de agua revolviendo con una varilla de vidrio, se filtra con tela, recogiendo el filtrado.

Con el residuo sólido que queda en la tela, se efectúa una segunda extracción con la misma cantidad de agua, y se filtra nuevamente. Se reúnen los dos filtrados y se desecha la parte sólida. Se deja en reposo hasta que sedimente la mayor parte de los gránulos de almidón y entonces se elimina el líquido sobrenadante. El precipitado remanente es el almidón.

En un vaso de precipitados se colocan 100 ml de agua y se calienta a ebullición, en cuyo momento se agrega el almidón suspendido en 10 ml de agua fría. Se elimina la fuente de calor, y se agita el vaso hasta obtener una solución opalescente: el engrudo de almidón.

Comprobación: en un vidrio de reloj colocar 1 ml del engrudo de almidón y unas gotas de la solución de Lugol, anotar los resultados y las conclusiones.

Hidrólisis ácida seriada

Se toman seis tubos de ensayo y se numeran. En cada uno de ellos, se colocan 5 ml del engrudo de almidón y 0.5 ml de HCl concentrado. Se ponen todos a la vez en un baño de María a 100°C. Los tubos se retiran del baño a los 2 (el primero), 6 (el segundo), 10..., 15..., 20... y 30 (el sexto) minutos.

Al mismo tiempo se preparan seis erlenmeyers de 125 ml de capacidad y en cada uno de ellos se colocan 5 ml de la solución de Fehling I, 5 ml de Fehling II y 30 ml de agua destilada. Cada erlenmeyer se lleva a ebullición, para descartar la autorreducción del cobre.

Una vez retirados los tubos del baño, comprobar en cada uno de ellos la presencia de almidón. Luego agregar a cada uno 5 ml de NaOH al 40% para neutralizar. A continuación, proceder a la valoración.

Valoración

En una bureta se coloca la solución del tubo correspondiente, que ha sufrido la hidrólisis. Se deja caer gota a gota sobre la solución de Fehling (caliente), contenida en uno de los erlenmeyers, hasta la aparición incipiente del color rojo ladrillo. En ese momento se para el goteo y se agrega 1 ml de solución de azul de metileno al 1% al erlenmeyer. Se continúa con el goteo hasta la desaparición del color violáceo y la aparición del color rojo ladrillo.

Determinación del título del reactivo de Fehling: se toma una bureta y se llena con una solución de glucosa al 10% (0.55M). Se prepara un erlenmeyer como en los casos anteriores con reactivo de Fehling y agua, se lleva a ebullición y se procede a valorar la solución de glucosa, siguiendo el mismo procedimiento que anteriormente. Se observan los mililitros gastados y se determina el título del reactivo de Fehling, consignando cuántos miligramos de glucosa reducen a 10 ml de este reactivo. Utilizar dichos datos para calcular el grado de hidrólisis ocurrida en cada uno de los tubos en función del tiempo. Graficar.

Informe

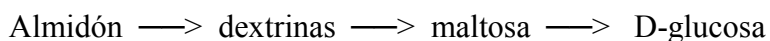
Incorpore un esquema de lo que ha ocurrido en cada uno de los tubos en los que se ha llevado a cabo la hidrólisis ácida. Igualmente un esquema de la valoración. Interprete los resultados obtenidos.

AZÚCARES

IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL ALMIDÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA ASCENDENTE EN PAPEL

Objetivo

La hidrólisis ácida completa del almidón se puede esquematizar de la siguiente forma:



La cromatografía es un método de separación de sustancias por arrastre con un solvente, sustancias que se separan debido a su diferente afinidad por dicho solvente. En el método de cromatografía en papel, se coloca una pequeña cantidad de muestra a analizar en el extremo del papel, introduciendo a continuación el papel por ese extremo, en una solución de desarrollo que consiste, de ordinario, en algún disolvente orgánico saturado con una solución acuosa.

El factor predominante en la separación de una mezcla de solutos por cromatografía en papel es la partición entre dos fases no miscibles, actuando el papel como soporte inerte del solvente acuoso. El proceso de distribución o reparto de los solutos que integran la mezcla se establece entre la fase acuosa estacionaria (papel impregnado con una cierta cantidad de agua) y la fase orgánica móvil (eluyente). Por esta razón, las sustancias que se reparten entre las dos fases han de ser, al menos parcialmente, solubles en agua, pues de otra manera no serían retenidas por el papel húmedo y no darían lugar a la formación de manchas nítidas.

El soluto se mueve en la dirección del flujo del solvente a una velocidad que es regulada por su atracción por la fase acuosa estacionaria o por la fase orgánica apolar móvil. La atracción del soluto por la última fase es prueba de una mayor velocidad de migración en la dirección del flujo.

Puesto que los solventes se evaporarían rápidamente en el aire, la cromatografía se debe realizar en un recipiente cerrado, saturado con el vapor del disolvente. Una vez que el disolvente ha ascendido una cierta distancia sobre el papel, se marca el frente del ascenso, se seca el papel, y se trata con reactivos adecuados, con el objeto de localizar los diferentes solutos. Cada soluto se mueve en una columna recta y está caracterizado por su valor de R_f .

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$$

La comparación de los Rf de las manchas desconocidas con los correspondientes a sustancias conocidas, permite la identificación de los solutos existentes en la mezcla.

Materiales

Solución de almidón al 0.5%, de glucosa al 0.5%, de maltosa al 0.5%, solución de HCl 1N, 2N, y 4N.

Solvente: Acetato de etilo 65 ml
 Etanol 20 ml
 Agua 15 ml
 Agregar 1 ml de ácido acético, por cada 100 ml de solvente.

- Revelado: a) Tomar 0.5 ml de solución saturada de nitrato de plata (en agua), y aforar a 100 ml con acetona.
 b) Tomar 5 ml de solución saturada de NaOH (en agua), y aforar a 100 ml con etanol.
 c) Tiosulfato de sodio al 10% en solución acuosa.

Procedimiento

Tomar seis tubos de ensayo y rotularlos. En cada uno de los cuatro primeros poner 5 ml de almidón al 0.5%, y añadir al primero 2 ml de HCl 1N, al segundo 2 ml de HCl 2N, al tercero 2 ml de HCl 4N, y al cuarto 2 ml de agua. En un quinto tubo poner 5 ml de solución de glucosa al 0.5% y 2 ml de agua. En el sexto tubo, 5 ml de solución de maltosa al 0.5% y 2 ml de agua.

I	II	III	IV	V	VI
5 ml de solución de almidón	5 ml de solución de almidón	5 ml de solución de almidón	5 ml de solución de almidón	5 ml de solución de glucosa	5 ml de solución de maltosa
2 ml HCl 1N	2 ml de HCl 2N	2 ml de HCl 4N	2 ml de agua	2 ml de agua	2 ml de agua

Calentar los cuatro primeros tubos durante 20 minutos en un baño de agua a 100°C, agitando de vez en cuando.

Mientras tanto, se corta papel Whatman número 1 en tiras de 28 x 23 cm. Se toma el lado más angosto y en él se marca la línea de siembra, a 3/3.5 cm del margen que se sumergirá en el solvente, y con un lápiz de grafito se anotan las siembras que se efectuarán.

Transcurridos los 20 minutos, mezclar bien el contenido de cada tubo y enfriar en baño de agua. Con un tubo capilar tomar una pequeña cantidad del tubo número 1 y descargarla sobre la marca de siembra correspondiente, previamente determinada sobre el

papel. Se debe procurar que la mancha así originada se extienda lo menos posible. Secar con aire caliente. Volver a descargar una pequeña cantidad sobre la mancha anterior, secar y repetir el proceso unas veinte veces. Limpiar el capilar a conciencia y volver a repetir con el tubo número 2, eligiendo un segundo lugar de siembra. Hacer lo mismo con el contenido de los demás tubos.

La solución del solvente para el desarrollo del cromatograma, ha sido preparada 24 horas antes, y distribuida en los cristalizadores, de forma que cubra una altura de hasta 2 cm. El cristalizador está situado dentro de la campana de gases, y está cerrado. Al haber estado el solvente 24 horas en el cristalizador, la atmósfera de este está saturada de los componentes del solvente y en equilibrio dinámico con la fase líquida de dicho solvente.

Una vez sembradas las muestras y seco el papel, se forma un cilindro con él y se abrocha. Se coloca en el cristalizador, apoyando el extremo sembrado del papel en la base del cristalizador, pero sin que el eluyente toque las siembras. Se cierra y espera hasta que el frente del eluyente haya ascendido hasta el 75 - 80% de la altura del papel. Retirar y dentro de la campana, marcar con lápiz la posición del frente, dejarlo secar.

Revelado: una vez seco, se trata el papel con la solución a), y se deja secar al aire, en la oscuridad. Al quedar seco, se sumerge rápidamente en la solución b) y a los uno, dos minutos aparecerán manchas negras. Inmediatamente se lava el papel con agua, y después se sumerge por unos minutos en la solución c) para eliminar el exceso de nitrato de plata. Se vuelve a lavar con agua y se deja secar al aire.

Proceda a la identificación de la mancha originada por la glucosa y bordee las manchas que tengan el mismo R_f , observe su diámetro.

Informe

Incorpore el cromatograma o un esquema del mismo a su informe. Interprete los resultados obtenidos.

Apéndice

Preparación del acetato de etilo

En un matraz de fondo redondo, de 200 ml de capacidad, poner 30 g (0.5 moles) de ácido acético glacial y 40 ml de etanol al 95%. A continuación y agitando el matraz se añaden lentamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se adapta al matraz un refrigerante de reflujo, se añaden unos trozos de plato poroso y se calienta la mezcla a reflujo durante treinta minutos sobre un baño de vapor.

Al final del periodo de reflujo se enfrían el matraz y su contenido (se debe enfriar bien para evitar pérdidas por evaporación) y se modifica el aparato disponiéndolo para una destilación. Como colector se puede emplear un quitasatos, en cuya tubuladura lateral se pondrá una goma que conduzca los posibles vapores al desagüe, o por debajo de la mesada del laboratorio (el acetato de etilo es muy inflamable). En el matraz se echan unos trocitos de plato poroso, o de piedra Pómez, y se destila el acetato de etilo sobre un baño de vapor.

En el matraz quedará como residuo una pequeña cantidad de ácido acético y ácido sulfúrico diluido. El destilado (formado principalmente por acetato de etilo, contiene pequeñas cantidades de agua, alcohol, éter, ácido acético y ácido sulfúrico) se pasa a un embudo de llave y se agita suavemente con solución de carbonato sódico. La llave del embudo se debe abrir inmediatamente después de mezclar las dos capas para dejar salida al CO₂, y después se debe abrir también con frecuencia.

Finalmente, la mezcla se agita más fuertemente hasta que la capa superior no presenta reacción ácida al papel de tornasol. Se separa la capa superior de acetato de etilo y se lava con una solución fría de 20 g de cloruro cálcico en 25 ml de agua. El producto se deja secar durante treinta minutos sobre sulfato de magnesio anhidro. Si no se dispone de sulfato de magnesio anhidro, se puede preparar calentando en una cápsula de porcelana 20 g de sulfato de magnesio hidratado (epsomita).

Una vez seco el producto, se filtra el líquido a través de un filtro seco, para separar el sulfato magnésico, y se destila con una columna de Vigreux. La fracción que pasa a 75 - 78°C se recoge aparte. Las fracciones de punto de ebullición más alto y más bajo se fraccionan de nuevo y la fracción de 75 - 78°C se recoge de nuevo y se une a la primera porción. Se pesa el producto y se calcula el rendimiento en porcentaje a partir de la cantidad de ácido acético utilizada.

Nota: el acetato de etilo puro hierve a 77°C. Sin embargo, forma un azeótropo de punto de ebullición mínimo con agua y también con alcohol. Además, el sistema de tres componentes, acetato de etilo-etanol-agua, también forma un azeótropo ternario de punto de ebullición mínimo. La composición expresada en tanto por ciento en peso de estos tres azeótropos y sus puntos de ebullición son los siguientes:

93.9% de acetato de etilo - 6.1% de agua, p.e. 70.4°C

69.1% de acetato de etilo - 30.9% de etanol p.e. 71.8°C

83.3% de acetato de etilo - 8.9% de etanol - 7.8% de agua, p.e. 70.3°C

Por lo tanto, es necesario insistir en la importancia de la eliminación del agua y el etanol en el acetato de etilo obtenido. Si el producto hierve a 70 - 72°C, se debe secar de nuevo sobre sulfato de magnesio anhidro y volverlo a fraccionar.

LÍPIDOS

SAPONIFICACIÓN - PRUEBAS PARA ÁCIDOS GRASOS

Objetivo

Cuando se calientan aceites o grasas en presencia de álcali, se liberan ácidos grasos y glicerol, en un proceso que se conoce como saponificación. El exceso de álcali presente reacciona con los ácidos liberados formando las sales de sodio o potasio de estos ácidos, o sea formando el jabón, dando a la solución una apariencia jabonosa característica.

Los jabones son solubles en agua pero precipitan cuando añadimos un exceso de NaCl. Las sales de magnesio y calcio también son insolubles y originan la nata que se forma cuando el jabón se agita en el agua dura.

Materiales

Grasa animal (manteca), aceite vegetal, hidróxido potásico alcohólico (100 g/L) ácido clorhídrico conc., fenolftaleína (10 g/L en alcohol), hidróxido de sodio 0.1M, cloruro de calcio (50 g/L), cloruro de magnesio (50 g/L), acetato de plomo (50 g/L).

Procedimiento

1.- En un tubo de ensayo coloque grasa hasta una altura de aproximadamente 1 cm. Agregue suficiente KOH alcohólico para cubrir la grasa y deje hervir cuidadosamente cerca de un minuto.

2.- Agregue 10 ml de agua, hierva por diez minutos más y enfríe. Añada cuidadosamente HCl conc. hasta que la solución sea ligeramente ácida, y remueva con una pipeta Pasteur la capa de ácidos grasos que aparece sobre la superficie del líquido.

3.- Formación del jabón: caliente el ácido graso con agua y agregue álcali lentamente hasta que se obtenga una solución clara; es la solución del jabón.

4.- A tres muestras de la solución jabonosa agregue unas pocas gotas de solución de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y acetato de plomo. Observar la precipitación de las sales insolubles.

5.- Acidifique una muestra de la solución jabonosa con HCl, ¿qué se observa?

6.- Sature la solución con NaCl y observe la separación del jabón de sodio.

Pruebas para los ácidos grasos

1.- Tome una parte de los ácidos grasos obtenidos en el punto 2 del apartado anterior y disuélvalos en éter.

2.- Prepare una solución de fenolftaleína y añada cuidadosamente álcali diluido hasta que aparezca un color estable ligeramente rosado.

3.- Añada esta solución gota a gota a la muestra disuelta en éter. Si hay ácidos grasos presentes, el color desaparecerá.

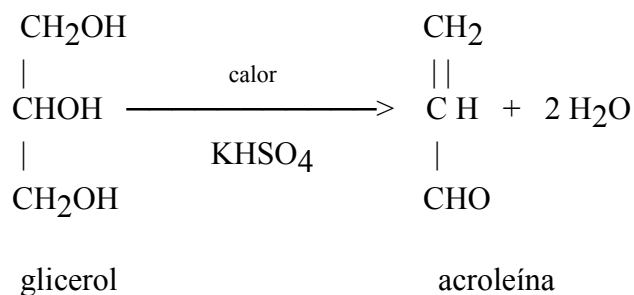
4.- Compare también el comportamiento de la manteca con el aceite de oliva.

LÍPIDOS

PRUEBA PARA EL GLICEROL

Objetivo

Se puede determinar la presencia de glicerol y de sus ésteres, aprovechando el hecho de que cuando se calienta glicerol con bisulfato potásico se produce deshidratación y se forma el aldehído acroleína, el cual se reconoce en primera instancia por su olor característico. Esta reacción, como se ha dicho, ocurre tanto con el glicerol libre como con los ésteres del glicerol.



Materiales

Muestras (manteca, aceite de oliva, glicerol, etc.), bisulfato potásico.

Procedimiento

Coloque una capa de aproximadamente 0.5 cm de KHSO₄ en un tubo de ensayo, y agregue cinco gotas de la solución a ensayar, o bien una cantidad equivalente de la misma sustancia sólida.

Cubra con más KHSO₄ y caliente lentamente.

Note el olor picante característico de la acroleína.

LÍPIDOS

MÉTODO SEMI-INDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DE JABÓN

Objetivo

La fabricación del jabón es uno de los múltiples casos en que la Química se pone al servicio del hombre y tiene una aplicación directa en la vida cotidiana del individuo.

Es importante para los estudiantes de esta, el comprobar cómo los métodos químicos de obtención, separación, caracterización, se modifican en mayor o menor medida para adaptarlos a la producción en gran escala, pero a pesar de ello, el o los principios químicos en los que se basa esta metodología permanecen inalterables.

Materiales

Vasos de precipitados, mechero, trípode, gradilla con tubos de ensayo, baño de María, 20 g de grasa, 6 g de NaOH en 40 ml de agua (soda), 10 ml de etanol al 96°, 20 g de ClNa comercial, solución de Cl_2Ca , Cl_3Fe , y Cl_2Hg , preparada disolviendo 50 g del producto en un litro de agua.

Procedimiento

- 1.- Fundir la grasa al baño de María.
- 2.- Colocar la soda en un vaso de precipitado de 250 ml y agregar suavemente la grasa fundida, agitando continuamente.
- 3.- Calentar a baño de María agitando constantemente durante media hora, dejar enfriar un poco, y añadir los 10 ml de alcohol de 96°, seguir agitando durante 10 minutos sin calentar excesivamente (al agregar el alcohol disminuye la tensión superficial de las gotas de grasa y favorece la penetración de la soda, además de disminuir la cantidad de espuma).
- 4.- Seguir calentando (de media a dos horas) sin dejar de agitar, lenta pero regularmente, hasta obtener una masa homogénea. Si debido al calentamiento se evapora el agua y la masa de jabón se torna muy espesa, dificultando el agitado, se puede agregar agua para reponer la evaporada.
- 5.- Se considera terminada la saponificación cuando al poner una gota de la suspensión en agua caliente, no se separa grasa (si la saponificación fuera incompleta después de un tiempo largo, se saca el vaso del baño, se agregan 5 ml de alcohol de 96° y 5 ml de agua y se deja hervir suavemente sobre tela metálica empleando una llama muy pequeña y agitando para evitar salpicaduras).
- 6.- A la pasta de jabón formada se añaden 50 ml de agua caliente, se agita y se agrega 20 g de ClNa disuelto en 30 ml de agua. El jabón sobrenada en el agua salada, que se va separando. La mezcla se mantiene caliente hasta que no se separa más jabón.

7.- Al jabón se le da forma de torta y, cuando se endurece, se lava con pequeñas cantidades de agua, decantando el líquido del lavado cada vez.

8.- Cuando se supone eliminado el exceso de sal, se exprime con un trapo, se colorea, se perfuma y se coloca en un molde para dejar secar.

9.- Coloración y perfumado: el jabón exprimido se pasa a un vaso de precipitado donde se ablanda un poco (sólo lo necesario para poder agitar), se le agregan 2 ml de solución de colorante teniendo en cuenta que la coloración se intensifica cuando se enfría, se añade el perfume cuando la pasta está casi fría pues de lo contrario se volatiliza, y se agita hasta homogeneizar el color de la pasta. Se pasa a un molde, se lo comprime bien y se deja secar durante unos días.

Ensayos con la solución del jabón

Disolver 1 g de jabón en 100 ml de agua caliente, llenar tres tubos de ensayo con 5 ml de esta solución jabonosa cada uno, añadir a uno de los tubos 5 gotas de una solución de cloruro de calcio, al segundo tubo 5 gotas de la solución de cloruro de mercurio, y al tercero 5 gotas de la solución de cloruro férrico.

Observar y anotar las conclusiones.

PROTEÍNAS

REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivo

El nombre de proteína (del griego, preeminente o primero) fue propuesto por Berzelius a Mulder y aplicado por este en 1838 a las sustancias orgánicas nitrogenadas complejas que se encuentran en las células de todos los animales y plantas.

Las proteínas ocupan una posición central en cuanto a la arquitectura y funcionamiento de la materia viva. Ellas están íntimamente relacionadas con todas las fases de la actividad física y química que constituye la vida de la célula. Parece difícil que exista una función fisiológica importante en la que no participen las proteínas.

Es por ello que la identificación de las proteínas constituye una fase importante en el estudio de muchos procesos biológicos.

La identificación química de las proteínas se basa en las propiedades químicas ya sea de ellas mismas, ya de los aminoácidos que las constituyen, y estas reacciones químicas son bastante numerosas debido a los diferentes grupos reactivos presentes en la molécula.

Materiales

Gradilla con doce tubos de ensayo; vaso de precipitados de 250 ml; probeta; varilla de vidrio. Sulfato de cobre al 0.1%; NaOH al 25%; HNO₃ concentrado.

Reactivo de Millon: pesar 100 g de mercurio metálico y disolverlo en 200 ml de ácido nítrico concentrado.

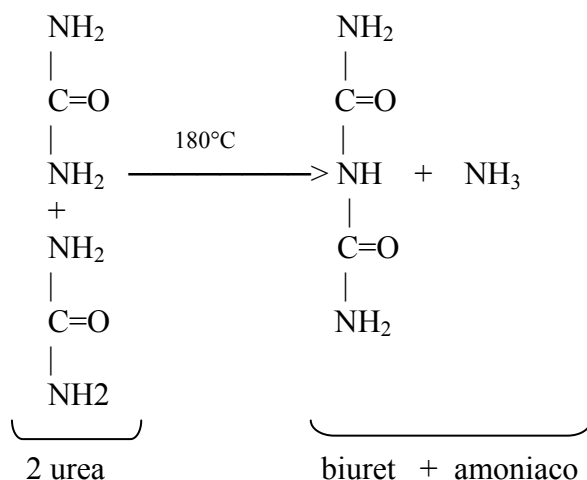
Procedimiento

Preparación de una solución coloidal de albúmina.

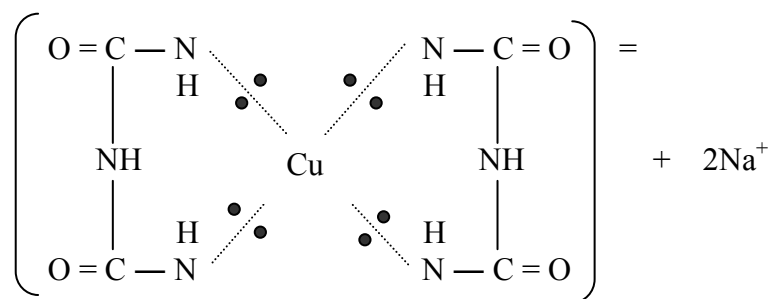
Tomar un huevo de gallina y separar la clara de la yema, colocando la clara en un vaso de precipitados de 250 ml y la yema en otro cualquiera. Batir la clara con una varilla de vidrio, suavemente durante algunos minutos para homogeneizarla. Añadir un volumen de agua cinco veces superior al volumen de la clara. Agitar suavemente. La solución así obtenida es una solución coloidal de albúmina.

Reacción del BIURET

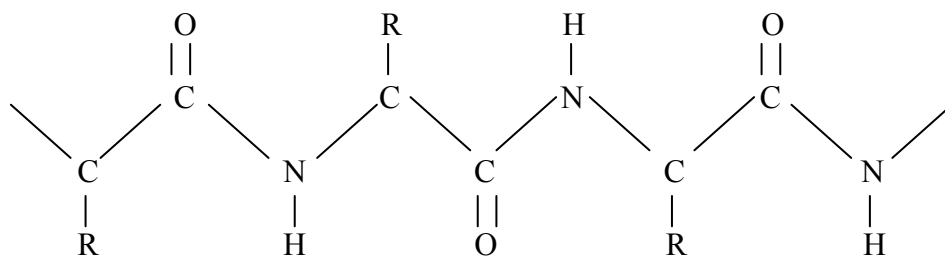
Calentando la urea a 180°C se obtiene el biuret.



en soluciones fuertemente alcalinas el biuret da con el CuSO_4 un complejo de color azul-violeta



Esta reacción es llamada reacción del biuret; también la dan los compuestos con dos uniones amida o peptídicas, unidas directamente o a través de un átomo de carbono intermedio. Los tripeptidos y proteínas que presentan la siguiente estructura dan esta reacción coloreada.



La reacción del biuret se emplea comúnmente como ensayo cualitativo para la presencia de proteínas.

Ensayo: tomar un tubo de ensayo y añadir 2 ml de la solución coloidal de albúmina. A continuación agregar dos gotas de la solución de sulfato de cobre al 0.1% y agitar. Añadir 1 ml de solución de NaOH al 25%, agitar y dejar en reposo unos minutos. La aparición del color azul-violeta será indicativa de la presencia de proteína. Sin embargo, esta reacción no es específica de las proteínas, como ya se ha indicado.

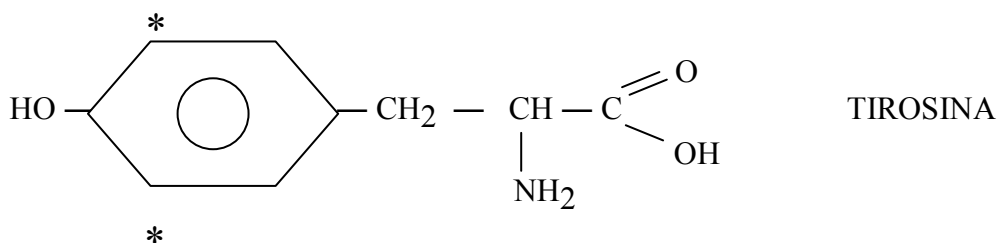
Reacción XANTOPROTEICA

Se utiliza para proteínas que contienen aminoácidos con núcleos aromáticos, ya que el HNO₃ nitra a los núcleos bencénicos de la fenilalanina y la tirosina y oxida sus cadenas laterales produciendo nitrofenoles cuyas sales de sodio son muy coloreadas. Una coloración amarillo fuerte o anaranjado indica presencia de aminoácidos aromáticos.

Ensayo: tomar un tubo de ensayo y agregarle 1 ml de la solución coloidal de albúmina. Añadir 1 ml de ácido nítrico concentrado y calentar ligeramente. Dejar en reposo y observar. Observar lo que sucede al añadir 1 ml de NaOH al 25%.

Reacción de MILLON

Cuando se calientan compuestos fenólicos con Hg(NO₃)₂ en ácido nítrico que contiene trazas de ácido nitroso se forma un color rojo. Dan esta reacción las proteínas que contienen tirosina. La reacción consiste en la mercurización del núcleo fenólico en la posición orto.



Ensayo: en un tubo de ensayo colocar 3 ml de la solución coloidal de albúmina. Agregar cinco gotas del reactivo de Millon. Calentar suavemente a la llama y observar. Al agregar el reactivo de Millon se forma un precipitado blanco grisáceo, que vira al rojo ladrillo cuando se calienta si hay tirosina.

Reacción de SAKAGUCHI

Las guanidinas en solución alcalina dan un color rojo con el reactivo formado por α -naftol e hipoclorito de sodio. Esta reacción la presentan la arginina y las proteínas que contienen este aminoácido.

Reactivos: solución coloidal de albúmina, urea (1gr/l), NaOH (10M), α -naftol (1 g/L en alcohol), agua de Bromo: añadir unas pocas gotas de Bromo a 100 ml de agua dest. en extractor de gases y agitar.

Procedimiento: mezclar 1 ml de álcali fuerte con 3 ml de la solución de albúmina y agregar 2 gotas de α -naftol. Mezclar intensamente y añadir 4 ó 5 gotas de agua de bromo. Anotar el color desarrollado.

Ensayo con NITROPRUSIATO

La cisteína y las proteínas que tienen grupos sulfhidrilo libres dan un color rojo con el nitroprusiato sódico ($\text{Na}_2(\text{NO})\text{Fe}(\text{CN})_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en solución amoniacal diluida.

Reactivos: aminoácidos azufrados (cisterna, cistina y metionia, 1 g/L), Nitroprusiato de sodio (20 g/L, preparar fresco), Hidróxido de amonio.

Procedimiento: mezclar 2 ml de la muestra con 0.5 ml de la solución de nitroprusiato de sodio y añadir 0.5 ml de hidróxido de amonio.

Reacción de FOLIN

Los aminoácidos en solución alcalina producen con 1,2-naftoquinon-4-sulfonato sódico un intenso color rojo. Este método se aplica para la determinación rápida de aminoácidos.

Reactivos: solución de aminoácidos (1g/L), Hidróxido de sodio 10 M, 1,2-naftoquinon-4-sulfonato sódico (10 g/L)

Procedimiento: mezclar 3 ml de la solución de aminoácidos con 1 ml de álcali fuerte y añadir 1 ml del reactivo 1,2-naftoquinon-4-sulfonato sódico.

Reacción con los ALDEHÍDOS

Los derivados del indol dan productos fuertemente coloreados con algunos aldehídos aromáticos. El p-dimetilaminobenzaldehído en ácido sulfúrico da un color rojo-violeta con el triptófano (REACCIÓN DE EHRLICH). Este ensayo se puede utilizar para la determinación del triptófano en las proteínas.

Reactivos: p-dimetilaminobenzaldehído (10 g/L en ácido sulfúrico conc.)

Solución coloidal de albúmina, o solución de aminoácidos 1 g/L)

Procedimiento: añadir 2 ml del reactivo de Ehrlich a 0,5 ml de la muestra y observar los colores.

Reacción de PAULY para la histidina y la tirosina

La histidina y la tirosina, unidas con el ácido sulfanílico diazotado en solución alcalina, dan un color rojo. Los compuestos de diazonio se forman únicamente en frío, por lo que las soluciones deben enfriarse en hielo antes de la diazotización.

Reactivos: aminoácidos (1 g/L), Ácido sulfanílico (10 g/L en solución de HCl 1M), Nitrito de sodio (50 g/L), carbonato de sodio (10 g/L).

Procedimiento: mezclar 2 ml de la muestra con 1 ml de ácido sulfanílico, enfriar en hielo, agregar 1 ml de solución de $\text{NO}_3 \text{Na}$ y dejar en frío durante tres minutos. Alcalinizar la solución añadiendo 2 ml de la solución de carbonato de sodio. Anotar los colores que se forman.

Separación de proteínas de las semillas de soja

1.- Embeber un puñado de semillas de soja en agua destilada durante doce horas como mínimo.

2.- Colocar una parte de dichas semillas en un mortero y machacar hasta lograr una pasta. Agregar 100 ml de agua destilada y disolver la pasta. Filtrar por un paño. La solución contiene proteínas solubles en agua del tipo de las albúminas.

3.- Tomar fracciones del filtrado y efectuar ensayos para la presencia de proteínas.

4.- Retomar la pasta del paño y disolverla en 100 ml de solución de NaCl al 1%. Remover hasta homogeneizarla. Filtrar por el paño. La solución contendrá proteínas solubles en soluciones salinas del tipo de las globulinas. Verificar su presencia.

5.- Retomar la pasta y lavarla con agua destilada para eliminar residuos de sal. Filtrar por paño y descartar el filtrado. Pasar a un recipiente y agregar 100 ml de HCl 0.1 N. Homogenizar y filtrar por paño. El filtrado contendrá las proteínas solubles en ácido pertenecientes al grupo de las gluteínas. Verificar su presencia en el filtrado.

6.- Retomar la pasta, lavar con agua destilada como en el apartado anterior y proceder a extraer la última fracción proteica con alcohol de 70° en forma similar a las anteriores. Se obtendrá la fracción correspondiente a las prolaminas. Verificar su presencia.

PROTEÍNAS

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS

Objetivo

La estructura espacial de las moléculas está íntimamente ligada a la función que cumplen. Este hecho es especialmente cierto en cuanto a las proteínas enzimáticas se refiere. Una proteína que ha perdido su estructura nativa se dice que se ha desnaturizado, y no puede ya cumplir su función. En este trabajo se estudian algunos agentes físicos y químicos que a través de su acción llevan a la desnaturización de las proteínas.

Materiales

Gradilla con 24 tubos de ensayo, baño de María, vaso de precipitados de 1.000 ml, cinta de diálisis, pipetas graduadas para pequeños volúmenes (hasta 10 ml), goteros, alcohol etílico de 96°, ácido nítrico conc., ácido tricloroacético, hidróxido de sodio al 10%, acetato de plomo al 5%, ácido acético, acetato de sodio, fosfato disódico, fosfato monopotásico, glicina y cloruro de sodio.

Procedimiento

Desnaturalización de proteínas

a. *Acción del calor.*- La elevación de la temperatura determina una modificación en la estructura de las proteínas, alterando sus propiedades. Se vuelven insolubles en agua, y precipitan. A esta precipitación por el calor se denomina coagulación.

Ensayo: en un tubo de ensayo se colocan 5 ml de solución coloidal de albúmina. Colocar el tubo en baño de María a ebullición y dejarlo durante cinco minutos. Observar los cambios producidos.

b. *Acción del alcohol.*- Muchas proteínas son insolubles en alcohol, pero si quedan en contacto con este durante algún tiempo no sufren modificación en su estructura (a temperatura ambiente).

Ensayo: colocar en un tubo de ensayo 3 ml de la solución coloidal de albúmina, agregar 5 ml de alcohol etílico de 96°. Esperar cinco minutos y agregar agua para determinar si el precipitado formado es insoluble en agua.

c. *Acción de ácidos fuertes.*- Los ácidos fuertes producen coagulación de las proteínas. En esta reacción algunos ácidos son más activos que otros. Los más coagulantes son el HNO_3 , y el Cl_3CCOOH . Conviene colocar el ácido en el tubo de ensayo y la solución de proteína por las paredes. La coagulación se produce en la línea de separación de las fases (Anillo de Heller). Se utiliza para determinar albúmina en orina.

Ensayo: colocar 1 ml de ácido nítrico concentrado en un tubo de ensayo, y hacer resbalar por la pared 3 ml de la solución coloidal de albúmina.

d. *Acción de álcalis fuertes*.- El tratamiento de las proteínas con álcali origina virajes de color hacia el naranja, sobre todo si hay abundancia de tirosina o triptófano.

Ensayo: colocar en tubo de ensayo 3 ml de la solución coloidal de albúmina y agregar 3 ml de NaOH al 25%. Agitar. Observar los cambios producidos.

e. *Acción de sales de metales pesados*.- Las proteínas precipitan de sus soluciones por la acción de los metales pesados (de peso atómico alto). En general esta precipitación es más completa en medio alcalino.

Ensayo: colocar 3 ml de la solución coloidal de albúmina y agregar 1 ml de acetato de plomo al 5%. Agitar y observar.

Determinación del punto isoelectrico de la caseína

Para la realización de este experimento se prepara una serie de tubos de ensayo con soluciones tamponadas a distinto pH, a fin de determinar el valor del pH al cual se produce la precipitación de las proteínas. Este valor constituye el punto isoelectrico de la proteína, ya que esta precipita cuando su carga eléctrica total es nula. Se citan a continuación los reactivos y las proporciones que se utilizan para algunas de estas soluciones.

Solución reguladora para pH entre 3.42 y 5.57: TAMPÓN ACETATO

Se prepara mezclando las cantidades reseñadas de ácido acético 0.2 N y de acetato de sodio 0.2 N

ml de ácido acético 0.2N	ml de ácido de Na 0.2 N	pH
9.5	0.5	3.42
9.0	1.0	3.72
8.0	2.0	4.05
7.0	3.0	4.27
6.0	4.0	4.45
5.0	5.0	4.60
4.0	6.0	4.80
3.0	7.0	4.99
2.0	8.0	5.23
1.0	9.0	5.57

Solución reguladora para pH entre 5.59 y 8.04: TAMPÓN FOSFATO

Se prepara mezclando las cantidades reseñadas de Na_2HPO_4 0.05M y de KH_2PO_4 0.05M

ml Na_2HPO_4	ml KH_2PO_4	pH
0.5	9.5	5.59
1.0	9.0	5.91
2.0	8.0	6.24
3.0	7.0	6.47
4.0	6.0	6.64
5.0	5.0	6.81
6.0	4.0	6.98
7.0	3.0	7.17
8.0	2.0	7.38
9.0	1.0	7.73
9.5	1.0	8.04

Solución reguladora para pH entre 8.45 y 12.77: TAMPÓN GLICINA·CINa

Se prepara una solución conteniendo 5.85 g de CINa y 7.505 g de glicina por litro de solución. Esta solución se mezcla con cantidades variables de NaOH 0.1 M.

ml glicina-CINa	ml NaOH	pH
9.5	0.5	8.45
9.0	1.0	8.79
8.0	2.0	9.22
7.0	3.0	9.56
6.0	4.0	9.98
5.5	4.5	10.32
5.0	5.0	11.14
4.5	5.5	11.92
4.0	6.0	12.21
3.0	7.0	12.48
2.0	8.0	12.66

1.0	9.0	12.77
-----	-----	-------

Para la determinación del punto isoeléctrico de la caseína, se prepara la serie de pH entre 3,42 y 5,57. A cada tubo se le agrega 1 ml de leche descremada, se agita y se deja descansar durante diez minutos. Se observan los cambios producidos y se deduce el punto isoeléctrico de la caseína.

Diálisis de proteínas

Se toma un vaso de precipitados de un litro y se llena hasta un poco más de la mitad del vaso con agua bidestilada. Se toman con pipeta tres fracciones y se ensaya para detectar la presencia de cloruros, de glúcidos y de proteínas en el agua bidestilada.

Se toma un pedazo de cinta de diálisis, o un papel de celofán, o un trozo de tripa limpia, y se hace una bolsita que se llena con leche descremada cuidando que, al llenarla, la leche no toque la parte externa de la bolsita. Se cierra bien la bolsa y se deja sumergida en el agua durante una hora aproximadamente.

Se vuelven a tomar con una pipeta tres fracciones del agua bidestilada y se ensayan de nuevo para cloruros, glúcidos y proteínas.

Se comparan los resultados finales con los originales y se extraen conclusiones.

NOTA: para determinar la presencia de cloruros se procede de la siguiente forma: se toma una pequeña cantidad de la solución en un tubo de ensayo, y se añade con un gotero o pipeta unas gotas de nitrato de plata 0.01 N. Cuando hay cloruros, aparece rápidamente un enturbiamiento blanco lechoso, en el punto de contacto de las dos soluciones, ya que se forma cloruro de plata que es muy insoluble.

ENZIMAS

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PEROXIDASAS

Objetivo

Las peroxidasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan de forma particularmente activa la oxidación de diversos compuestos orgánicos por el agua oxigenada.

Entre estos compuestos se encuentran: fenoles, aminas aromáticas, aminas primarias, secundarias y terciarias, y algunos compuestos heterocíclicos como el ácido ascórbico, o el indol. En esta práctica emplearemos un fenol, el o-hidroxianisol, más conocido por guayacol.

Como fuente de peroxidasas se hace uso de un extracto enzimático formado al macerar 3 g de hojas de *P. elliottii* con tampón fosfato 0.05 M y pH 7.5, llevado todo a un volumen de 10 ml con el mismo tampón.

El medio de reacción estará constituido por H₂O₂, guayacol, extracto enzimático, y una solución reguladora del pH.

Materiales

Gradilla con 24 tubos de ensayo, centrifuga, fotocolorímetro, agua oxigenada de 10 volúmenes al 25%, guayacol (en alcohol al 70%) al 1%, ácido perclórico 0.02M, sulfato de amonio sólido.

Preparación del tampón fosfato 0.2M: Sol. A= Tomar 28.4 g de Na₂HPO₄, y aforar a 250 ml. Sol.B= Tomar 17.6 g de KH₂PO₄ y aforar a 250 ml.

Para tener un pH de 7.5 tomar 161.0 ml de A y 39.0 ml de B.

Tampón fosfato 0.05M: tomar 50 ml de cada una de las soluciones stock anterior, y diluir a 200 ml cada una. Para tener un pH de 7.5 tomar 161.0 ml de A dil. y 39.0 ml de B dil.

Procedimiento

Primera parte

Tiene por objeto comprobar que para que tenga lugar la reacción de oxidación del guayacol (observable por la aparición de coloración rojiza en el tubo de ensayo), son necesarios todos los componentes del medio de reacción.

Para ello se preparan los tubos esquematizados en el cuadro número 1 los que se ubican en baño de María a 37°C durante 10 minutos. Es importante anotar lo que ocurre en cada tubo de ensayo.

Cuadro N° 1

Reactivos	Tubos (ml)			
	I	II	III	IV
Tampón fosfato 0.2M, pH 7.5	2,25	2,25	2,25	2,25
H ₂ O	5,20	5,20	3,80	3,70
H ₂ O ₂ 0.03M	---	1,50	1,50	1,50
Guayacol 0.12M	1,50	---	1,50	1,50
Extracto enzimático 1/10	0,10	0,10	---	0,10
Volumen total	9,05	9,05	9,05	9,05

Si en los tubos I, II y III tuviera lugar la reacción coloreada, ¿qué se deduciría en cada caso?

Segunda parte

El siguiente grupo de ensayos tiene por objeto comprobar si el compuesto del extracto enzimático responsable de la oxidación del guayacol es una proteína o no lo es. Para ello empleamos dos agentes precipitantes protéicos, el ClO₄H que precipita y desnaturaliza las proteínas, y el SO₄(NH₄)₂ que solamente las precipita.

Precipitación con HClO₄

Mezclar 2 ml de extracto enzimático con 2 ml de HClO₄ 0.02 M. Agitar la mezcla y centrifugar a 3000 rpm. durante 10 minutos. Separar por decantación el sobrenadante del precipitado y redisolver el precipitado en 2 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5. Guardar también el sobrenadante.

Al precipitado redisoluelto lo llamaremos PAP (precipitado ácido perclórico).

Al sobrenadante lo llamaremos SPAP (sobrenadante del PAP)

Precipitación con SO₄(NH₄)₂

Mezclar el extracto enzimático (E) y una solución saturada de SO₄(NH₄)₂ en las proporciones 1 y 4 (1 ml de E y 4 ml de SO₄(NH₄)₂). Agitar y centrifugar a 3000 rpm. durante 10 minutos, decantar el sobrenadante y redisolver el precipitado en 1 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5.

Al precipitado redisoluelto lo llamaremos PSA (precipitado sulfato de amonio).

Al sobrenadante lo llamaremos SPSA.

A continuación se llevan a cabo los ensayos esquematizados en el Cuadro N° 2.

Comentar las reacciones que ocurren en cada tubo.

Cuadro N° 2

Reactivos	Tubos (ml)			
	I	II	III	IV
Tampón fosfato 0.2 M, pH 7.5	2,25	2,25	2,25	2,25
H ₂ O	3,65	3,55	3,65	3,25
H ₂ O ₂ 0.03 M	1,50	1,50	1,50	1,50
Guayacol 0.12 M	1,50	1,50	1,50	1,50
PAP	0,10	---	---	---
SPAP	---	0,20	---	---
PSA	---	---	0,10	---
SPSA	---	---	---	0,50

Tercera parte

Este grupo de ensayos tiene por objeto comprobar la linealidad de la respuesta de la velocidad de reacción frente a la concentración del extracto enzimático. Para ello se miden los cambios de absorbancia de la densidad óptica a 470 nm con ayuda del fotocolorímetro, en los diferentes tubos que se esquematizan en el Cuadro N° 2.

Nota: el extracto E /50 se prepara diluyendo el E 1:10 con tampón fosfato 50 mM, pH 7.5.

Es importante añadir los reactivos en el orden en que aparecen en el Cuadro de experiencias.

A partir de la adición del extracto comenzar a tomar lecturas de Absorbancia a 470 nm a intervalos de 1/2 minuto durante varios minutos.

Cuadro N° 3

Reactivos	Tubos (ml)			
	I	II	III	IV
Tampón fosfato 0.2 M, pH 7.5	2.25	2.25	2.25	2.25
H ₂ O	3.65	3.55	3.45	3.35
H ₂ O ₂ 0.03 M	1.50	1.50	1.50	1.50
Guayacol 0.12 M	1.50	1.50	1.50	1.50
Extracto enzimático E/50	0.10	0.20	0.30	0.40

1) La velocidad de reacción se mide por la pendiente de la gráfica de Absorbancia en función del tiempo, como $\Delta Ab. 470 \text{ nm} \times \text{min}^{-1}$. Construir un Gráfico para cada tubo.

2) Construir una Tabla

Tubo	$\Delta Ab. 470 \text{ nm} \times \text{min}^{-1}$
I (1E)	
II (2E)	
III (3E)	
IV (4E)	

(3) Representar $\Delta Ab. 470 \text{ nm} \times \text{min}^{-1}$ en f(E).

ENZIMAS

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ALFA-AMILASA

Objetivo

Las α -1,4-glucan 4-glucan hidrolasas (α -amilasas) son enzimas que hidrolizan los enlaces α -1,4 del almidón y del glucógeno dando como resultado glucosa, α -maltosa y dextrinas límite. Estas dextrinas límite resultan de la incapacidad del α -amilasa para hidrolizar los enlaces α -1,6, y son grupos de subunidades de glucosa muy ramificados, que son hidrolizados por los enzimas desramificadores, produciendo oligosacáridos lineales.

La acción combinada de α -amilasa y enzima desramificadora, es suficiente en teoría para la hidrólisis completa del almidón.

La α -amilasa es muy abundante en todos los tejidos vegetales, pero sobre todo se encuentra en grandes cantidades en semillas en germinación, y en hojas senescentes. Actualmente se sabe que es el único enzima capaz de atacar el gránulo de almidón nativo.

En nuestro trabajo pondremos de manifiesto la presencia de α -amilasa en hojas a través de su acción sobre el almidón, mediante un análisis colorimétrico, basándonos en el color azul intenso que aparece cuando en presencia de yodo se forma el complejo yodo-almidón.

Materiales

Gradilla con doce tubos de ensayo, mechero, termómetro, baño de María, dos vasos de precipitado de 500 ml, aforado de 50 ml, pipeta de 1 y 10 ml, embudo, papel de filtro, colorímetro, centrífuga. Solución de yodo/yoduro potásico (Lugol), mercaptoetanol.

Solución de almidón: 140 mg de almidón soluble + 600 mg de fosfato monopotásico + 29 mg de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, en 100 ml de agua destilada. Agitar y calentar a ebullición, hervir durante un minuto. Preparar inmediatamente antes de usar.

Tampón fosfato 0.10M, pH 5.6: Sol. A= tomar 3.55 g de Na_2HPO_4 y aforar a 250 ml. Sol. B= tomar 2.2 g de KH_2PO_4 y aforar a 250 ml. 10.0 ml de sol. A, más 190 ml de sol. B dan un pH = 5.6

Procedimiento

Obtención del extracto enzimático

Tomar 3 g de hojas previamente lavadas, secadas y troceadas. Triturar con 40 ml de tampón fosfato 0.10 M, pH 5.5, más 0.1 ml de mercaptoetanol, a una temperatura entre 0 y 4°C, durante 3 periodos de 45 segundos, separados por 2 periodos de reposo de 15 segundos. Filtrar el extracto y aforar a 50 ml con tampón fosfato. Centrifugar a 3.500 g durante 10 minutos. Decantar la fase clara y usar como extracto de enzima.

Determinación de actividad enzimática

Preparar un baño de María a 35°C y situar en él un tubo de ensayo con 1 ml de la solución de almidón, y dejar unos minutos para que se homogeneice la temperatura. Añadir 1 ml de extracto enzimático y agitar. Al cabo de 15 minutos de incubación, se detiene la reacción con 1 ml de solución de yodo.

Preparar los blancos deseados, añadiendo primero la solución de yodo, y después de incubar, la solución de almidón.

Añadir 10 ml de agua a cada uno de los tubos, agitar para homogeneizar la solución y leer la Absorbancia de las muestras y los blancos a 620 nm.

Proporcionalidad entre tiempo de actuación y descenso en Absorbancia

Proceder como en el apartado anterior dejando la mezcla reaccionante en baño de María durante: cero minutos, cinco minutos, diez minutos, quince minutos.

En cada caso parar la reacción con 1 ml de yodo, después de que se haya cumplido el tiempo. Añadir 10 ml de agua a cada tubo y leer la Ab. a 620 nm. Calcular el incremento de Ab., y el incremento de Ab. por minuto.

Proporcionalidad entre cantidad de enzima y descenso en Absorbancia en el medio de incubación

En todos los procesos enzimáticos (cuando permanecen constantes las demás variables y en ausencia de inhibición enzimática por el producto de la reacción), la velocidad de reacción depende de la concentración del sustrato y del enzima.

La velocidad de reacción viene determinada por la velocidad de descomposición del complejo enzima-sustrato (ES), según la hipótesis de Michaelis-Menten.



$$V = K_2 [ES]$$

Si la concentración del sustrato es muy elevada en relación a la del enzima, este se encuentra totalmente en forma de (ES) (complejo enzima-sustrato) y entonces la velocidad de reacción es máxima y vale:

$$V_{max} = K_2 [E] \quad \text{donde } E = \text{concentración enzima}$$

Por lo tanto, el descenso en Ab. por unidad de tiempo es linealmente proporcional al tiempo de actuación del enzima. Para probar la aseveración anterior preparar el siguiente experimento:

Prepare un baño de María a 35°C como anteriormente y sitúe en él seis tubos de ensayo con 1 ml de almidón (sustrato) en cada uno de ellos. Dejar unos minutos para homogeneizar la temperatura.

Coloque en cada uno de los tubos respectivamente:

1 ml; 0.8 ml; 0.6 ml; 0.4 ml; 0.2 ml; 0 ml de extracto enzimático.

Deje incubar durante 15 minutos y pare la reacción con 1 ml de yodo. Agitar.

Añada a cada uno de los tubos agua, para completar un volumen igual en cada uno de ellos. Así, y en este orden:

9 ml; 9.2 ml; 9.4 ml; 9.6 ml; 9.8 ml; 10 ml .

Lea la Ab. a 620 nm y calcule la velocidad de la reacción.

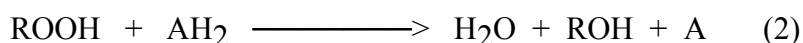
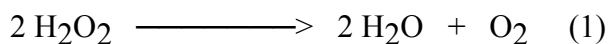
En su informe no olvide graficar el $\Delta Ab.$ (620nm) *versus* tiempo y *versus* concentración de enzima.

ENZIMAS

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA

Objetivo

La catalasa es un enzima ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en casi todos los tejidos animales y vegetales, en los que cataliza las siguientes reacciones:



Su actividad es la más elevada de cuantos enzimas se conocen (una molécula de catalasa puede descomponer 44.000 moléculas de H_2O_2 por segundo).

Los métodos para determinar la actividad de catalasa en materiales biológicos se basan en:

a.- Medidas de la producción de calor en la reacción. El máximo aumento de la temperatura desde el comienzo de la reacción puede servir de medida apropiada de la actividad.

b.- La determinación del oxígeno liberado en la descomposición del H_2O_2 .

c.- Determinación del H_2O_2 residual por diversos métodos.

El método que se va a seguir en esta práctica para la determinación de la actividad de la catalasa pertenece a este último grupo, y consiste en separar muestras de la mezcla en reacción, a intervalos de tiempo, a las que se añade ácido para detener la actividad enzimática. En estas muestras se determina el contenido en H_2O_2 no descompuesta por la catalasa. El H_2O_2 oxida el I^- a I_2 y este último se valora con solución de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$ utilizando almidón como indicador.

En la presente práctica el alumno, a la vez que se inicia en las técnicas de valoración de actividades enzimáticas, podrá comprobar algunos aspectos de la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas (influencia de las concentraciones de enzima y sustrato).

Materiales

Matraz aforado de 500 ml; vaso de 600 ml de pirex; vaso de 25 ml; pesa sustancias, bureta de 25 ml; soporte de 50 cm; pinzas presión bureta; mechero Bunsen; trípode; cuchillo; probeta de 100 ml; batidora; aforado 100 ml; matraces erlenmeyer 100 ml; pipetas de 25, y 10 ml (flujo rápido); pipetas de 5 y 2 ml; microbureta de 5 ml; cronómetro; lienzo; fosfato dipotásico; fosfato monopotásico; ácido sulfúrico; molibdato amónico; yoduro

potásico; tiosulfato sódico; carbonato sódico; yodo; dicromato potásico; ácido clorhídrico; peróxido de hidrógeno; glucosa; almidón soluble.

Solución tampón de fosfato 0.1 M, pH 7.0: disolver 7.61 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ y 2.27 g de KH_2PO_4 en agua destilada y diluir hasta 500 ml.

Solución de ácido sulfúrico-molibdato amónico 2N: añadir 27.5 ml de H_2SO_4 a unos 400 ml de agua destilada, enfriar; añadir 0.05 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ finamente pulverizado, agitar hasta que se haya disuelto completamente y diluir a 500 ml con agua.

Tiosulfato sódico 0.01 N con yoduro potásico 10%: disolver 50 g de IK, 1.25 g de $S_2O_3Na_2$ y 0.5 g de CO_3Na_2 en unos 250 ml de agua destilada y diluir hasta 500 ml (no necesita valorarse).

Solución de yodo 0.01N: disolver 0.64 g de yodo y 1 g de IK en 10 ml de agua, y diluir a 500 ml. Valorar esta solución con solución valorada de $S_2O_3Na_2$ preparada del siguiente modo: disolver 2.5 g de $S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ en 100 ml de agua. Hervir suavemente durante cinco minutos y verterla en caliente, en un frasco previamente lavado con mezcla crómica y enjuagado con agua hervida y caliente. Guardar en sitio oscuro. Pesar alrededor de 0.20-0.23 g de $K_2Cr_2O_7$ (R.A.) secado en estufa a $100^\circ C$ durante dos horas. Disolver en 80 ml de agua exenta de cloro y que contenga 2 g de KI. Añadir agitando, 20 ml de ClH aproximadamente 1 N y guardar en sitio oscuro durante 10 minutos. Valorar con la solución de $Na_2S_2O_3$ añadiendo solución de almidón cuando se haya consumido casi todo el yodo.

Peróxido de hidrógeno 0.1N: diluir 0.58 ml de H_2O_2 al 30% hasta 100 ml con agua fría. Guardarla en refrigerador cuando no se use. Esta solución debe prepararse diariamente.

Solución de glucosa al 20% en solución tampón: disolver 20 g de glucosa en 100 ml de solución tampón fosfato 0.1 M; pH 7.0. Guardar en refrigerador. Esta solución debe prepararse semanalmente.

Almidón indicador: añadir 1 g de almidón soluble a 100 ml de agua fría, agitar y calentar a ebullición, hervir durante un minuto. Esta solución debe prepararse cada dos semanas.

Procedimiento

Preparación del extracto enzimático

Tomar 50 g de papas peladas y troceadas e introducir las en una licuadora junto con 1 g de CO_3Ca y agua hasta un total de 200 ml. Agitar a velocidad máxima durante 3 minutos. Filtrar a través de un lienzo. Tomar 25 ml del filtrado y aforar a 100 ml.

Tomar con una pipeta 10 ml del aforado y verterlos en un erlenmeyer de 20 ml. Añadir 33 ml de agua y 5 ml de solución de glucosa. Agitar. Guardar el aforado en el congelador.

Determinación de la actividad catalásica del extracto enzimático

Verter 10 ml de la solución de sulfúrico-molibdato en cada uno de cuatro matraces erlenmeyer de 100 ml previamente numerados. Añadir 2 ml de la solución de H₂O₂ 0.1N en el matraz erlenmeyer que contiene el extracto enzimático.

INMEDIATAMENTE después de la adición del agua oxigenada, mezclar y tomar RÁPIDAMENTE 10 ml de la mezcla reaccionante con la pipeta de flujo rápido y verterlos en el erlenmeyer nº 1 que contiene la solución de sulfúrico-molibdato. Se tomará como tiempo cero el instante en que el líquido empieza a fluir por la pipeta. Dejar reposar el erlenmeyer en el refrigerador a 0°C.

Exactamente a los 2, 5 y 10 minutos del tiempo "cero" medir otros 10 ml con la misma pipeta y verter en cada uno de los matraces erlenmeyer 2, 3 y 4 que contienen la solución de sulfúrico-molibdato. Dejar reposar estos matraces también en el refrigerador a 0°C.

Exactamente a los 15 minutos de comenzar a vaciarse los 10 ml de mezcla reaccionante en cada erlenmeyer, añadir 15 ml de solución de tiosulfato-yodato.

Extracto enzimático + 2 ml agua oxigenada (E+ H ₂ O ₂)			
0 minutos	2 minutos	5 minutos	10 minutos
10 ml (E + H ₂ O ₂)	10 ml (E + H ₂ O ₂)	10 ml (E + H ₂ O ₂)	10 ml (E + H ₂ O ₂)
1	2	3	4
10 ml sulf. molib.	10 ml sulf. molib.	10 ml sulf. molib.	10 ml sulf. molib.
15 minutos después de la adición del extracto enzimático añadir			
15 ml tio-yod.	15 ml tio-yod.	15 ml tio-yod.	15 ml tio-yod.

Dejar reposar tres, cinco minutos y valorar el exceso de S₂O₃Na₂ con la solución de yodo 0.01N, usando como indicador la solución de almidón (unas diez gotas).

Valorar la prueba en blanco en las mismas condiciones, cambiando el agua oxigenada por agua (es suficiente con una medida por lo que se pueden suprimir las correspondientes a los 2, 5 y 10 minutos).

Representar gráficamente en un papel milimetrado el agua oxigenada que se descompone en función del tiempo. Calcular la actividad de catalasa del extracto

$$Kf = \frac{\frac{1}{t_b - t_a} \log \frac{(A - B)}{(A - C)}}{\frac{\text{gramos}_{\text{muestra}}}{50\text{ml}(\text{muestradexacción})}}$$

t_a = tiempo inicial

t_b = tiempo final

A = ml de solución de yodo 0.01 N gastados para el blanco

B = ml de solución de yodo 0.01 N gastados para la muestra t_a

C = ml de solución de yodo 0.01 N gastados para la muestra t_b

Influencia de la concentración de sustrato sobre la cinética de la acción enzimática

Repetir el procedimiento descrito en 2) para la misma cantidad de extracto enzimático y cantidades decrecientes de agua oxigenada, según el siguiente esquema:

Agua oxigenada	Agua destilada
2.00 ml	---
1.00 ml	1.00 ml
0.50 ml	1.50 ml
0.25 ml	1.75 ml

(Háganse solamente las determinaciones correspondientes al tiempo cero y a los dos minutos). Representar gráficamente la cantidad de catalasa que se ha descompuesto a los dos minutos en función de las concentraciones de sustrato inicialmente presentes.

Influencia de la concentración de enzima sobre la cinética de la reacción enzimática

Repetir el protocolo seguido en el apartado anterior utilizando la misma cantidad de agua oxigenada (2 ml) , variando el extracto enzimático según el siguiente esquema:

Extracto enzimático	Agua destilada
10.00 ml	---
5.00 ml	5.00 ml
2.50 ml	7.50 ml
1.75 ml	8.25 ml
0.875 ml	9.125 ml

En el informe no olvide escribir las reacciones que tienen lugar, calcular gráficamente K_m , y discutir la fórmula dada para K_f .¿Dependerá K_f de la concentración del enzima o de la del sustrato?

ENZIMAS

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PECTINESTERASA

Objetivo

La pectinesterasa es un enzima pectolítico que cataliza la desmetoxilación (hidrólisis de los grupos ésteres metílicos) de las pectinas. Esta reacción enzimática es de gran trascendencia en las industrias de derivados cítricos, pues da lugar a desequilibrios coloidales, con pérdida de la estabilidad de la suspensión formada por las micelas de pectinas. Esto último se debe a que dichas micelas, al aumentar el número de grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) por hidrólisis de sus grupos éster y debido a los iones Ca^{++} del zumo, que sirven de puente de unión entre las moléculas de pectina, forman agregados moleculares, que no pudiendo mantenerse dispersos en el medio, precipitan, sedimentándose en el fondo de los envases. Esto último ocasiona la clarificación o pérdida de la natural turbiedad o "nube" de los zumos, que disminuye su aceptación comercial.

Los anteriores problemas que se ponen de manifiesto durante el almacenamiento se evitan sometiendo a los zumos en el proceso de elaboración a un tratamiento térmico suficiente para inactivar convenientemente la pectinesterasa, pero de una intensidad tal que no se desarrollen sabores extraños (los zumos cítricos son muy sensibles al calor).

De cuanto hemos dicho se desprende el interés que tiene el conocimiento de la actividad residual de pectinesterasa que pueda quedar después de estos tratamientos térmicos. En esta práctica, el alumno podrá ver la intensidad con que tienen lugar estos fenómenos de pérdida de la nube, en relación con la actividad residual de dicho enzima presente en un zumo de naranja después de sometido a distintos tratamientos térmicos.

El método seguido en la medición de la actividad pectinesterásica en esta práctica, se basa en la valoración, con una solución de NaOH 0,1 N de la acidez que aparece por efecto de la hidrólisis enzimática, durante un intervalo de tiempo determinado (30 minutos) previa neutralización del zumo hasta pH 7.

Materiales

Cuchillo, vasos de precipitados de 400, 250, y 50 ml de Pirex, bureta de 25 ml, microbureta de 10 ml, soportes de 75 y 50 cm, pinzas para bureta, 1 probeta de 1.000 ml, y tres de 50 ml, baño de agua 2 litros, termómetro de 0 a 100°C, agitador eléctrico, pH metro, exprimidor, pectina, alcohol etílico 96°, hidróxido sódico, cloruro sódico, naranjas.

Sustrato de pectina: pesar 10 g de pectina en un vaso de 400 ml. Añadir una pequeña cantidad de alcohol etílico para humedecer la pectina y unos 800 ml de agua muy lentamente y sin dejar de agitar vigorosamente. Una vez disuelta toda la pectina añadir 0.2 moles de cloruro sódico, agitar y diluir hasta un litro. Esta solución, cuando no se usa debe guardarse a -15, -20°C.

Solución de hidróxido sódico 0.1 N.

Solución de hidróxido sódico 0.05 N: prepararla a partir de la solución anterior.
Determinar su factor utilizando el pH metro.

Procedimiento

Esquema general del procedimiento

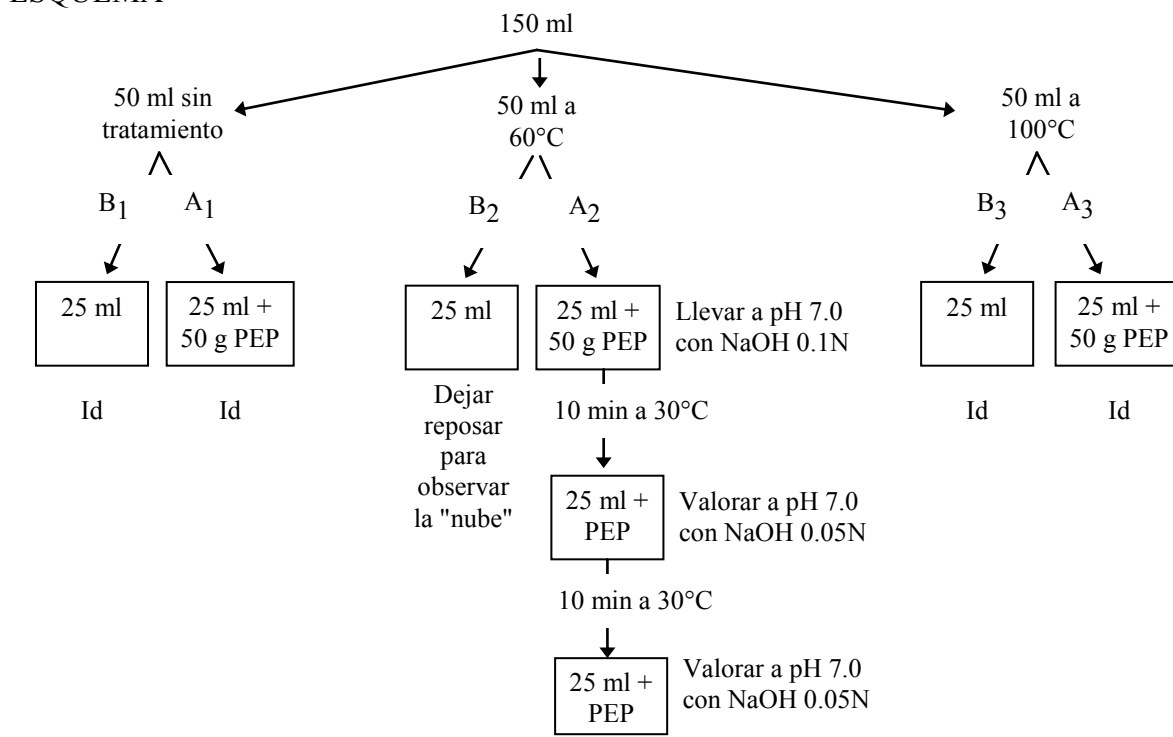
Exprimir naranjas hasta obtener 150 ml de zumo pasados por un tamiz de 0,7 mm. Tomar 50 ml de zumo y separarlo en dos fracciones A₁ y B₁ de 25 ml cada una. Determinar en una de ellas (A) la actividad de la pectinesterasa, guardar la otra (B) en una probeta etiquetada para observar la pérdida de nube que experimenta el zumo.

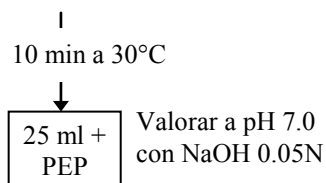
Tomar otros 50 ml y calentar a 60°C, en un baño de agua durante un minuto. Enfriar rápidamente. Separar la mitad del zumo calentado y hacer dos fracciones A₂ y B₂ con las que se procederá del mismo modo que en el apartado anterior.

Calentar los 50 ml de zumo restantes a ebullición en un baño de agua durante un minuto. Enfriar rápidamente. Separar dos fracciones iguales A₃ y B₃ y proceder como en los casos anteriores.

Observar, al final de la sesión, la distinta turbiedad de los zumos depositados en las probetas B₁, B₂ y B₃. Relacionar las diferencias observadas con los valores obtenidos para la actividad de pectinesterasa en A₁, A₂ y A₃.

ESQUEMA





Determinación de la actividad de la pectinesterasa

Calentar un baño de agua a 30°C (+ - 0,5°C). Pesar en un vaso de 100 ml, 50 g de sustrato de pectina. Añadir 5 ml del zumo a ensayar y rápidamente llevar a pH =7 con NaOH 0,1 N .

Colocar el vaso en el baño de agua a 30°C y valorar hasta pH 7 con NaOH 0,05 N a intervalos de diez minutos hasta completar treinta minutos (tres valoraciones) .

Calcular la actividad de la pectinesterasa aplicando la fórmula:

$$A_{(PE)} = \frac{1,55 \times \text{mL de NaOH } 0,05 \text{ N gastados en las tres valoraciones}}{\text{vol. de la muestra} \times \frac{\text{grados Brix}}{100}}$$

$$A_{(PE)} = \frac{\text{mg de metóxido separados en 30 minutos por la enzima}}{\text{g de sólido soluble o grados Brix}}$$

ENZIMAS

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFATASA ÁCIDA

Objetivo

La actividad enzimática es responsable de una gran cantidad de reacciones, sobre todo las que tienen lugar en los seres vivos. En este sentido, la fosfatasa ácida es un enzima que hidroliza los ésteres del ácido ortofosfórico. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza entrando a formar parte tanto de los tejidos vegetales como animales. El método que se va a seguir para la determinación de la actividad de la fosfatasa ácida se basa en la formación de fenol por la acción del enzima sobre el sustrato disodio fenil fosfato (DPP), seguido de la determinación colorimétrica del fenol formado al reaccionar con el reactivo de Folin Ciocalteu.

Materiales

Gradilla con 12 tubos de ensayo; baños de agua a 38°, 50° y 70°C, dos mecheros; 2 vasos de precipitados de 100 ml; erlenmeyer de 100 ml; pipetas graduadas de 5 y 10 ml; solución de disodio fenil fosfato 0,025 M ajustada a pH 5,3 con ClH 1 N. ; tampón citrato de pH 3,0; 5,3; 6,2; solución de carbonato sódico al 10%; reactivo de Folin Ciocalteu en la proporción 1:1 (1,2-nafto-quinon-4-sulfonato sódico).

Solución estándar de fenol: se preparan 100 ml de una solución de 100 mg en agua destilada.

Solución diluida de fenol: se prepara diluyendo 2 ml de la solución estándar hasta 100 ml con agua destilada. Cada ml contiene 20 µg de fenol.

Solución 0,5 N de ClH; solución 0,5 N de NaOH; pH metro.

Procedimiento

Preparación del extracto enzimático

Pesar 5 g de germen de trigo en un vaso de precipitados de 250 ml. Añadir 100 ml de agua destilada. Agitar con agitador magnético a temperatura ambiente, durante 20 minutos.

Centrifugar a 5000 rpm durante 20 minutos. Filtrar con papel Whatman nº 1. Guardar el filtrado en baño de agua-hielo.

Preparación de la curva estándar de fenol

Preparar ocho tubos con los siguientes ingredientes:

	Tubos (ml)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Solución diluida de fenol	0.0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	1.2	1.5
H ₂ O	1.5	1.4	1.2	1.0	0.8	0.5	0.3	0.0
CO ₃ Na ₂ 10%	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Folin	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Mezclar bien el contenido de cada tubo antes de añadir el Folin. Introducirlos durante 15 minutos en un baño a 38°C.

Añadir el reactivo de Folin. Mezclar y dejar reposar durante 15 minutos. Después del tiempo indicado, proceder a leer la absorbancia de cada tubo a 660 nm. Antes de cada medida, el colorímetro se coloca al 100% de transmitancia con el tubo número uno.

Trazar en papel semilogarítmico la curva que da la absorbancia (transmitancia) de la disolución de fenol en función de su concentración.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Preparar 6 tubos de ensayo numerados del 1 al 6 e introducir en cada uno de ellos los siguientes ingredientes:

	Tubos					
	I	II	III	IV	V	VI
Disodio fenil fosfato 0,025 M (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tampón 4 ml (pH)	3.0	3.0	5.3	5.3	6.2	6.2
H ₂ O (ml)	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8

Mezclar bien el contenido de cada tubo y colocar en un baño a 38°C. Atemperar a 38°C durante dos minutos 15 ml de extracto de enzima.

Añadir 2 ml de ese extracto a cada tubo. Anotar la hora. Agitar bien. Colocar de nuevo el tubo dentro del baño.

A tiempo 0 y 20 minutos contados desde el momento de la adición del enzima se toma 1 ml de la mezcla reaccionante y se coloca en un tubo que contiene 10 ml de carbonato sódico al 10% previamente preparado. Mezclar y esperar a tener todos los tubos.

Añadir ahora a cada tubo 1 ml de Folin. Mezclar bien y medir la absorbancia a 660 nm en un colorímetro. La actividad del enzima es la diferencia de la absorbancia a los 0 y 20 minutos de su incubación.

Representar gráficamente la actividad del enzima en función del pH.

Efecto del pH sobre la termoestabilidad

Preparar doce tubos de ensayo y numerarlos del 1 al 12.

Añadir a cada tubo los siguientes ingredientes:

	Tubos											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Tampón 4 ml (pH)	3.0	3.0	3.0	3.0	5.3	5.3	5.3	5.3	6.2	6.2	6.2	6.2
H ₂ O (ml)	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
Enzima (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

Colocar los tubos 1, 2, 5, 6, 9 y 10 en un baño a 50°C durante 15 minutos y los tubos 3, 4, 7, 8, 11 y 12 en baño a 70°C durante 15 minutos.

Sacar los tubos y enfriarlos rápidamente. Ajustar el pH de cada tubo a 5 con ClH 0,5 N ó NaOH 0,5 N utilizando el pH metro. Añadir finalmente agua hasta completar 10,5 ml de volumen.

Añadir ahora 0,2 ml de sustrato y sumergir los tubos en baño a 38°C.

Tomar muestras a 0 y 20 minutos. Tomar 1 ml de mezcla reaccionante y colocarlo en un tubo que contiene 10 ml de carbonato sódico al 10%. Mezclar y esperar a tener todos los tubos. Añadir a cada tubo 1 ml de Folin. Mezclar bien y medir la absorbancia a 660 nm en un colorímetro. La actividad del enzima es la diferencia de la absorbancia a los 0 y 20 minutos de la incubación.

Representar gráficamente para cada temperatura la actividad enzimática en función del pH durante el tratamiento.

ENZIMAS

INACTIVACIÓN DE ENZIMAS

Objetivo

La actividad enzimática es responsable de una gran cantidad de reacciones, sobre todo de las que tienen lugar en los seres vivos. El conocimiento de los enzimas es imprescindible para el control de su actividad, favoreciéndola o atajándola, según las conveniencias, en particular de la industria alimenticia.

La actividad de un enzima aislado se pone de manifiesto en la primera parte de la práctica. En la segunda, puede observarse un caso típico de inactivación, típico en la industria de conservación de alimentos.

Materiales

Gradilla con 12 tubos de ensayo, mechero, vaso de precipitados, pinzas de madera, solución de guayacol al 1%, solución de agua oxigenada al 0.5%, solución de yodo-yoduro al 0,5%, solución de alfa-amilasa al 0.1%.

Procedimiento

ACTIVIDAD DE LA ALFA-AMILASA

Tomar tres tubos de ensayo y añadir a cada uno de ellos 1 ml de solución de almidón y 1 ml de agua.

Añadir al primer tubo 1 ml de agua (servirá como blanco o patrón). Al segundo y tercer tubos añadir 1 ml de solución de alfa-amilasa al 0,1%.

Al cabo de un minuto de haber añadido la solución de amilasa, agregar al segundo tubo, gota a gota hasta la coloración solución de yodo. Observar las transformaciones que se producen.

Proceder idénticamente después de diez minutos con el tubo número tres. Observar los cambios y comparar con lo ocurrido en el tubo número dos.

Tomar dos tubos de ensayo y añadir a cada uno de ellos 1 ml de la solución de almidón.

Sumergir uno de ellos en agua fría (2 a 3°C) y el otro en un baño a 37°C.

Añadir a cada uno de los tubos 0,5 ml de solución de alfa-amilasa. Dejar reposar durante 5 minutos y a continuación añadir 1 ml de solución de yodo. Observar lo que sucede.

INACTIVACIÓN DE ENZIMAS

Tomar 10 a 12 g de arvejas o habas. Dividirlos en tres grupos, uno de los cuales servirá como blanco, envolviéndolos en un trozo de gasa.

Hervir agua en un vaso de precipitados de 100 ml y CUANDO ESTÉ EN EBULLICIÓN, añadir el segundo grupo de arvejas y escaldarlo durante medio minuto.

Repetir la operación con el tercer grupo escaldándolo durante tres minutos.

Cortar en segmentos las unidades de cada uno de los grupos y ponerlos en tubos de ensayo numerados.

Añadir a cada tubo 5 ml de agua, 1 ml de solución de guayacol al 1% y 1 ml de agua oxigenada al 0,5%.

Observar el color desarrollado a los dos a tres minutos en cada tubo de ensayo. El desarrollo de un color pardo rojizo demuestra la presencia de peroxidasa.

Informe

Reseñar y justificar las observaciones efectuadas en cada uno de los puntos anteriores.

ENZIMAS

ALGUNOS ASPECTOS DE LA CINÉTICA DE LA ACCIÓN ENZIMÁTICA

Objetivo

La presente práctica tiene un doble objeto: introducir al alumno en el manejo del aparato de Warburg aplicado a la determinación de una actividad enzimática, a la vez que ilustrar una serie de aspectos interesantes en torno a la cinética de la acción enzimática (curso de una reacción enzimática, curvas de saturación de un enzima, constante de Michaelis e influencia de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción).

El método introducido por Warburg consiste esencialmente en una medida manométrica de gases que permite el estudio de procesos metabólicos en los que ocurren cambios gaseosos (respiración, fijación de CO_2 o de O_2 , descarboxilaciones).

El aparato de Warburg también puede ser utilizado para medir actividades enzimáticas en procesos en los que no tiene lugar ningún cambio gaseoso, siempre que alguno de los productos de la reacción pueda hacerse reaccionar con alguna sustancia que produzca dicho cambio. En este caso lo vamos a aplicar a una actividad de lipasa.

El método que se va a seguir para la determinación de la actividad lipásica se basa en la medida manométrica del CO_2 desprendido al reaccionar el ácido butírico (producto de la reacción enzimática) con el CO_3HNa presente.

Materiales

Dos vasos de precipitado de 250 ml de Pirex; pipetas graduadas de 1 y 5 ml; una pipeta de 50 ml; un embudo Büchner de 10 cm de diámetro; un kitasatos de 500 ml; Erlenmeyers; agitador eléctrico; soporte de 50 cm.; tamiz de 24 mallas; centrífuga; aparato de Warburg; éter de petróleo; salvado de arroz; Tween 20; CO_3HNa 0,02M; CO_3HNa 0.0148 M.

Reactivo de tributizina: introducir en un tubo de ensayo cuatro gotas de Tween 20. Añadir 1 ml de tributizina con agitación constante. Por último, añadir también con agitación 25 ml de CO_3HNa 0.0148 M.

Procedimiento

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Tamizar 200 g de salvado de arroz y recoger la fracción que pasa por un tamiz de 24 mallas. Llevar el tamizado a un vaso de precipitados de 250 ml, añadir dos volúmenes de éter de petróleo o hexano comercial y agitar suavemente durante 15 minutos. Filtrar a vacío

con ligera succión mediante un embudo Büchner, con una placa de papel de filtro acoplada a un kitasatos.

Lavar cinco veces con un volumen de hexano suficiente para cubrir el salvado. Terminada la succión, eliminar el residuo de disolvente por evaporación a temperatura ambiente.

Pesar 10 g del producto desengrasado, llevar a un vaso de precipitados de 250 ml, añadir 50 ml de agua destilada y agitar durante 15 minutos manteniendo la temperatura entre 0 y 5°C, mediante un baño con hielo (durante la agitación debe evitarse la formación de espuma).

Centrifugar la mezcla a 2000 rpm durante 15 minutos y recoger el líquido que sobrenada en un erlenmeyer para valorar su actividad lipásica.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Tomar dos ampollas del aparato de Warburg e introducir en cada una de ellas 1.5 ml de CO_3HNa 0.02 M.

Muestra en blanco: introducir en una de ellas 1 ml de agua destilada y en su bulbo lateral 0.5 ml de tributizina.

Muestra problema: verter 1 ml del extracto enzimático en la otra ampolla, y en su bulbo lateral 0.5 ml de tributuzina.

Montar en cada bulbo el vástago correspondiente, y acoplar cada ampolla a su manómetro. Bajar el líquido manométrico accionando el tornillo que llevan los manómetros en la parte inferior. Desplazar el aire de los manómetros por paso de una mezcla de nitrógeno y anhídrido carbónico durante 5 a 10 minutos.

Conectar el termostato agitador unos 25 - 30 minutos antes de su utilización. Calentar hasta 38°C.

Colocar los manómetros con sus ampollas en el baño del aparato de Warburg, abrir la llave de los manómetros y volver a cerrar para bajar el desnivel. Poner en funcionamiento el agitador durante unos 5 minutos para atemperar las ampollas (con la llave de los manómetros cerrada, de modo que las ampollas quedan comunicadas con el exterior), hasta que al abrir las llaves de los manómetros no se produzca desnivel en sus ramas.

Con la llave de los manómetros abierta, llevar el líquido manométrico hasta una división fija (la 15 por ejemplo).

Mezclar el contenido de la ampolla y el bulbo (debe cuidarse que las llaves de los manómetros estén abiertas, de lo contrario los gases desprendidos como consecuencia de la reacción saldrían al exterior). Conectar la agitación del aparato y agitar el sistema durante 15 minutos.

Tomar nota de las lecturas manométricas cada tres minutos.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA CINÉTICA DE LA ACCIÓN ENZIMÁTICA

Manteniendo constante la cantidad de extracto enzimático añadido (1 ml), repetir las operaciones anteriores utilizando cada vez las siguientes cantidades de tributizina y agua destilada.

<u>Tributizina</u>	<u>Agua destilada</u>
0.250 ml	0.250 ml
0.125 ml	0.375 ml
0.062 ml	0.438 ml

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA SOBRE LA CINÉTICA DE LA ACCIÓN ENZIMÁTICA

Repítase el protocolo seguido en los apartados anteriores utilizando cada vez 1 ml de extracto enzimático diluido a la mitad, cuarta, octava y dieciseisava parte respecto del original, y 0.5 ml del reactivo tributizina inicialmente preparado.

Informe

Escribir las reacciones que tienen lugar. Las unidades de actividad enzimática frecuentemente son de índole empírica, y para una misma reacción enzimática la actividad puede expresarse de diversos modos. Exprese de tres modos distintos la actividad lipásica del extracto estudiado.

Representar gráficamente en papel milimetrado la marcha de la reacción en función del tiempo.

Representar gráficamente en papel milimetrado la variación de la actividad a los tres minutos en función de la concentración de sustrato (curva de saturación del enzima).

Calcular gráficamente la constante de Michaelis.

Representar gráficamente la variación de la actividad en función de la concentración de extracto enzimático.

PROTEÍNAS

ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE UNA PROTEÍNA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA

Objetivo

Un procedimiento comúnmente utilizado para obtener los aminoácidos componentes de una proteína, es su hidrólisis ácida. Otros agentes hidrolizantes son los álcalis y las enzimas proteolíticas. En cualquier caso, los enlaces peptídicos se rompen con adición de una molécula de agua en cada uno de ellos.

Pero la hidrólisis no es simultánea en todos los enlaces peptídicos, y durante el proceso se forman además una serie de subunidades, péptidos, de peso molecular y de tamaño diverso.

La velocidad de la hidrólisis puede ser medida por valoración de los grupos α -amino o α -carboxilo liberados, o por la determinación directa de los propios aminoácidos. En la presente experiencia va a ser observado el curso de la hidrólisis ácida de una proteína por medio de una cromatografía en papel circular, y/o en capa fina (TLC); se medirá por lo tanto la velocidad de aparición de los aminoácidos.

Materiales

Gradilla con 12 tubos de ensayo, mechero y trípode con rejilla, baño y termómetro, desecador de unos 30 cm de diámetro, recipientes para cromatografía, 25 cm de mecha fina, papel Whatman nº 1, capilares, tijeras, papel de celofán adhesivo. Globulinas, HCl conc. ATC (ácido tricloroacético) al 30%, ácido acético glacial, el de sílice para cromatografía. L - leucina (1 mg por ml de agua).

Disolventes para cromatografía:

- a) n-butanol - ácido acético glacial - agua (4 : 1 : 5)
- b) metanol - amoniac conc. - cloroformo (2 : 1 : 2)

Revelador: 0.3 g de ninhidrina en 100 ml de butanol + 3 ml de ácido acético glacial.

Procedimiento

Preparación del equipo para cromatografía en papel circular

Córtese un círculo de papel de filtro Whatman nº 1 previamente lavado con ácido acético 1N y secado, de unos 30 cm de diámetro, y divídase en seis sectores mediante unos diámetros trazados con lápiz.

Para evitar que el disolvente pase de un sector a otro, córtense ranuras de 0.5 cm de ancho siguiendo las líneas divisorias de los segmentos, desde el borde del disco hasta unos

1.5 cm del centro. Para dar mayor consistencia al disco de papel, péguense unos fragmentos de papel de celofán adhesivo en los extremos de las ranuras.

Por último, dibújese a lápiz una circunferencia de 4 cm de diámetro alrededor del centro del disco, a lo largo de la cual se harán las aplicaciones de las muestras a cromatografiar.

Como cámara de cromatografía se utilizará un desecador en cuyo interior se deposita una cápsula Petri con el disolvente, y sobre cuyos bordes se coloca el disco de papel de filtro para la cromatografía. El disolvente se hace llegar al disco de papel mediante una mecha previamente impregnada con ácido acético, que desde la placa Petri va hasta un orificio practicado en el centro del disco de papel, procurando que la mecha ajuste bien sin holgura.

Preparación del equipo para cromatografía en capa fina (TLC)

Se limpian y desengrasan minuciosamente láminas de vidrio común cuidando de manipularlas tomándolas por el borde para no dejar grasa sobre la lámina. Asimismo se desengrasa una varilla de vidrio dos veces más larga que el ancho de las láminas.

Se prepara una suspensión con 15 g de gel de sílice para cromatografía y 10 ml de agua destilada en un erlenmeyer, agitando continuamente, hasta que la consistencia comience a cambiar y la pasta se espese. En ese momento y con ayuda de la varilla se extiende sobre las láminas de vidrio, formando una capa de espesor uniforme sobre estas, que seca rápidamente. Se obtienen así las placas que servirán de soporte a la cromatografía.

Las placas se dejan secar al aire, y antes de usar se "activan" manteniéndolas una hora a 100°C.

La siembra se efectúa a aproximadamente 1.5 cm de uno de los bordes de la placa. Para asegurar suficiente concentración del material a cromatografiar, se siembra repetidamente en el mismo lugar, con la misma muestra, teniendo cuidado de secar la mancha cada vez que se siembra, utilizando para esto el aire caliente que genera un secador de cabello.

Como cámara de cromatografía se utilizan recipientes de vidrio que se puedan cerrar, donde el eluyente debe ponerse unas horas antes de la corrida cromatográfica, para que la atmósfera interior se sature con los componentes volátiles del eluyente.

Hidrólisis ácida de las globulinas

Situar en un tubo de ensayo 8 ml de la solución de globulina (10 mg de globulina en 8 ml de agua) y 2 ml de HCl conc., mezclar bien e inmediatamente extraer con una pipeta 2 ml de esta proteína en digestión, introducirlos en un tubo de ensayo que contenga 0.5 ml de la solución de ATC al 30%, agitar. Ese instante se tomará como tiempo cero.

Tapar con un tapón de corcho el tubo que contiene la proteína en digestión y sumergir en un baño de agua hirviendo. Extraer con una pipeta fracciones de 2 ml a los 20, 40 y 60 minutos de la reacción y llevarlas a tubos de ensayo que contengan también 0.5 ml de ATC

al 30%. Téngase cuidado con el manejo del ATC pues es muy corrosivo. Después de cada extracción se lava la pipeta dos veces con agua destilada y una con la fracción que se ha de pipetear.

Filtrar cada una de las fracciones con papel de filtro, y con un capilar aplicar una pequeña mancha de cada filtrado al papel o a la placa, teniendo cuidado de numerar o marcar cada uno de los sectores, para identificar las fracciones depositadas sobre ellos.

Reserve el primer sector para la muestra conocida de aminoácido (L- leucina en nuestro caso), el segundo para la fracción correspondiente al tiempo cero, el tercero para la de veinte minutos y así sucesivamente (después de cada aplicación lávese el capilar dos veces con agua destilada y una vez con la solución que se ha de aplicar). Para concentrar las manchas séquense con aire caliente, y vuelva a sembrar con la misma solución en el mismo lugar.

Colóquese el disco de papel en el desecador, cuidando de ubicar correctamente la mecha, y deje que se desarrolle la cromatografía hasta que el borde del disolvente alcance hasta los 2 cm del borde del papel (3 a 4 horas normalmente). Retirar el disco, marcar el frente del disolvente con una raya a lápiz, secar en estufa a 55°C, y en el interior de una vitrina revelar la cromatografía pulverizando con el reactivo de ninhidrina. Desarrollar el color en estufa a 100°C.

Si se trabaja con TLC, colocar la placa en el recipiente donde está el eluyente (después de haber seguido el procedimiento de siembra igual que anteriormente, sobre una línea imaginaria recta situada a 2 cm del borde de la placa), de forma que aproximadamente 0,5 cm de la placa quede sumergido en él. Dejar que se desarrolle la cromatografía hasta que el frente del disolvente haya alcanzado los 2 cm del borde de la placa (45 minutos aproximadamente). Retirar las placas. Marcar el frente del disolvente con una muesca de sílice, y proceder igual que con la cromatografía en papel.

PROTEÍNAS

IDENTIFICACIÓN DE UN AMINOÁCIDO PROBLEMA MEDIANTE SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA SOBRE PAPEL

Objetivo

Uno de los métodos más utilizados para la separación e identificación de aminoácidos en mezclas de los mismos, es la cromatografía. Entre las distintas técnicas cromatográficas, la cromatografía sobre papel es muy empleada con fines cualitativos.

Materiales

Gradilla con 12 tubos de ensayo, pinzas para tubos, espátula, cámara de cromatografía, papel Whatman n° 1, cloroformo, metanol, amoníaco concentrado, soluciones de aminoácidos patrones, solución de un aminoácido problema, revelador (solución de ninhidrina al 0.3% en butanol), caseína (0.05 g), solución de proteína desnaturalizada, sulfato de cobre al 0.1% (gotas), NaOH al 25%, ácido nítrico conc.

Procedimiento

Preparar una mezcla de 100 ml de: cloroformo, metanol y amoníaco concentrado en proporciones 2 : 2 : 1 y agitarla fuertemente. Esta mezcla constituye el "eluyente".

Colocar la cantidad necesaria en la cámara de cromatografía unas horas antes de que se inicie la corrida cromatográfica, para que la atmósfera interior de la cámara esté saturada con los vapores del eluyente, en el momento de ser utilizada.

Tomar papel Whatman n° 1 y recortar una tira de acuerdo con las dimensiones de la cámara de cromatografía. Trazar muy débilmente, con un lápiz, una recta paralela al lado que va a servir de base y a unos 3 cm de distancia de esta.

Tomar un pequeño volumen de la solución que contiene la mezcla conocida de aminoácidos con un capilar y hacer un toque en un punto de la línea trazada. Repetir la operación con todas las muestras que se disponga, haciendo puntos sobre la misma línea, a 3 cm de distancia unos de otros. Repetir la operación de "siembra", sobre los mismos puntos ya sembrados y con la misma muestra en cada punto, de forma de concentrar la cantidad de muestra (entre siembra y siembra se deben dejar secar las manchas, y nunca sembrar de nuevo sobre una mancha húmeda).

Llevar la tira seca a la cámara e introducirla en ella de forma que el extremo inferior próximo a las manchas quede sumergido en el líquido eluyente. Tapar la cámara y esperar hasta que el frente del eluyente haya recorrido unos 15 - 20 cm a partir de la línea de manchas. Entonces interrumpir el proceso sacando la tira de papel, marcar con un lápiz la línea definida por el frente del disolvente y secar la tira con un ventilador.

REVELADO DE LA CROMATOGRAFÍA: operación que tiene por objeto hacer visibles las manchas para su identificación. Para ello se pulveriza la tira con el reactivo Revelador dentro de la campana de gases, y a continuación se tiene en estufa durante 10 minutos a 100°C.

PRECAUCIÓN ESPECIAL: como consecuencia de la facilidad con que la tira de papel está en contacto con sustancias que contienen proteínas y aminoácidos (manchas en la mesa, soluciones, piel, etc.) se procurará tener el mínimo contacto posible de la tira con toda clase de objetos. Durante la aplicación de las muestras, la tira se mantendrá cuidadosamente sobre papel de filtro corriente.

IDENTIFICACIÓN: el eluyente tiene la propiedad (fundamento de la separación cromatográfica) de arrastrar la mancha de aminoácido en una distancia característica para cada uno de ellos, medida a partir de la línea de aplicación hasta la zona de aparición de la mancha.

En cada serie de disolventes, los distintos aminoácidos alcanzan una distancia característica que, numéricamente, se expresa mediante el término R_f (relación de frente). El R_f de cada aminoácido es, de este modo, constante para cada disolvente, y sirve para su identificación.

Su valor es :

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la mancha del aminoácido}}{\text{Distancia recorrida por el frente eluyente}} \times 100$$

En el eluyente citado y para los aminoácidos de la mezcla, los R_f son en orden creciente:

arginina, metionina, beta - fenil - alanina.

Se pide calcular los R_f de cada uno de ellos, así como el del aminoácido problema y determinar, por comparación de valores, cuál es este.

ÁCIDOS NUCLEICOS

AISLAMIENTO DE ADN A PARTIR DE BAZO DE CERDO

Objetivo

Casi todas las células contienen ADN, pero la cantidad presente en algunos tejidos es pequeña, y por lo tanto no son buen material para su extracción. Además, algunos tejidos presentan gran actividad de la enzima desoxiribonucleasa (DNasa) la cual fragmenta el ADN haciendo imposible por lo tanto su aislamiento. Una fuente adecuada para la extracción de ADN debe, por lo tanto, contener cantidades altas de este material y tener muy baja actividad de desoxiribonucleasa. El tejido linfoide es muy bueno, el timo es la mejor fuente, pero el bazo puede usarse con buenos resultados.

El ADN se desnaturaliza fácilmente y debe trabajarse con cuidado para obtener un producto estructuralmente semejante al encontrado en la célula. Debe evitarse la tensión mecánica y condiciones físicas y químicas extremas y deben inhibirse las nucleasas. Se puede agregar citrato de sodio para ligar (quelar) Ca^{++} y Mg^{++} los cuales son cofactores de la DNasa. Aquellas etapas del procedimiento anteriores a la separación de las proteínas deben hacerse tan rápidamente como sea posible y en frío.

Las nucleoproteínas son solubles en agua y soluciones de alta concentración iónica, pero insolubles en soluciones de baja concentración iónica (0.05 a 0.25 mol/L) y esta propiedad es usada para su extracción. Primero el tejido es homogeneizado en solución salina isotónica amortiguada con citrato de sodio pH 7.0, en la que se solubilizan la mayoría de las otras moléculas, mientras que las desoxiribonucleoproteínas permanecen insolubles, pero pueden solubilizarse posteriormente en solución salina 2 mol/L.

La proteína se separa tratando la solución con una mezcla de cloroformo / alcohol amílico y el ADN se precipita con etanol. El producto se disuelve en amortiguador salino diluido y se guarda congelado. En esta forma es estable por varios meses.

Materiales

Bazo de cerdo, amortiguador salino (NaCl 0.15 M amortiguado con citrato de sodio 0.015 M, pH 7.0), cloruro de sodio 2 M, cloroformo/alcohol amílico (6:1), alcohol absoluto, eter, licuadora, centrífuga.

Procedimiento

Tomar 50 g de bazo de cerdo y picar en trozos muy pequeños. Homogeneizar en licuadora con 200 ml de tampón salino durante un minuto.

Centrifugar la suspensión a 5.000 g durante 15 minutos, desechar el sobrenadante, y redissolver el precipitado en otros 200 ml de tampón salino. Volver a centrifugar, desechar

el sobrenadante y redissolver el precipitado en aproximadamente 100 ml de NaCl 2M , agitando continuamente.

Añadir un volumen igual de la mezcla de cloroformo/alcohol amílico (6:1) y homogeneizar por treinta segundos.

Centrifugar la emulsión a 5000 g durante 10 - 15 minutos y recoger la capa superior acuosa (opalescente). La recolección debe hacerse por succión cuidadosa en forma tal que no se agite la proteína presente en la interfase de los dos líquidos.

Repetir por dos veces más el tratamiento del precipitado con solvente orgánico y recoger el sobrenadante en un vaso de 500 ml.

Precipitar el ADN agitando lentamente el sobrenadante con dos veces su volumen en alcohol enfriado en hielo y rotar una varilla de vidrio hasta que las fibras se enrollen.

Sacar la varilla y presionar cuidadosamente el ADN fibroso contra las paredes del vaso de precipitados para exprimir el solvente.

Lavar finalmente el precipitado metiendo la varilla en una serie de solventes exprimiendo el exceso en la forma descrita. Los cuatro solventes son: etanol al 70%, etanol al 80%, etanol absoluto y éter.

Dejar evaporar el éter remanente colocando el ADN en un vidrio de reloj aproximadamente durante 10 minutos.

Pesar el ADN seco y disolverlo agitándolo en tampón salino diluido 1/10 con agua destilada (2 mg por ml) , almacenar congelado hasta cuando se necesite.

ÁCIDOS NUCLEICOS

SEPARACIÓN DE NUCLEÓTIDOS MEDIANTE ELECTROFORESIS UTILIZANDO EL MÉTODO DE MARKHAM Y SMITH

Objetivo

Este método se basa en el desplazamiento de sustancias eléctricamente cargadas cuando están sometidas a la acción de un campo eléctrico. Una sustancia con carga positiva (catión) se desplazará hacia el polo negativo (cátodo), mientras que una sustancia con carga negativa (anión) se desplazará hacia el polo positivo (ánodo).

Los nucleótidos, unidades componentes de los ácidos nucleicos, son sustancias fuertemente aniónicas que se desplazan bien en un campo eléctrico. Este desplazamiento se puede observar sobre un papel embebido de una solución tampón, el que se somete a la acción de un campo eléctrico, bajo la influencia del cual, los cuatro nucleótidos se separan según su carga eléctrica. La resolución es buena (o sea la separación es eficaz) cuando el tamaño de los nucleótidos no es excesivamente grande, ya que si es así se produce la adsorción de estos sobre el papel y quedan fijos en el lugar donde se han sembrado.

Los más cargados son los que más se desplazan en el campo eléctrico. Una vez terminada la separación, se pueden observar directamente cuando se iluminan con la luz proveniente de una lámpara de U.V.

Existen tres principios fundamentales para la extracción de los ácidos nucleicos, sobre los que se basa el protocolo de este práctico, y son los siguientes:

Disgregación del tejido y solubilización de las proteínas y los ácidos nucleicos.

Desnaturalización selectiva de las proteínas mediante un solvente orgánico o por acción de un agente tensoactivo, eliminación de las proteínas por centrifugación.

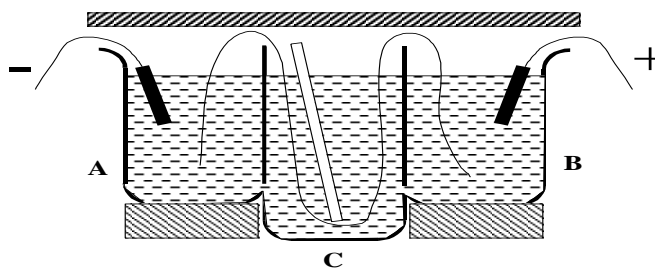
Aislamiento de los ácidos nucleicos a partir del sobrenadante de la centrifugación después de precipitarlos con alcohol, o con ácido.

Materiales

Aparato de electroforesis: consta de tres cubetas de vidrio, dos (A y B) de 15 x 10 x 5 cm, y una (C) de 20 x 12 x 6 cm.

Las cubetas A y B contienen el tampón utilizado y los electrodos. La cubeta C contiene el papel para la corrida, inmerso en tetracloruro de carbono, que sirve para enfriar el papel.

Fuente de corriente continua capaz de generar 1.000 V de ddp.
Lámpara a vapor de mercurio,



espectrofotómetro, centrífuga. Papel de filtro, ácido fórmico, formiato de amonio, tetracloruro de carbono, fenol, alcohol etílico absoluto, acetato de potasio, fosfato de potasio, cloruro sódico, ácido clorhídrico, éter etílico, levadura de panadería, hielo.

Procedimiento

Preparación del ARN

Tomar 100 g de células de levadura (peso húmedo) y agitar durante dos horas con 200 ml de agua destilada y 300 ml de solución de fenol acuosa al 90%.

Dejar reposar toda la noche a 4°C. A partir de aquí todo el procedimiento se llevará a cabo a 4°C.

Centrifugar a 4.000 rpm durante 5 minutos y recoger la fase superior (S₁). La fase fenólica inferior y la interfase se vuelven a centrifugar y se recoge la fase superior (S₂).

Se unen ambas fases con la cantidad necesaria de acetato de potasio al 20% (p/v) para que esta última resulte diluida al 2%. Añadir dos volúmenes de etanol al 95% y enfriar a -20°C, con lo cual el ARN precipita.

Este precipitado se separa por centrifugación, se lava varias veces con alcohol a -5°C, y se redisuelve en 40 ml de NaCl 1 mM.

Se centrifuga a 17000 g durante 30 minutos, se toma el sobrenadante y se le añade la cantidad necesaria de acetato de potasio al 20%, para que este último quede diluido al 2%, como anteriormente. Para precipitar el ARN de esta solución, añadir 2 volúmenes de etanol al 95% frío. El precipitado se separa por centrifugación, se lava varias veces con alcohol, y con éter etílico y se disuelve en 20 ml de agua destilada.

Hidrólisis ácida del ARN

Tomar los 20 ml del aparato anterior conteniendo el ARN en solución, y añadir 2.5 ml de una solución de HCl 9N, digerir a 100°C durante 60 minutos. Eliminar el ácido llevando la solución a sequedad. Redisolver en la mínima cantidad de agua posible. Guardar en heladera.

Corrida electroforética

Embeber el papel preparado para la corrida en la solución tampón de formiato de amonio, 0.1M, ajustada a pH 3.5 con ácido fórmico al 88%, eliminar el exceso de tampón mediante absorción con papel de filtro a desechar. Sembrar la mezcla a unos 12 cm del extremo negativo, sobre una línea imaginaria perpendicular al eje mayor del papel. Utilizar de 0.1 a 0.2 ml de solución.

Sumergir la banda de papel en el tetracloruro de carbono de la cubeta central, y mantenerla en su lugar mediante una lámina de vidrio. Sus extremos se sumergen en las cubetas A y B que contienen el tampón formiato pH 3.5, 0.1M, y los electrodos de carbón o de platino.

Aplicar un gradiente de potencial de 100 V/cm.

El tiempo de separación de los nucleótidos oscila entre 1 a 3 horas. El orden de migración hacia el ánodo es Uridina fosfato (el más rápido), Guanidina fosfato, Adenosina fosfato, y Citidina fosfato.

Las manchas pueden verse a la luz UV en una habitación oscura, como lugares opacos sobre un papel fluorescente.

Si se quiere efectuar un análisis cuantitativo, se pueden recortar las manchas, diluir los nucleótidos en agua, tampón ó HCl 0.05N, y medir su absorbencia, con un espectrofotómetro.

<u>Nucleótido</u>	<u>Longitud de onda (nm)</u>
Adenosina fosfato	259
Citidina fosfato	270
Guanidina fosfato	252
Uridina fosfato	262

Pueden servir, a su vez, de sustancias de partida para otra electroforesis o cromatografía.

ÁCIDOS NUCLEICOS

REACCIONES HISTOQUÍMICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y EL DOSAJE DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS EN TEJIDOS

Objetivo

Según el método descrito por Feulgen y Rosenbeck en 1924, los productos obtenidos de la hidrólisis del ADN colorean la fucsina reducida por el ácido sulfúrico (reactivo de Schiff).

Desde hace 70 años este método se utiliza para colorear núcleos celulares y cromosomas, y por lo tanto para caracterizar estos últimos.

Materiales

Reactivo de Feulgen: pesar 0.5 g de fucsina básica o para-rosanilina y disolver en 100 ml de agua a temperatura ambiente. Añadir 1 g de metabisulfito de sodio (o de potasio), y 10 ml de HCl concentrado. Dejar reposar agitando de vez en cuando, hasta que aparezca un color amarillo pálido (alrededor de tres horas); agregar 0.25 a 0.50 g de carbón activado, agitar, filtrar y conservar en una botella bien tapada que se mantiene en la heladera. El reactivo debe verse limpio como el agua; si permanece amarillento, agregar carbón activado y filtrar.

Líquido de lavado: 10 ml de HCl 1N, 10 ml de metabisulfito de potasio o de sodio al 5% y 180 ml de agua.

Colodión, alcohol absoluto, éter, cloroformo, n-butanol, solución tampón de acetato 0.1M, pH 4.1 a 4.2; verde de metilo (verde de etilo), pironina B, azul de toluidina.

Procedimiento

Feulgen

Hidrolizar los cortes con HCl 1N a 60°C. Si el tejido ha sido fijado con alcohol - ácido acético, hidrolizar durante 12 minutos; si ha sido fijado con formaldehído esperar 14 minutos.

A continuación tratar con el reactivo de Feulgen durante una hora; pasado ese tiempo, hacer tres lavados de diez minutos con el agua de lavado (si el corte es grueso dejar más tiempo), lavar con agua durante cinco minutos, secar y montar.

Si durante la hidrólisis los cortes tienden a desplazarse sobre el porta objetos, podemos mantenerlos en su lugar mediante una película de colodión. Para ello, lavar los cortes con alcohol absoluto, sumergir enseguida los cortes en una solución de colodión al 0.5% en una mezcla de alcohol absoluto - éter (1 : 1); dejar secar al aire durante 15 - 30

segundos y colocar a continuación los cortes en el agua de hidrólisis sobre el porta - objetos.

Colorantes básicos: verde de metilo - pironina B

Este procedimiento da resultados satisfactorios sobre todo en tejidos fijados con alcohol - ácido acético.

El verde de metilo (o de etilo) se disuelve en agua, o en una solución tampón de acetato 0.1M, pH 4.1 a 4.2. Las soluciones deben agitarse repetidamente con cloroformo hasta que en este no queden trazas de coloración debidas al violeta cristal que aparece como impureza.

Se efectúa la hidrólisis como anteriormente y se colorea durante 8 minutos con el verde de metilo. Se seca con papel de filtro y se diferencia mediante dos lavados sucesivos con n-butanol. Utilizar como colorante de contraste una solución de pironina B en acetona durante 30 a 90 segundos, clarificar con xileno y montar con bálsamo u otro medio plástico.

Algunos autores reemplazan la pironina por una solución de azul de toluidina.

ÁCIDOS NUCLEICOS

REACCIONES QUÍMICAS UTILIZADAS PARA EL DOSAJE DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: DOSAJE DE LOS AZÚCARES

Objetivo

Para el dosaje de los ARN se utiliza por lo común la reacción de las pentosas con el orcinol, y en el caso de los ADN, la reacción de las desoxipentosas con la difenilamina.

Materiales

Reactivo de Mejbaum: 100 mg de orcinol en 10 ml de HCl concentrado que contiene 0.1% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Reactivo de difenilamina: 1 g de difenilamina recristalizada dos veces a partir de alcohol, 2 ml de H_2SO_4 conc. y 98 ml de ácido acético glacial.

Ácido clorhídrico, etanol, cloroformo, éter, alcohol amílico, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Tubos de centrifuga, tamiz de 120 mallas, espectrofotómetro.

Procedimiento

Preparación del tejido

Se toma el tejido y se tritura con fracciones sucesivas de etanol y éter, que luego se seca. El material seco se pasa a un tubo de centrifuga de 50 ml, con tapa, y se agita durante periodos sucesivos de una hora, con 40 ml de HCL 0.1N cada vez. Este procedimiento nos lleva a la eliminación del fósforo soluble y de los nucleótidos simples.

El residuo se lava dos veces con etanol y luego se realizan dos extracciones sucesivas de dos horas cada una con una mezcla de etanol - cloroformo (3/1) a 65°C con refrigerante a reflujo.

A continuación el residuo se lava con éter, se seca, se pulveriza en un mortero mecánico hasta obtener un polvo fino que pase por un tamiz de 120 mallas por cm^2 . El fósforo total puede determinarse sobre este extracto.

Para dosar los azúcares se toman cantidades de polvo que correspondan a 100 - 200 μg de P ribonucleico en el caso de la ribosa y 100 - 300 μg de P desoxirribonucleico para la determinación de la desoxirribosa.

Dosaje de las pentosas

Se toman 20 mg de la muestra anterior, y se colocan en dos tubos graduados de centrifuga de 10 ml. A uno de los tubos se añaden 2 ml de agua y 2 ml del reactivo de

Mejbaum, y al otro tubo 2 ml de agua y 2 ml de HCl con 0.1% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pero sin orcinol.

Los dos tubos se colocan en un baño de agua hirviendo durante diez minutos exactamente, agitando de vez en cuando, y luego se enfrían. La sustancia coloreada azul - verde se extrae dos veces con 2.2 y 1.5 ml de alcohol amílico respectivamente. Las capas de alcohol amílico se separan por centrifugación, se reúnen, se mezclan con 1 ml de etanol y se llevan a un volumen total de 8 ml con alcohol amílico. El blanco se trata de la misma forma.

El color se lee en espectrofotómetro a 680 nm. Se construye una curva testigo con ARN de levadura tomando 2 ml de soluciones de concentraciones varadas (25 a 200 μg de P) y se procede como para el dosaje.

Dosaje de las desoxipentosas

Una cantidad conveniente de polvo (alrededor de 200 mg) se calienta con 8 ml de HCl 0.1N durante 20 minutos en un tubo de centrifuga graduado de 10 ml, agitándose en forma frecuente. Se enfría, se ajusta el volumen a 8 ml y se centrifuga.

Se toman 3 ml del sobrenadante y se lleva a un baño de agua hirviendo durante exactamente 6 minutos con 8 ml del reactivo de difenilamina.

Se prepara un blanco con 3 ml del sobrenadante y 8 ml de ácido acético. Cuando la solución este fría, se lee en espectrofotómetro a 595 nm.

La curva testigo se prepara a partir de ADN de la siguiente forma: se hidrolizan muestras de 4 ml con ácido clorhídrico para obtener una concentración final de 0.1N, y 3 ml de sobrenadante. Para desarrollar el color se utilizan 8 ml de reactivo.

ÁCIDOS NUCLEICOS

REACCIONES QUÍMICAS UTILIZADAS PARA EL DOSAJE DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: PRECIPITACIÓN DE ESTOS COMO SALES DE LANTANO

Objetivo

Los ácidos nucleicos se extraen de los tejidos pulverizados, según el protocolo del práctico anterior, con NaCl al 10% y se precipitan como sales de lantano. La solución de ácido nucleico obtenida a partir de este precipitado se utiliza para el dosaje de la ribosa y de la desoxirribosa de la manera que se ha descrito en el protocolo anterior.

Materiales

Triacetato de glicerina, NaCl, etanol absoluto, acetato de lantano, NaCO_3 0.5M, reactivo de Mejbaum, reactivo de difenilamina. Centrífuga. Tubos de centrífuga. Baño de agua.

Procedimiento

Partir de 400 mg de polvo de tejido obtenido según el procedimiento del práctico anterior, colocar en un tubo de centrífuga cónico de 15 ml y añadir 4 gotas de triacetato de glicerina. Proceder a la extracción de los ácidos nucleicos con NaCl al 10% según el siguiente esquema:

3 ml de NaCl	durante una noche a 0°C
2 ml de NaCl	durante 30 minutos a 100°C
2 ml de NaCl	durante 20 minutos a 100°C
2 ml de NaCl	durante 10 minutos a 100°C

Los extractos se reúnen y se llevan a 10 ml. De estos 10 ml se toman 0.5 ml para el dosaje de P total y 9 ml que se pipetea a un tubo de 25 ml. A este último tubo se agrega 1 ml de acetato de La al 0.2% y 10 ml de etanol. Se deja reposar una hora a 0°C, se centrifuga se lava el precipitado dos veces sucesivas con 3 ml de acetato de La al 0.2% .

El precipitado húmedo se descompone mediante la adición de dos porciones de 0.5 ml de NaCO_3 0.5M. El carbonato de lantano se elimina por centrifugación y el sobrenadante se lleva a 5 ml.

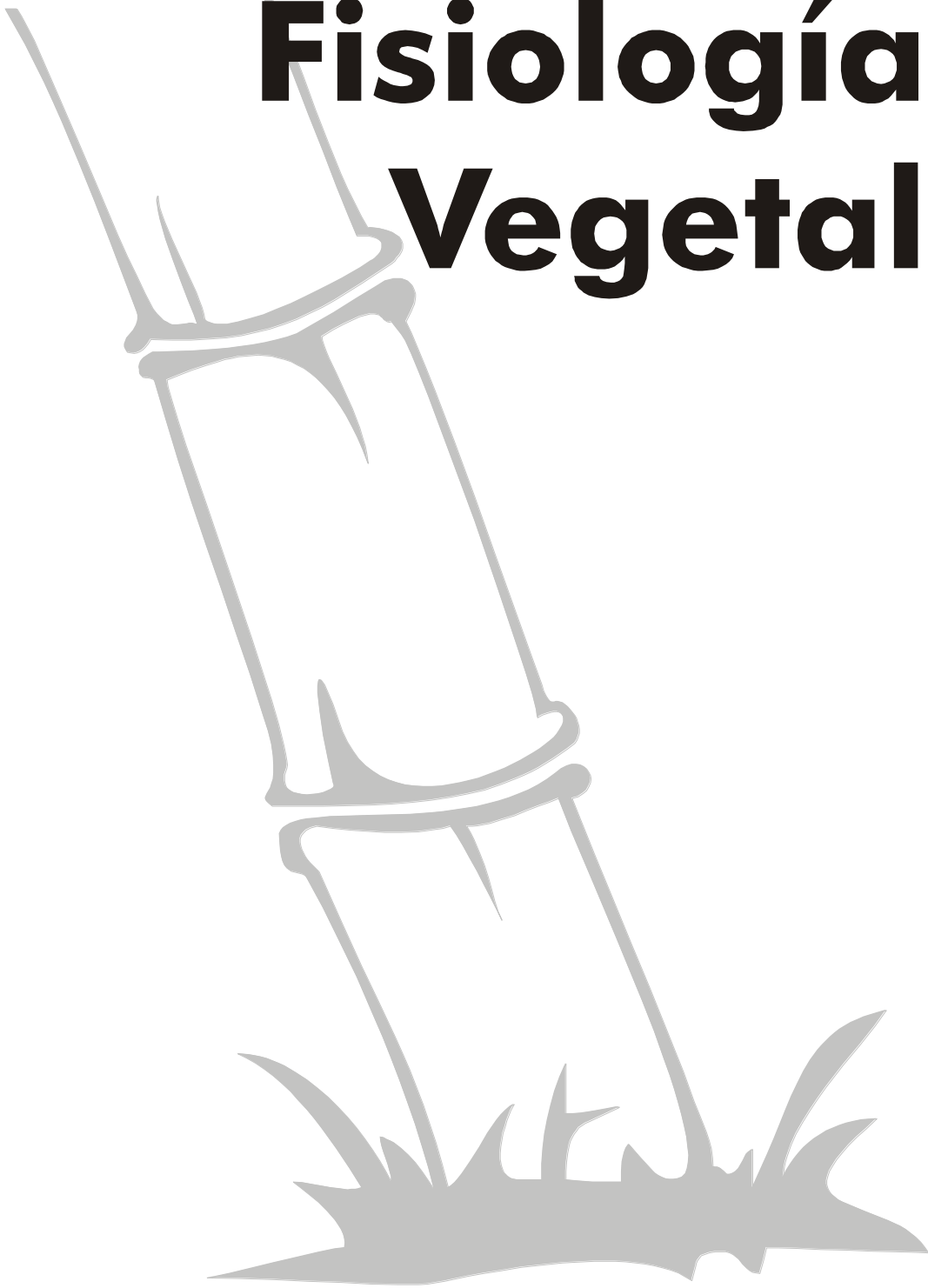
- a) Tomar 0.5 ml de éste para la determinación de P total.

b) Pipetear 0.2 a 0.3 ml en un tubo para el dosaje de ribosa, ajustar el volumen a 2 ml con agua y añadir 2 ml del reactivo de Mejbaum. Poner el tubo en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos y enfriar. Añadir a continuación 2 ml de etanol y 4 ml de agua y leer el color verde en el fotómetro a 680 nm. Comparar con una curva patrón expresada en P-ARN que se ha establecido partiendo de ARN de hígado, precipitando con lantano y tratado de igual modo que la sustancia desconocida.

c) Tomar 3 ml para el dosaje colorimétrico de la desoxirribosa por medio de la reacción de la difenilamina y medirlos en un tubo de centrífuga cónico graduado que contenga 1 ml de HCl 0.55N. Poner el tubo al baño de María hirviendo durante 20 minutos, enfriar y llevar a 4 ml. Añadir 8 ml del reactivo de difenilamina y colocar el tubo en el baño de agua hirviendo durante 6 minutos, enfriar rápidamente y medir la intensidad de la coloración azul obtenida en el fotómetro a 595 nm.

Comparar con una curva patrón expresada en P-ADN que se obtiene a partir de ADN de timo precipitado por lantano.

Fisiología Vegetal



AGUA

ÓSMOSIS, DIFUSIÓN Y PERMEABILIDAD DE MEMBRANA

DIFUSIÓN

Toda sustancia acaba por ocupar de modo uniforme el espacio disponible, sobre todo si este es homogéneo (ausencia de interfases). Apenas si hay un fenómeno más general en la naturaleza, puesto que depende de la actividad cinética de las moléculas, sobre la cual actúa de modo sensible la temperatura. Aunque la difusión es posible en distinto grado en los tres estados de la materia, es sobre todo intensa en los gases, en los que las fuerzas de cohesión están muy laxas. Es particularmente regular en los geles, en los que todo movimiento de partículas en masa, o de convección, está suprimido.

Se puede comprobar fácilmente que en un medio homogéneo perfecto (comprendidas la presión y la temperatura), la difusión se produce según el gradiente de concentración, es decir, hacia la región en que la concentración es menor (un gradiente se define como la variación continua de una propiedad o de una estructura según una recta).

La difusión es pues un fenómeno espontáneo, lo que significa que todo gradiente de concentración presente en un sistema se sitúa a un nivel de entropía inferior que aquel del mismo sistema supuesto homogéneo, dado que la nivelación molecular significa realmente el desorden *perfecto* en ese nivel. Sin embargo para explicar la difusión es más exacto hacer intervenir un gradiente de energía libre, de significación más general. En efecto, se sabe que existe una relación entre la energía libre y la concentración de una sustancia, en la forma siguiente:

$$\Delta G^{\circ} = RT \ln C + \text{constante}$$

Experiencia A: llenar un vaso de precipitados hasta la mitad con agua, dejarlo reposar hasta que el agua se aquiete y la temperatura se uniformice. Dejar caer un par de gotas de una solución de azul de metileno. Observar, discutir con los compañeros y reflexionar. Anotar las reflexiones.

Experiencia B: llenar un vaso de precipitado de 500 ml con agua hasta las dos terceras partes del vaso. Tomar una bolsita de polietileno y llenarla con un poco de solución de azul de metileno. Introducirla en el vaso, suspender la bolsita con una varilla de vidrio, y añadir agua al vaso hasta que los niveles del agua y de la solución de azul de metileno se igualen.

Perforar la bolsita con una aguja de tejer que se provee, lo más suavemente posible.

Observar y escribir las observaciones.

ÓSMOSIS

Los líquidos no escapan a la ley general de la difusión, aunque las fuerzas internas de cohesión sean en ellos mucho más fuertes. En particular el fenómeno de la ósmosis, por su naturaleza, pone en evidencia el poder de difusión del agua. En el osmómetro, una disolución acuosa se encuentra en contacto con agua pura, por intermedio de una membrana que posee permeabilidad selectiva. Esta membrana es, por definición, totalmente permeable al agua pero no a la sustancia disuelta.

Se puede considerar que el agua pura en estado libre alcanza su máximo poder de difusión o de energía libre. Ahora bien, se puede demostrar que la energía libre del agua decrece en presencia de cuerpos disueltos, más exactamente, de una cantidad proporcional al número de moles presentes en un volumen dado: $\Delta G^\circ = RTn$ (n = nro. de moles). El agua pura difunde, si puede, hacia la disolución. Esto es debido al hecho de que las moléculas disueltas no pueden abandonar el osmómetro, manteniendo de este modo un gradiente de energía libre para el agua.

Si el osmómetro tiene paredes rígidas, la disolución se eleva en el tubo de vidrio. Una vez alcanzado el equilibrio dinámico, penetra tanta agua como sale. La presión ejercida por la columna de agua al terminar de ascender mide, por definición, la presión osmótica de la disolución, y compensa automáticamente la disminución de energía libre del agua. Es oportuno indicar que la presión osmótica obtenida de este modo es, necesariamente, algo inferior que aquella de la disolución puesta al principio en el osmómetro, debido a la inevitable dilución.

Este sistema puede servir para demostrar el fenómeno de la ósmosis, pero no permite obtener una medida exacta para una dilución dada.

Del conocimiento de las leyes de la ósmosis se desprende que para el establecimiento de una presión osmótica importa solo la relación entre el número de partículas disueltas y el de moléculas de disolvente presentes, independientemente de su constitución química o de su magnitud relativa (comprendidos desde los iones a las partículas coloidales).

Procedimiento experimental

Llenar un vaso de precipitados limpio, de 1.000 ml de capacidad hasta la mitad con agua destilada. Tomar un tubo de vidrio abierto por ambos extremos y un trozo de membrana biológica provista para tal fin. Hacer una bolsa con la membrana y sujetarla con un hilo a uno de los extremos del tubo, de forma tal que el líquido que va a contener no pueda escapar.

Por el extremo abierto llenar la bolsa y el tubo con solución de sacarosa 1 M, hasta una altura de 2 a 3 cm por encima de la atadura.

Introducir el tubo en el vaso de precipitados y fijarlo con un soporte de forma tal que ambos líquidos queden enrasados. Si no, tratar de agregar agua al vaso hasta lograr un enrase perfecto.

Observar el proceso y explicarlo.

PERMEABILIDAD DE LAS MEMBRANAS

La existencia del fenómeno de ósmosis en Fisiología no significa, sin embargo, que las sales minerales y la mayor parte de las sustancias disueltas no puedan penetrar en la célula.

Al margen de cualquier otra consideración, la nutrición mineral de las plantas requiere de una cierta permeabilidad celular, pero la permeabilidad selectiva es privativa solamente de las células vivas.

Experiencia

Preparar 4 baños de agua a 30, 40, 50 y 60°C además de dos tubos de ensayo con 15 ml de etanol al 96% cada uno.

Llenar además algunos tubos de ensayo con 15 ml de agua, y numerar todos los tubos.

Tomar una raíz de remolacha azucarera, pelar y sacar con sacabocados siete trozos; el primero de ellos se tendrá en el baño de María a 30°C durante un minuto y después se ubicará en el tubo rotulado n° 1, se hará lo mismo con los otros, a las diferentes temperaturas. En el etanol, se dejará un trozo durante un minuto, y el otro durante 5 minutos. Después se pasarán a los tubos numerados. El último pedazo, sin tratamiento, se colocará en el tubo n° 7. Al cabo de una hora, observar todos los tubos comparándolos entre sí y con el testigo. Anotar las observaciones.

TRANSPIRACIÓN

DETERMINACIÓN DE LA TRANSPIRACIÓN

Objetivo

La transpiración es la pérdida de agua que experimentan las plantas debido a la evaporación. El agua que se evapora en las plantas, no lo hace a partir de una superficie libre, como la superficie de un lago, sino que debe pasar a través de la epidermis con su cutícula o a través de los estomas. Este proceso está muy influenciado por el medio ambiente.

La transpiración se ve influenciada por el medio ambiente, sobre todo a través de dos fenómenos: el primero es la evaporación propiamente dicha, y el otro es la apertura y cierre estomáticos. Por ejemplo, el aumentar la temperatura de las hojas, promueve la evaporación pero puede causar el cierre de los estomas. La luz causa la apertura estomática, pero también aumenta la temperatura. Si la humedad es alta, la transpiración disminuye, pero la humedad relativa depende de la temperatura, y esta a su vez es influenciada por la luz. El viento se lleva el vapor de agua que se acumula alrededor de la hoja cuando esta transpira; por lo tanto disminuye la humedad relativa cerca de la hoja, lo que causa un incremento en la transpiración, pero también enfría las hojas, calentadas por la luz solar, disminuyendo la transpiración.

Así, aún siendo un proceso relativamente sencillo, la transpiración se ve influenciada por tantos factores que a su vez interrelacionan entre sí, que en la práctica se torna un fenómeno muy complejo para su estudio.

Datos de la transpiración de algunas especies en distintos entornos *			
Planta	Temperatura (°C)	H. R. (%)	Pérdida de agua (g/dm²/h)
<i>Nicotiana tabacum</i>	37 - 38	68	3,6
<i>Nicotiana tabacum</i>	23 - 26	68	1,5
<i>Helianthus annuus</i>	38	22	1,2
<i>Quercus rubra</i>	38	32	0,8
<i>Platanus occidentalis</i>	38	32	0,8
<i>Aesculus glabra</i>	38	32	0,7
<i>Prunus persica</i>	21 - 38	40 - 98	0,7
<i>Acer negundo</i>	38	32	0,6
<i>Citrus sinensis</i>	21 - 38	40 - 98	0,2
<i>Teucrium scorodonia</i>	26 - 30	38 - 46	0,7

* Según Salisbury y Ross. Plant Physiology, Wadsworth Ed. 1969.

Se han sugerido muchos métodos para la medida de la transpiración, pero el mayor problema es medir el proceso sin influenciarlo, y todos los métodos lo hacen en mayor o menor grado. Los potómetros han sido utilizados en múltiples ocasiones para medir la transpiración en el laboratorio; el problema es que la planta debe ser cortada, o sus raíces sumergidas en agua, ambos casos no teniendo ningún parecido con la situación "normal" de la planta. El método de la pesada rápida es un buen método siempre que se tomen solamente los datos de los primeros momentos, aunque no se está seguro si el separar la hoja de la planta tiene influencia sobre la velocidad de transpiración en un primer momento. Es un método muy usado especialmente para el estudio de la transpiración a campo.

Materiales

Potómetro, balanza analítica de visualización directa de peso, material vegetal, agua, algodón, parafina o cera de abejas.

Procedimiento

Determinación de la transpiración por el método del POTÓMETRO

Armar el Potómetro con el material vegetal recogido según instrucciones del instructor, teniendo la precaución de cortar la rama bajo el agua con el propósito de no interrumpir la columna de agua del tallo. Al transferir la rama recién cortada del vaso de precipitados al potómetro, se debe tratar que quede una gota de agua retenida en el lugar del corte.

Puesta la rama en el potómetro, proceder a sellar el tubo con algodón y parafina, a fin de evitar pérdidas de agua por evaporación, y verificar la ausencia de burbujas de aire atrapadas entre el agua que llena los conductos del potómetro.

Las mediciones se efectuarán bajo las siguientes condiciones ambientales:

- 1.- ambiente normal de laboratorio;
- 2.- elevando la temperatura del medio ambiente próximo a la planta mediante una lámpara incandescente;
- 3.- haciendo circular una corriente de aire moderada con la ayuda de un ventilador;
- 4.- aplicando calor y corriente de aire a la vez.

La medición del agua transpirada por el vegetal se realiza mediante la lectura del nivel de agua en el capilar del aparato. Se deben tomar las medidas al inicio del experimento y cada diez minutos, por espacio de una hora. Estos tiempos e intervalos podrán modificarse en caso que las condiciones del día del experimento, y el material vegetal elegido, así lo requieran.

El experimento finalizará cuando el estudiante lo haya consignado por escrito, añadiendo un esquema del potómetro y un gráfico de volumen de agua transpirada *versus* tiempo empleado.

Determinación de la transpiración mediante la PESADA RÁPIDA

Tomar una rama con hojas, cortarla e inmediatamente sumergir el extremo cortado en un vaso ya preparado. Llevarla dentro del vaso hasta el costado de una balanza analítica para pesar mg y décimas de mg. Cortar la hoja y colocarla rápidamente en el platillo de la balanza, determinando su peso inmediatamente.

Medir el peso de la hoja cada 30 segundos durante tres minutos.

Graficar la relación peso *versus* tiempo.

POTENCIAL AGUA

DETERMINACIÓN DE POTENCIAL AGUA

Objetivo

La propiedad más interesante en el sistema suelo-planta-aire que podemos medir, es seguramente el potencial agua. Es la propiedad que determina el movimiento pasivo del agua, que a su vez origina gradientes de presión, que resultan en movimientos de grandes masas del elemento agua.

Además, dentro de un sistema osmótico es el componente más fácil de medir.

Estudiaremos dos formas de medir el potencial agua de un tejido.

Cambios en volumen: las muestras de tejido en cuestión se sitúan en el seno de una serie de soluciones de distinta concentración. El objeto es encontrar la solución para la cual el volumen del tejido no cambia, lo que indica que no ha habido ganancia ni pérdida de agua; tal situación implicaría que el tejido y la solución están en equilibrio, y por lo tanto el potencial agua del tejido debe ser igual al de la solución.

En la práctica el problema es la determinación del cambio de volumen; por ello, aunque introduciendo cierto error, en vez de un cambio de volumen mediremos un cambio de peso.

Cambios en la concentración de una solución: en lugar de medir una característica del tejido podemos medir la solución en que está sumergido.

Si dicha solución se diluye con respecto a un control, entonces el tejido habrá perdido agua, y por el contrario, si se concentra habrá absorbido. En 1953, el científico ruso V. S. Chardakov puso a punto un método simple y eficiente para medir el potencial agua de un tejido. Este método puede muy bien utilizarse en el campo.

Materiales

Balanza analítica, sacabocados, placas de petri, navajas de afeitar, gradilla con 20 tubos de ensayo, agua bidestilada, sacarosa, cristales de azul de metileno.

Procedimiento

Cambio de peso de un tejido

Preparar cinco placas de Petri, con solución de sacarosa 0.10 M, 0.15 M, 0.20 M, 0.25 M y 0.30 M en cada una, las mismas que se preparan para la experiencia B, referirse a esa experiencia más abajo en esta misma guía para corroborar la forma de preparación.

Tomar una papa limpia, sana, lavar su superficie y secar.

Con un sacabocados, sacar una porción de tejido, cortar una longitud prefijada, pesar rápidamente e introducir en una de las placas de Petri. Poner cinco trozos de tejido por placa y dejar una hora, para permitir que se establezca el equilibrio.

Sacar de la placa Petri las muestras de tejido una por una, rápidamente medir la longitud, secar con suavidad eliminando el agua adherida y pesar.

Graficar la concentración en moles (o el potencial osmótico en bares) contra el incremento de peso con respecto al original expresado en porcentaje.

Cambios en la concentración de la solución patrón. Método de Chardakov

Preparar 1 litro de solución de glucosa 0.30 M, pesando 54 g de glucosa y diluyendo a 1000 ml con agua. (Peso molecular de la glucosa 180 D).

Tomar doce tubos de ensayo y numerarlos del 1 al 6 y del 11 al 16.

Preparar las diluciones según se consigna en la Tabla siguiente:

	Tubos					
	1 y 11	2 y 12	3 y 13	4 y 14	5 y 15	6 y 16
Solución 0.30 M (ml)	16.6	33.3	50.0	66.6	83.3	100.0
Aforar a... (ml)	100	100	100	100	100	100
Molaridad	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
Presión osmótica ψ_{π} (MPa)	0.122	0.243	0.365	0.486	0.609	0.730

En los tubos 11, 12, 13, 14 15 y 16 añadir unos pequeños cristales de azul de metileno; esto no cambiará la concentración molar de la solución. Colocarlos junto a sus pares de igual concentración molar en la gradilla.

Buscar hojas de las que se desee averiguar el potencial agua del tejido, lavarlas y secarlas con suavidad. Cortar discos de dichas hojas, tratando de no hacer intervenir en el corte los haces principales.

En cada uno de los tubos de la primera serie (los que no contienen colorante) introducir 20 discos de hojas, cortados de las mismas con un sacabocados.

Dejar los discos sumergidos durante una hora, agitando con suavidad el tubo, de tiempo en tiempo.

Transcurrido el tiempo indicado, se saca el tejido del interior del tubo, y con una pipeta de 1 ml o menor se toma una gota de la solución con azul de metileno.

Se introduce la pipeta en el tubo donde ha estado el tejido y se deja salir una gota coloreada. Se observa el comportamiento de la gota.

a.- La gota flota: indica que la solución no coloreada es ahora más densa que su análoga coloreada, ha pasado agua desde la solución al tejido, por lo tanto el potencial agua

del tejido era inferior (más bajo) que el de la solución, ya que el agua siempre viaja a favor de un gradiente de potencial agua, de mayor a menor potencial agua.

b.- La gota se hunde: la solución no coloreada es ahora menos densa que su análoga coloreada, ha pasado agua desde el tejido a la solución, el potencial agua del tejido era mayor que el potencial agua de la solución.

c.- La gota se difunde en el lugar, sin subir o bajar: por tanto no hay cambio en la concentración, el potencial agua de la solución iguala al potencial agua del tejido.

Escribir la experiencia y consignar el potencial agua calculado en ambos tejidos. Hacer un dibujo explicativo del experimento de Chardakov.

ESPACIO LIBRE

MEDIDA Y CÁLCULO DEL ESPACIO LIBRE APARENTE (ELA)

Objetivo

El espacio libre aparente (ELA) es aquella porción de volumen de un tejido dado que puede alcanzar un equilibrio de difusión de sustancias con el medio externo a él.

La difusión de solutos y agua en ese espacio se efectúa libremente, como se ha comprobado con la observación microscópica de la penetración pasiva de soluciones coloreadas en dicho espacio. De la misma forma, se ha llegado a saber que el ELA consta de los espacios intercelulares y de las paredes celulares, y que constituye del 7 al 10 % del tejido total del vegetal.

Cuando se sumerge un tejido en una solución, se asume, por definición de espacio libre aparente, que en una porción de ese tejido va a ocurrir una difusión libre de solutos entre este y la solución, y en un momento dado se va a alcanzar el equilibrio. En el equilibrio, la concentración de solutos dentro del ELA iguala a la concentración de solutos en la solución externa.

$$\text{Concentración solutos en ELA} = \frac{\text{Cantidad de solutos en ELA}}{\text{Volumen de ELA}}$$

$$\text{VOLUMEN ELA} = \frac{\text{Cantidad de solutos en ELA}}{\text{Concentración solutos en ELA}}$$

Materiales

Vaso de precipitado, bureta, pipetas, erlenmeyer, reloj, papas, solución de $\text{SO}_4^{=}$ 0.2014 M, solución estándar de NaOH 0.20 M.

Procedimiento

Preparar una solución de H_2SO_4 de aproximadamente 0.202 M y titular con solución estándar de NaOH 0.20 M, y añadir el agua necesaria para llevarla a una concentración 0.2014 M.

Poner 100 ml de dicha solución en un vaso de precipitados.

Tomar una papa, lavarla, pelarla y extraer 10 cm^3 de tejido con un sacabocados, o un volumen aproximado. Medir bien el volumen extraído, mediante la introducción del tejido

en una probeta graduada, llena con agua destilada; esta operación se debe ejecutar lo más rápidamente posible.

Tomar el tejido, secarlo suavemente con un papel de filtro, e introducirlo en la solución de H₂SO₄ de concentración conocida. Dejarlo durante media hora. Pasado ese lapso, tomar una alícuota de 25 ml de la solución de H₂SO₄ y titularla con la misma solución estándar de NaOH empleada anteriormente.

Cálculos: asumamos que la concentración de la solución de H₂SO₄ al principio del experimento era de 0.2014 M, que la concentración final después de haber permitido la difusión en el tejido era de 0.2000 M, y que el volumen del tejido era exactamente 10 cm³.

Asumamos que la concentración de SO₄⁼ en el espacio libre aparente está en equilibrio de difusión con la solución externa, y por lo tanto a la misma concentración (0.2000 M).

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Cantidadde moles}}{\text{Volumen}}, \quad \text{o bien } C = \frac{M}{V}$$

Por lo tanto:

$$V = \frac{M}{C} = \frac{0.00014 \text{ mol}}{0.2 \text{ mol/litro}} = 0.0007 \text{ litro}$$

Así pues, de los 10 cm³ totales, 0.7 cm³ están ocupados por una solución de SO₄⁼ que es 0.2000 M, y expresando este volumen como porcentaje sobre el volumen total:

$$\text{ELA} = \frac{0.7 \times 100}{10} = 7.0\%$$

Según Salisbury and Ross. Plant Physiology. 1970.

Escribir un informe detallado y cuidadoso de la experiencia, y calcular el espacio libre aparente en las condiciones del experimento.

ANÁLISIS FOLIAR

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VEGETALES

MUESTREO

Objetivo del muestreo

Supongamos que queremos saber, ante la necesidad de fertilizar un campo, cuándo debemos hacerlo y con qué debemos fertilizar o, lo que es lo mismo, qué elementos están faltando dentro del cuerpo del vegetal, y cuándo debemos aplicarlos para obtener mejores rendimientos. Para ello necesitaremos analizar la composición química de los tejidos (en general hojas), de las plantas en nuestro campo.

Es obvio que no podemos analizar todas las plantas y que tendremos que tomar una muestra de nuestra población. Es imprescindible asegurarnos que la muestra sea representativa, que represente fehacientemente, en todos sus aspectos, la población de la que surge. Para ello deberemos tomar ciertas precauciones.

Los que trabajan con estadísticas, que siempre manejan muestras de poblaciones, tienen los conocimientos que brinda la práctica. Se aconseja que si aparece alguna duda en cuanto a muestreos, se pida la opinión calificada de un estadístico. Aquí se van a indicar algunas pautas generales que utilizaremos para tomar nuestras muestras.

Procedimiento

1.- Procurar que la población a muestrear sea homogénea, desdoblar la muestra si es necesario.

2.- Muestrear la mayor cantidad de individuos posibles, para minimizar el efecto de la variabilidad en la población.

3.- Definir un criterio en cuanto a la altura que se muestreará, lo cual significa definir muestrear todas las alturas de la planta, desde el ápice a la base, o bien tomar todas las muestras a una altura definida, a 1.5 m del suelo, por ejemplo.

4.- Tomar muestras de los cuatro lados de la planta.

5.- No muestrear plantas atípicas (muy desarrolladas, poco desarrolladas, enfermas, de distinta edad, etc.) a no ser que sea objeto del análisis el estudiar dichas plantas.

6.- Deben tomarse muestras de plantas ubicadas en toda el área a muestrear, por más homogénea que aparente ser la misma.

7.- El muestreo puede organizarse en forma sistemática (por ejemplo una planta de cada dos, de cada cinco, tomando distintas hileras, etc.) Pero lo más acertado es que el investigador recurra al muestreo según reglas estadísticas, para asegurar la representatividad de la muestra.

MATERIA SECA Y CENIZAS

Una vez obtenida la muestra, se lleva rápidamente al laboratorio tomando precauciones para que no se deshidrate. En el laboratorio se desparrama sobre una superficie amplia y limpia, se mezcla bien, se divide la muestra por la mitad y se descarta una de las mitades. Se puede volver a repetir el procedimiento si todavía la muestra es muy grande.

Con el tamaño adecuado, la muestra se lava y enjuaga bien, y se desparrama de nuevo en un lugar libre de polvo y humo, para que se seque al aire. O bien se coloca en estufa donde se seca a 50°C.

Después de alcanzar el peso constante de la muestra, moler esta si es posible con molino de ágata, o triturar a mano, guardar en recipiente hermético como materia prima para los análisis.

La materia seca constituye toda la materia que compone el tejido, con excepción del agua y algún compuesto volátil que puede desaparecer con el secado. Para calcular la materia seca (o el porcentaje de agua), una vez que se lava la muestra se toma una pequeña fracción de ella y se seca al aire. Cuando no quedan restos del agua del lavado, se toma la muestra y se pesa. Se anota el peso y se pone la muestra en estufa a 50°C hasta alcanzar peso constante.

La diferencia entre el peso fresco y el peso seco nos da el porcentaje de humedad del tejido.

Llamamos cenizas a los componentes minerales inorgánicos, exceptuando el C, H, O y N, que forman parte de las moléculas orgánicas y que se liberan al destruirse estas últimas.

Para el análisis de las mismas, se toma una cápsula de porcelana, se tara, y se pesan en ella 2 g de la muestra triturada. Se coloca en la mufla y se calcina a 600°C. Si al sacar de la mufla se observan puntos carbonosos, se humedece la ceniza con agua destilada y se vuelve a colocar en la mufla. Al cabo de tres o cuatro tratamientos la ceniza queda totalmente homogénea.

Se enfría en desecador, se pesa, se descuenta la tara y se obtiene el peso de la ceniza que puede expresarse en porcentaje sobre el peso total de la muestra.

ANÁLISIS FOLIAR

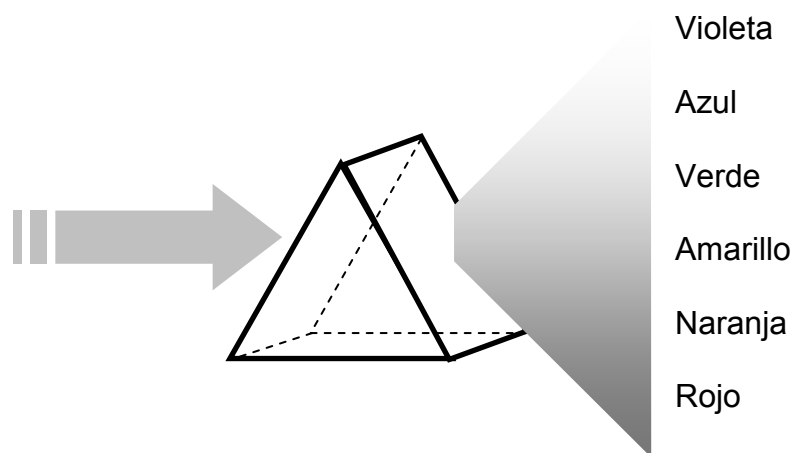
ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VEGETALES SODIO Y POTASIO POR FOTOMETRÍA DE LLAMA

Objetivo

La fotometría de llama es una herramienta esencial para la determinación de sodio y potasio, para los que los métodos químicos son largos y tediosos. La técnica se basa en producir un espectro de emisión de sodio o de potasio y poder detectarlo con un analizador.

Un espectro puede definirse como el análisis de las distintas longitudes de onda emitidas por un foco luminoso.

Todos sabemos que cuando un cuerpo se quema emite energía en forma de calor y luz. El espectro continuo es el que se obtiene cuando la luz de un cuerpo incandescente (sol, lámpara de filamento metálico) se hace pasar a través de un prisma.



Los espectros de emisión discontinuos (bandas o rayas) son producidos por gases o vapores a elevada temperatura, las rayas corresponden a emisiones procedentes de los átomos, mientras que las bandas se deben a las moléculas, y en realidad constituyen una serie de rayas muy próximas, en las que puede resolverse la banda si la dispersión es suficiente. En ambos casos, rayas o bandas, la emisión se debe a la liberación del exceso de energía, de átomos o moléculas excitados, en forma de radiación luminosa, cuya frecuencia es característica del átomo o molécula que las emite, y por lo tanto nos sirve para su identificación.

En nuestro práctico, procederemos a quemar las cenizas obtenidas a partir de un tejido, en una llama de gas, y el analizador del fotómetro nos informará sobre la existencia

o no de la banda correspondiente al sodio, o potasio, y de su intensidad, que se correlacionará con la cantidad de sodio o potasio presente en la muestra.

Materiales

Fotómetro de llama, mufla, cápsula de porcelana, vaso de precipitado, soluciones estándar de sodio y potasio.

Procedimiento

Calibración del aparato

Cuando la escala del aparato no tiene unidades específicas de concentración, se preparan una serie de patrones de concentración conocida a partir de soluciones estándar, y con ellas se calibra el aparato.

Estándar de SODIO, 1.000 ppm: pesar 2.5419 g de cloruro de sodio que ha estado en estufa a 110°C durante varias horas. Disolver y diluir a 1 litro.

Estándar de POTASIO, 1.000 ppm: pesar 1.9069 g de cloruro de potasio seco. Disolver y diluir a 1 litro.

En el caso de fotómetros cuya escala se encuentre en meq/litro, un ejemplo de soluciones a preparar son:

POTASIO: pesar 0.381 g de cloruro de potasio seco. Disolver y diluir a 1 litro (5.1 meq/litro o 200 ppm).

SODIO: pesar 8.286 g de cloruro de sodio, secado en estufa como anteriormente se ha indicado. Disolver y diluir a 1 litro (142 meq/litro o 3258 ppm).

Preparación de la muestra

Tomar 1 g de la muestra vegetal en forma de polvo seco, y convertirla en cenizas manteniéndola durante varias horas en la mufla a 550°C.

Disolver la ceniza en 5 ml de CIH 6N, y secarla bajo campana para deshidratar la sílice.

Disolver en 2 ml de CIH 6N, filtrar a un aforado de 100 ml, lavar el residuo con agua destilada, recoger el agua de lavado en el aforado, y diluir a volumen.

Utilizar esta dilución para la determinación de sodio y potasio.

Puesta en marcha del equipo, calibración y medición

Encender el equipo.

Conectar el compresor y regular la presión a 1 kg/ cm², o según las instrucciones del Jefe de Trabajos Prácticos.

Abrir la llave de gas. Encender el mechero del aparato y con la perilla de Control de gas, regular la llama hasta obtener pequeños conos azules bien definidos. Esperar por lo menos cinco minutos.

Conectar el desagüe.

Colocar el filtro de potasio (sodio).

Nebulizar agua destilada, y llevar a cero con las perillas de cero, de Ajuste Grueso y de Ajuste Fino.

Nebulizar la solución patrón y con las perillas de Sensibilidad Gruesa y Fina llevar la aguja a los meq. que corresponda (5.1 meq/litro ó 142 meq/litro).

Verificar con agua destilada la posición del cero, y si es necesario repetir las operaciones de calibración hasta que los valores se mantengan.

Nebulizar la muestra y anotar la lectura.

Volver a nebulizar agua destilada para eliminar restos de elementos que pudieran quedar.

Para el caso que se quiera determinar sodio y potasio en suelos, el procedimiento es como sigue

Acetato de amonio 1N: diluir 120 ml de ácido acético glacial y 250 ml de solución concentrada de amoniaco (25%, densidad: 0.91), a 1 litro con agua destilada. Determinar el pH de esta solución. Si el pH tiene un valor superior a 7.1 o inferior a 6.9, corregirlo adicionando ácido acético o amoniaco según corresponda.

Tomar 5 g de suelo, secado en estufa, colocarlos en un vaso de precipitado de 250 ml. Agregar 100 ml de la solución de acetato de amonio, y agitar por espacio de 30 minutos. Dejar decantar unos minutos y filtrar.

Esta solución se utilizará para la determinación de sodio y potasio.

En caso de que la lectura caiga fuera de la escala del aparato, se deberá proceder a diluir el filtrado y volver a leer.

NUTRICIÓN MINERAL

DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL

Objetivo

Podemos definir el metabolismo mineral como el proceso mediante el cual los elementos nutritivos minerales se incorporan a los fotosintatos, o bien actúan como cofactores o agentes catalíticos en distintos procesos metabólicos.

El nitrógeno es considerado como el cuarto elemento más abundante en los vegetales, después del carbono, hidrógeno y oxígeno. Como componente de proteínas, coenzimas, nucleótidos y clorofilas, está implicado en todos los procesos de crecimiento y desarrollo del vegetal. La determinación del nitrógeno proteico contenido en un vegetal no da una indicación de la cantidad de aminoácidos que este puede incorporar a la dieta y por lo tanto el valor nutritivo (y monetario) del vegetal.

Este dato es muy importante en ciertos casos, por ejemplo en los forrajes para los animales, y sobre todo los de invernada. En cualquier caso, la determinación del nitrógeno foliar nos dará una indicación del estado de la planta, y de la necesidad de fertilizar con el elemento.

En este práctico vamos a ensayar la determinación de nitrógeno de dos formas distintas, mediante el procedimiento puesto a punto por Kjeldhal, y el desarrollado por Nessler.

Materiales

Aparato semi-automático de microkjeldahl, resistencia eléctrica, campana de gases, colorímetro, mezcla catalítica, sal de tartrato sódico-potásico, Reactivo de Nessler, hidróxido de sodio, sulfato de amonio, ácido sulfúrico, rojo de metilo.

Mezcla catalítica: pulverizar en mortero 10 g de cristales de sulfato de cobre penta hidratado, aparte se pulverizan 1,0 g de cristales de sulfato de potasio y se mezcla con el anterior. Se agregan 8 g de selenio pulverizado, se coloca la mezcla en un frasco y se agita durante dos horas continuas hasta completar la homogeneización.

Solución de tartrato sódico-potásico: se disuelven 50 g de la sal en 100 ml de agua caliente.

Reactivo de Nessler: se disuelve con ayuda de mechero, pero sin llegar a ebullición, 10 g de I₂Hg (Yoduro de mercurio) en 50 ml de agua y se añaden 5 g de IK disuelto en 10 ml de agua. Se deja reposar durante varios días (como mínimo cinco) y se decanta o filtra.

Procedimiento

Método de Nessler (para agua y suelos)

El método de Nessler está basado en la medida de la densidad óptica del color producido por la reacción de los iones amonio con el reactivo "yoduro de mercurio y potasio". El método es lo suficientemente sensible para determinar las pequeñas cantidades (en general menos de 1 ppm) de amonio presente en extractos de aguas y suelo.

Digestión: pesar 1 g de suelo y situar en frasco de Kjeldahl de 100 ml de capacidad. Se añade 1 g de mezcla catalítica y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se hace hervir sobre resistencia eléctrica, bajo campana, hasta que el líquido de ebullición aparezca transparente. A partir de ese momento se deja hervir durante media hora más. Se retira el Kjeldahl del calor, se deja enfriar, y se diluye con agua hasta 50 ml. Se filtra con papel de filtración rápida.

Determinación: 2 ml de la solución filtrada se ubican en un matraz de 50 ml, y se agregan 5 ml de NaOH 1N, y 0.5 ml de la solución de tartrato sódico, potásico. Se añade un poco de agua y se mezcla bien.

Se añade 1 ml del reactivo de Nessler, se afora a 50 ml, se agita y pasados los 15 minutos se hace la lectura de la absorbancia en fotocolorímetro a una longitud de onda de 420 nm.

Se fija el cero del aparato con el blanco del reactivo.

Factor de multiplicación:

$$\frac{\text{volumen final}}{\text{solución filtrado}} \times \frac{\text{volumen extracción}}{\text{peso de la muestra}}$$

Preparación de la solución patrón

Disolver 0.4717 g de sulfato amónico en agua. Aforar a 1000 ml. Tomar 10 ml de esta solución y llevar a 100 ml: 1 ml de esta solución contiene 0.01 mg de nitrógeno.

Preparar la curva estándar tomando sucesivamente 2 ml, 3 ml...10 ml de esta solución, proceder como se indica en el apartado "determinación". Leer la Ab. a la misma longitud de onda y graficar Ab. contra concentración de nitrógeno.

Método de Kjeldahl (para material vegetal)

El nitrógeno orgánico se convierte en sulfato de amonio haciendo reaccionar el amonio con un exceso de ácido sulfúrico. Por titulación de retroceso se determina la cantidad de ácido sulfúrico que no reacciona.

Método: pesar 1 g de muestra vegetal, que pase por un tamiz de 20 mallas, y colocarlo en un balón de Kjeldahl de 100 ml de capacidad. Agregar 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, y aproximadamente 2 g de la mezcla catalítica.

Agitar cuidadosamente con movimientos circulares, y una vez que todas las partes han entrado en contacto íntimo, colocar sobre resistencia eléctrica en la campana de gases. Calentar inicialmente con suavidad, para evitar la formación de espuma. A partir de que el líquido sobrenadante se vea límpido, digerir durante una hora más.

Terminada la digestión, enfriar el balón, añadir 100 ml de agua y unas gotas de rojo de metilo, y taponarlo con un tapón que presente dos orificios. Por uno de ellos se conecta el tubo que conducirá los gases al refrigerante, y por el otro se pasa el extremo de una ampolla de decantación.

En un vaso de precipitados se colocan exactamente 50 ml de ácido sulfúrico estandarizado 0.1N. Se agregan unas gotas de rojo de metilo como indicador. En esta solución se sumergirá en extremo libre del condensador / refrigerante.

Asegurarse de que todas las uniones estén herméticamente selladas, y cargar la ampolla con NaOH 11N. Abrir la llave de la ampolla y dejar caer el hidróxido gota a gota dentro del balón hasta que el indicador vire, agregar un exceso para asegurar la alcalinidad del medio.

Calentar el balón y hacer destilar la mezcla de forma suave siempre con el extremo del refrigerante sumergido en la solución de ácido. Una vez obtenidos 200 ml del destilado, detener la destilación.

Determinar el exceso de ácido sulfúrico remanente en el vaso de precipitado, por titulación con NaOH.

Determinar por diferencia la cantidad de amonio fijado y la de nitrógeno. Multiplicando la cantidad de nitrógeno por el factor 6.25 obtenemos el contenido total, y refiriéndonos al peso del tejido originalmente tomado, el porcentual de nitrógeno en la muestra.

ANÁLISIS FOLIAR

DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS ESTRUCTURALES (FIBRA)

Objetivo

Los polisacáridos estructurales constituyen la llamada fibra de los alimentos. Son constituyentes de la pared celular de los vegetales (celulosa, hemicelulosas y pectinas), y no son digeridos por los humanos, con lo que su aporte en calorías a la dieta es prácticamente nulo. Aunque tienen importancia en la regulación del tracto intestinal, y aparentemente en la presencia de colesterol en sangre, se clasifican como un alimento de segunda categoría, con poca capacidad nutritiva.

La determinación de la cantidad de fibra que contiene un alimento vegetal nos permite seleccionar, y hasta mejorar un tipo de cultivo. Así, un pasto que contenga mucha fibra y poco nitrógeno será a descartar frente a otro con poca fibra y más nitrógeno.

Materiales

Estufa, papel de filtro, vaso de precipitados, ácido sulfúrico al 5%, hidróxido de sodio al 5%.

Procedimiento

Tomar un vaso de precipitados de 250 ml y colocar en el 1 g de muestra triturada, que pase por un tamiz de 250 micrones.

Agregar 75 ml de ácido sulfúrico al 5% y completar a la marca de 100 ml con agua. Llevar a plato caliente y bajo campana hacer hervir exactamente 10 minutos.

Retirar y añadir agua hasta la marca de 200 ml. Dejar sedimentar y extraer el líquido ácido sobrenadante con pipeta, cuidando de no absorber el precipitado.

Agregar agua, agitar, dejar sedimentar y volver a extraer el sobrenadante. Repetir los lavados hasta la ausencia de acidez.

Añadir al residuo 75 ml de hidróxido de sodio al 5%. Añadir agua hasta la marca de 100 ml y hervir por espacio de 10 minutos exactamente.

Dejar enfriar, agregar agua hasta los 200 ml. Retirar el sobrenadante con pipeta y repetir los lavados hasta que estos no den reacción alcalina.

Transferir todo el sedimento a un papel de filtro tarado, hacer un par de lavados con agua y llevar a estufa a 110°C por espacio de una a dos horas para secar. Enfriar en desecador, pesar, deducir la tara, y obtener el peso de la fibra cruda.

El peso de la fibra cruda, menos el correspondiente a la ceniza, es el valor de los polisacáridos insolubles (fibra).

LÍPIDOS

DETERMINACIÓN DE GRASAS

Objetivo

La extracción de grasas con disolventes es una práctica común en la industria. Es muy aplicada para la extracción de lípidos, una de cuyas características -como se sabe- es su solubilidad en los llamados disolventes de las grasas: éter, benceno, cloroformo, etc. Por otro lado la técnica es de máximo interés, desde el punto de vista analítico, pues permite valorar la composición de los productos naturales.

En la industria, la economía del proceso exige el máximo aprovechamiento de los disolventes.

El objeto de la siguiente práctica es, por lo tanto:

- 1.- Extracción de grasas de semillas con éter etílico utilizando un extractor Soxhlet.
- 2.- Recuperación del disolvente por destilación del extracto.

Materiales

Aparato de extracción de Soxhlet (500 ml), soporte, pinzas, nueces, hornillo eléctrico, baño, termómetro (0 a 100°C), éter etílico (250 ml, punto de ebullición 34,5°C), semillas de girasol, maní, soja, etc.

Procedimiento

EXTRACCIÓN

1.- Tomar unas cuantas semillas de maní, pesarlas y trocearlas finamente en un mortero.

2.- Tomar un cartucho de celulosa (o en su defecto hacerlo con papel de filtro, de 2.5 cm de diámetro y 9 cm de altura, aproximadamente) pesarlo y llenarlo con el producto cuya grasa se desea extraer, tapándolo con un algodón.

3.- Introducir el cartucho en el cuerpo del Soxhlet.

4.- Colocar 250 ml de éter etílico en el matraz.

5.- Montar el aparato y calentar a baño de María cuidando que la temperatura del agua no sobrepase los 50°C; no se debe sobrepasar esta temperatura pues el éter a temperaturas superiores puede explotar violentamente.

6.- Tras una hora de extracción (dos o tres extracciones), quitar el baño, desmontar el aparato, sacar el cartucho del tubo del interior del Soxhlet, y reunir todo el extracto etéreo en el matraz.

RECUPERACIÓN DEL ÉTER

Para recuperar el disolvente se destila el extracto, pudiéndonos servir como aparato de destilación el propio Soxhlet. Para ello, montar de nuevo el Soxhlet y calentar a baño de María a temperatura de 50°C. El éter condensado en el refrigerante se recogerá en el cuerpo del Soxhlet. Medir con una probeta el volumen de éter recuperado.

El residuo que queda en el matraz tras la destilación del éter corresponde a la grasa extraída de las semillas.

Cuestiones

Dibujar un sencillo esquema del aparato Soxhlet.

Describir el funcionamiento del aparato.

¿Qué proporción de disolvente se ha recuperado en la práctica?

NUTRICIÓN

CARENCIAS DE ELEMENTOS MINERALES EN PLANTAS

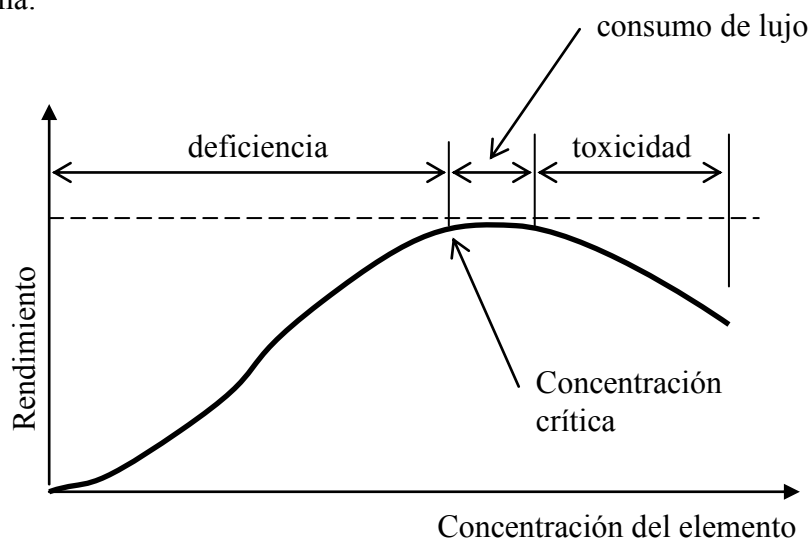
Objetivo

Desde sus comienzos, la agronomía se ha dedicado a descubrir las fórmulas convenientes para la nutrición mineral de las plantas, lo que ha permitido un rendimiento máximo de los cultivos, dentro de los límites de otros muchos factores naturales sobre los que el hombre nada puede hacer.

Más recientemente, mediante el análisis foliar se ha perseguido el mismo fin, es decir, definir la mejor composición mineral en la planta para lograr un rendimiento máximo. Sin embargo, la planta absorbe los elementos minerales que se encuentran a su disposición, más allá de las necesidades de su crecimiento; a esta absorción en exceso pero que no llega a ser tóxica, se le denomina "consumo de lujo"

Para el estudio empírico de la mejor concentración de un determinado elemento, para su buena absorción y aprovechamiento se utilizan distintas técnicas, que en general consumen mucho tiempo y que están fuera del alcance de este práctico.

Una curva experimental de la correlación que existe entre la concentración de un determinado elemento y el crecimiento óptimo de una planta se puede visualizar de la siguiente forma:



Para determinar el estado óptimo más eficiente es necesario conocer algunos signos y síntomas que las plantas desarrollan cuando sufren deficiencia o toxicidad por algún elemento. En nuestro práctico vamos a poner de manifiesto las deficiencias que ocurren con la carencia de varios elementos, comparándolo con un grupo de plantas en condiciones de "consumo de lujo".

Utilizaremos la hidroponía como herramienta, y la composición de sales minerales de Murashige y Skoog, descubierta en 1962 por dichos autores, para callos de tabaco.

Materiales

Medio de sales minerales de Murashige y Skoog

Soluciones stock	Constituyentes	Concentración en la solución stock g/500 ml	Volumen de la solución a tomar (ml)	Concentración final en el medio (mg/L)
A	NH ₄ NO ₃	82.5	10	1650.0
	KNO ₃	95.0	10	1900.0
B	MgSO ₄ ·7H ₂ O	18.5	10	370.0
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.12	10	22.3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.43	10	8.6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00125	10	0.025
C	IK	0.0415	10	0.83
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00125	10	0.025
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	22.0	10	440.0
D	H ₃ BO ₃	0.31	10	6.2
	KH ₂ PO ₄	8.5	10	8.5
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0125	10	0.25
E	Na ₂ -EDTA	1.87	10	37.35
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.4	10	27.85

Recipientes para hidroponía, probetas, agua destilada, soportes para las plantas, plantas de maíz o soja, pH metro.

Procedimiento

1.- Formar seis grupos de trabajo, tomando cada uno un recipiente para hidroponía, medir el líquido necesario para llenarlos hasta unos 3 cm del borde superior, y calcular la cantidad de sales minerales y de agua necesarios, según el siguiente esquema:

Tanque n° 1: CONTROL POSITIVO.

Total capacidad del tanque 10 litros.

Poner 5 litros de agua, añadir 100 ml de cada una de las soluciones stock, agitando cada vez, ajustar el pH entre 5.5 y 6.0, y añadir agua hasta completar 10 litros.

Tanque n° 2: SIN YODO, SIN CLORO.

Total capacidad del tanque 10 litros.

Poner 5 litros de agua, añadir 100 ml de cada una de las soluciones stock, menos de la solución de haluros (solución stock C), ajustar el pH entre 5.5 y 6.0, y añadir agua hasta completar los 10 litros.

Tanque n° 3: SIN SULFATOS.

Proceder idénticamente pero sin añadir la solución B de sulfatos.

Tanque n° 4: SIN NITRATOS.

Proceder idénticamente pero sin añadir la solución A de nitratos.

Tanque n° 5: SIN FOSFATO, MOLIBDENO Y BORO.

(Sin la solución D).

Tanque n° 6: SIN HIERRO.

(Sin la solución E).

2.- Una vez preparados los tanques, tomar las plantas provistas por la cátedra seleccionándolas con sumo cuidado.

Elegir plantas de hojas y tallos sanos, sin manchas ni marcas en las hojas. Lavar con cuidado la tierra de la raíz, atarla al soporte, e introducirla en la solución correspondiente. No dejar las plantas sobre la mesada con la raíz desnuda.

3.- Poner los recipientes de forma que reciban buena luz natural y anotar las condiciones ambientales del momento. Anotar el estado de las hojas, altura de las plantas etc. Revisar semanalmente las hojas buscando diferencias con el control.

4.- Comenzar un cuadro comparativo general, para poder notar las diferencias en cuanto surjan.

NUTRICIÓN

VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN DE RESTOS VEGETALES

Objetivo

La descomposición de los restos vegetales en elementos minerales tiene lugar a través de procesos abióticos y bióticos. Por ejemplo, los fuegos de praderas y bosques liberan grandes cantidades de CO₂ y otros gases a la atmósfera y minerales al suelo. Sin embargo, el proceso más común es el llevado a cabo por los microorganismos saprófitos que utilizan los restos de animales y plantas como sustrato, para obtener el alimento (la energía) para sí mismos. Destruyen los enlaces químicos, de donde sacan la energía, liberando los minerales de las estructuras en que estaban integrados. Esto constituye una función absolutamente vital para la vida en nuestro planeta, porque si no tuviera lugar, todos los minerales no tardarían en estar ligados a cuerpos muertos, y ninguna nueva vida sería posible.

Ninguna especie particular de saprófito puede, ella sola, producir la descomposición completa de un cuerpo muerto. Las poblaciones de desintegradores constan de muchas especies, las que con su acción gradual pueden realizar la descomposición completa.

No todas las partes de los cuerpos de plantas y animales se desintegran con la misma velocidad. Las grasas, los azúcares y las proteínas se descomponen fácilmente; la celulosa, la lignina, la quitina, el pelo, los huesos se descomponen muy lentamente.

En la descomposición conviene distinguir tres etapas:

1.- La formación de detritus, o sea la división de los restos muertos en partículas muy pequeñas debido a acciones físicas y biológicas.

2.- Por la acción de los saprófitos: la producción rápida de humus y la liberación de elementos orgánicos solubles.

3.- La mineralización lenta del humus.

Cuando para un determinado volumen de materia estas tres etapas han finalizado, los elementos minerales que contenía se encuentran de nuevo disponibles para su utilización.

Como se ha dicho, no toda la materia se descompone con la misma velocidad, la velocidad de descomposición varía según la composición química de los restos vegetales, según las condiciones climáticas y según la flora saprófita del lugar. Es importante, por lo tanto, para un sitio determinado, evaluar el tiempo de reciclaje de los nutrientes. Uno de los acercamientos más simples a este problema es el que se va a practicar aquí.

Materiales

Tela de mosquitero de plástico o alambre, aguja de coser e hilo fuerte.

Procedimiento

Tomar la tela y hacer bolsitas de aproximadamente 10 cm de lado. Tomar restos vegetales muertos, trocearlos, e introducirlos en la bolsita, la que se coserá fuertemente de forma de no dejar que los restos de vegetal puedan escaparse de la bolsita. Pesar el conjunto en granatario y anotar el peso. Llevar la bolsita al mismo lugar de donde se habían recogido los restos vegetales y semienterrarla en el mantillo.

Anotar el lugar. Semanalmente, antes de comenzar cualquier otra actividad en el laboratorio, se retirará la bolsita del lugar, se quitará la tierra adherida superficialmente, se pesará y se volverá a enterrar en el mismo lugar.

El experimento se dará por finalizado al final del cuatrimestre, cuando el estudiante con los datos obtenidos confeccionará los Gráficos:

Peso *versus* tiempo

Variación peso *versus* tiempo.

CRECIMIENTO

MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO

Objetivo

El crecimiento se puede definir como la síntesis de protoplasma que normalmente viene acompañada de un cambio de forma y un aumento irreversible de la masa de un organismo vivo, órgano o célula.

Por tasa de crecimiento se entiende la variación que experimenta este por unidad de tiempo, y muchos parámetros nos pueden servir para expresarla. Podemos tomar variaciones de longitud si se trata de medir el crecimiento de una plántula, variaciones de diámetro si lo que queremos es medir el crecimiento del tronco de un árbol.

Uno de los parámetros más significativos para la medida del crecimiento, pero con la desventaja que es destructivo, es la medida del peso seco de la planta, órgano o tejido. El peso fresco es mucho más fácil, y en caso de plantas enteras no es destructivo.

Materiales

Cinta adhesiva, marcadores, repasadores, papel milimetrado, bisturí, regla graduada, semillas de poroto (*Phaseolus vulgaris*), sustrato, macetas.

Procedimiento

a) Tomar un lote de semillas de poroto y remojar en agua por 24 horas. Después de dicho periodo, seleccionar 100 semillas y plantarlas en una o varias macetas, en la mezcla de tierra-mantillo, compost de lombriz y arena que proveerá la Cátedra. Riéguelas bien con agua. Anote la composición de la mezcla.

En la misma ocasión, tomar 10 semillas de las que no fueron plantadas, abrirlas por el medio, y medir con la regla el largo de las hojuelas del embrión. Calcular la longitud media, y tomarla como medida inicial de una serie de medidas de crecimiento en largo del primer par de hojas de la planta de poroto, que deberá efectuar siempre con la misma regla.

En los días 5°, 7°, 12°, 15°, 19° y 21° después de la siembra, medir, con apreciación de 1 mm, el largo de las dos primeras hojas en 10 plantas incluyendo el largo del pecíolo. Para las medidas correspondientes al 5° y 7° día se deberán desenterrar las plantas, ya que estas estarán germinando. Desechar una vez medidas.

Las medidas subsiguientes se efectuarán sin desenterrar las plantas, y si es posible se utilizarán siempre las mismas diez. Promediar las medidas tomadas de las 10 plantas y construir gráfico con la longitud de la hoja *versus* el tiempo expresado en días.

Al seleccionar, elija las plantas que presenten el aspecto más uniforme entre sí.

b) Medición del crecimiento con el AUXANÓMETRO

Seleccione una de las plantas más vigorosas del experimento anterior, una vez que hayan emergido; plántela en una maceta por separado, en la misma mezcla, y permita que alcance una determinada altura (10 cm por ejemplo). Marcar con una fibra un lugar en el tallo, cerca de la base, y hacer otra marca cerca del ápice de la plántula. Medir siempre de marca a marca con la misma regla.

Fijar la planta al auxanómetro, ubicando el conjunto en el invernadero, con las demás plantas. Anotar el día del comienzo de la medición, y la medida correspondiente a ese día. Efectuar las medidas cada 3 - 4 días.

Correlacionar el crecimiento del segmento de la planta medido con el resultado marcado por el auxanómetro.

Sacar conclusiones para una futura utilización del auxanómetro.

REGULADORES DEL CRECIMIENTO

EFFECTO DE LOS REGULADORES QUÍMICOS SOBRE LA SENESCENCIA DE LAS HOJAS

Objetivo

El crecimiento armónico de un organismo implica además de un aumento irreversible de protoplasma, la diferenciación de tejidos y órganos, y la capacidad de poder responder a estímulos ambientales con un aumento o disminución de la velocidad de dicho crecimiento.

Uno de los mecanismos discernibles, por el cual el organismo lleva a cabo dicha regulación, es un conjunto de mensajeros químicos (llamados reguladores del crecimiento, y por analogía "hormonas vegetales") que dirigen el metabolismo celular hacia distintas funciones de crecimiento y diferenciación.

La forma en que actúan estos reguladores del crecimiento es compleja, en el sentido que no se le puede asignar una función determinada a cada uno de ellos.

Podemos imaginarnoslos como un conjunto de instrumentos tocando una pieza de *rock* pesado. A veces algunos de ellos parecen actuar como solistas, al regular un determinado fenómeno, pero en la mayor parte de los casos es necesaria la interacción simultánea de varios o de todos (de estos reguladores) para que el efecto (sobre el crecimiento) tenga lugar.

En este práctico se utilizarán hojas enteras desprendidas de la planta y discos cortados de esas hojas, para observar el efecto de algunos reguladores sobre la movilización de nutrientes durante el proceso de una senescencia provocada. Debemos forzar el fenómeno, porque si no los niveles internos de reguladores (niveles no conocidos) nos enmascararían completamente el experimento.

Al aplicarlos individualmente, en forma exógena, se puede apreciar que algunos de ellos actúan sobre el mismo fenómeno, pero con distinta intensidad.

Materiales

Hojas de *Citrus sinensis*, cámara de germinación, vermiculita, placas de Petri, papel de filtro, sacabocados, tijeras, hipoclorito de sodio, Ácido Giberélico (AG) 1, 5 y 10 ppm (mg/L) ; Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) 5,10 y 25 ppm; Ácido Indol Acético(AIA) 10, 50 y 100 ppm; lanolina.

Procedimiento

Preparación de soluciones

Ácido Giberélico 10 ppm: disolver 10 mg de AG en un ml de etanol y aforar a 1.000 ml con agua.

Para el AG de concentración 5 ppm y 1 ppm, pipetear 100 ml y 25 ml de la dilución anterior y aforar a 200 y 250 ml con agua respectivamente.

Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético 25 ppm: disolver en un poco de agua 25 mg de 2,4-D y aforar a 1.000 ml. Si no se disuelve bien, añadir un poco (no más de 1 ml) de etanol.

Para el 2,4-D 10 y 5 ppm, pipetear 100 y 50 ml de la dilución anterior y aforar a 250 ml respectivamente.

Ácido indol acético 100 ppm: disolver 10 mg de AIA en 100 ml de agua. Tomar 50 ml de esta última dilución y aforar a 100 ml: AIA 50 ppm.

Tomar 10 ml de la dilución de AIA 50 ppm y aforar a 50 ml: AIA 10 ppm.

Aplicación con lanolina: prepare la pasta disolviendo 10 mg de la hormona en un poco (2 ml aproximadamente) de alcohol etílico absoluto. Añada la solución a 1 g de lanolina previamente calentada, y agite vigorosamente para garantizar una mezcla uniforme y para ayudar a la evaporación de etanol. Este dará una concentración de 10.000 ppm o 1%.

Cuando la mezcla esté semisólida y a temperatura ambiente, separar de ella por pesada 0.5 g, y regenerar con otros 0.5 g de lanolina caliente un gramo de mezcla, agitando vigorosamente como anteriormente. Así se obtendrá una concentración de 5.000 ppm o 0.5%.

Seleccionar hojas de naranjo, separarlas del árbol conservando el pecíolo, y llevar al laboratorio medidas en una bolsa de plástico para prevenir la pérdida de humedad. Enjuagar, mantenerlas sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos, enjuagar con agua estéril, y eliminar el exceso de agua retenida en la superficie.

Tratamientos a hojas enteras

Sumergir las hojas así preparadas en la solución correspondiente de hormona más mojante (la concentración del mojante en la solución debe ser del 0.05%), y mantenerlas durante 5 minutos. No olvidar un blanco con agua destilada más mojante.

Sacar de la solución de hormona, y colocar sobre vermiculita húmeda, dentro de la cámara de germinación (cerrada), y mantener a régimen de luz continua de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluencia de fotones. Marcar por zonas los distintos tratamientos.

Tratamientos a discos de hojas

Tomar más hojas esterilizadas y lavadas y cortar rápidamente discos de 2.5 a 3 cm de diámetro, tratando de no comprometer la vena central, y situarlos en cajas de Petri preparadas con un algodón, de forma que provea un lecho húmedo, todo ello esterilizado. Situar en el centro del disco un poco de solución de hormona en lanolina, con ayuda de una varilla. Marcar las placas con los distintos tratamientos. No olvidar un tratamiento control con lanolina más etanol. Tapar y ubicar bajo luz continua de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluencia de fotones.

Observar cada dos días, humedecer si es necesario.

El estudiante debe tomar la decisión de cuándo finalizar el experimento, y debe fundamentar su decisión, junto con sus conclusiones.

FITOCROMO

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA DE LA LUZ VISIBLE SOBRE LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO. EL FITOCROMO

Objetivo

Ya en el 1935, los investigadores Flint y McAlister, trabajando con la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids), descubrieron que no todas las luces tenían igual efecto sobre la germinación de dichas semillas. Comprobaron que la longitud de onda más eficiente para inducir la germinación era la luz roja de 670 nm y que, por el contrario, la que más inhibía el fenómeno era la luz de 730 nm. Igualmente se encontraron diferencias con la luz azul.

De esta forma se tuvieron evidencias fisiológicas de la existencia de un fotorreceptor, que regulaba un fenómeno que no tenía nada que ver con la fotosíntesis. Descubríamos así otros fenómenos regulados por la luz visible.

En esta experiencia se va a poner de manifiesto la influencia de la luz sobre la germinación y posterior crecimiento del plantín.

Materiales

Germinadores, autoclave, placas de germinación, algodón, hipoclorito de sodio, erlenmeyers, semillas de *Cucumis sativus*.

Procedimiento

Preparar las placas de germinación con el algodón, agua, de forma de fabricar un lecho húmedo pero no inundado, donde descansarán las semillas, además de erlenmeyers con agua, y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Tomar las semillas y esterilizarlas durante dos minutos con hipoclorito de sodio al 0.5%, enjuagar tres veces con agua estéril y sembrar en las placas de germinación. Asegurarse que las semillas descansan en un lecho húmedo. Contar el número de semillas sembradas por placa.

Situar las placas de germinación en los germinadores, en donde las semillas recibirán luz de distinta longitud de onda (distinto color), ya que la luz ambiental debe pasar por los vidrios coloreados de las tapas de los germinadores. Seis tratamientos en total, incluyendo luz natural, y oscuridad completa. Observar día por medio. Añadir agua si es necesario.

El alumno dará por finalizado el experimento cuando lo considere oportuno, fundamentando su decisión.

FOTOSÍNTESIS

MÉTODO DE LA MEDIA HOJA DE SACH PARA MEDIR FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN

Objetivo

La fotosíntesis es el acontecimiento más importante de la biosfera. Las plantas verdes de la superficie terrestre y las algas de los océanos son capaces de fijar de 50 a 150 mil millones de toneladas métricas de dióxido de carbono por año, dependiendo de la forestación, de la contaminación ambiental, las condiciones climáticas de ese año, etc.

Toda esa masa (en sentido literal) se transforma en el tejido que soporta la vida de los animales y el hombre. Esta no es una masa informe de tejido que contiene clorofila, sino que se compone de unas estructuras hermosas altamente ordenadas y eficientes a la hora de absorber radiación solar y CO₂: las plantas verdes.

Este experimento trata de demostrar un poco de esa fijación traducida en un aumento de masa, que se puede poner de manifiesto con una pesada, y al mismo tiempo comparar la fotosíntesis con la respiración, el proceso que nos permite utilizar la energía química acumulada como masa para traducirla en trabajo (metabólico, mecánico) útil.

Materiales

Doce plantas de poroto, *Phaseolus vulgaris*, con varias hojas verdaderas, sacabocados, balanza, estufa hasta 105°C, lámpara incandescente de 100 W.

Procedimiento

Etiquete cuidadosamente cada planta. Corte tres círculos de la mitad de una hoja, tratando de no dañar las nervaduras ni de cortar las importantes. Repítalo en todas las plantas.

Los círculos así cortados deben colocarse en estufa a 105°C durante una hora, en un recipiente que identifique la planta de la que provienen.

Mientras se espera el secado de los discos, se dividen las plantas en dos lotes iguales. Las plantas del lote número uno se mantienen en la oscuridad durante noventa minutos. Las plantas del segundo lote se iluminan intensamente, teniendo cuidado de evitar el sobrecalentamiento, también durante noventa minutos.

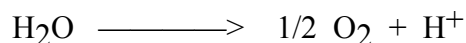
Transcurrido ese tiempo, se cortan tres círculos de hojas intactas de todas las plantas de ambos lotes, y se secan en estufa como anteriormente, a 105°C durante una hora. Tenga sumo cuidado al etiquetar los discos, para comparar los de la misma planta. Compare el peso seco de los discos.

FOTOSÍNTESIS

REACCIÓN DE HILL: FOTORREDUCCIÓN EN LOS CLOROPLASTOS

Objetivo

Los cloroplastos de las plantas superiores son orgánulos altamente ordenados, en donde ocurren acontecimientos específicos. En ellos encontramos distintos pigmentos capaces de excitarse con la energía de ciertas radiaciones luminosas; entre estos pigmentos se encuentra la molécula de clorofila, la única que tiene electrones π altamente móviles, lo que permite la rápida transferencia de la energía atrapada y utilizarla para la fotólisis del agua:



Y aquí se inicia una cadena de transferencia de H^+ que termina con la reducción del NADP a NADPH_2 .

Fue Hill, quien en 1937 demostró en un experimento clásico (producción de O_2 inducida por la presencia de la luz en un material vegetal inmerso en agua con oxalato férrico).

Es esta reducción la que pondremos de manifiesto en nuestro experimento.

Materiales

Sacarosa, cloruro de potasio, 2,6 diclorofenol-indofenol, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, probetas de 10 y 25 ml, vaso de precipitado de 100 ml, licuadora o desintegrador de tejidos, centrífuga, hielo, algodón de vidrio, 6 tubos de ensayo, 50 g de hojas de espinaca.

Procedimiento

Preparación de soluciones

Solución tampón: prepare una solución uniendo 3 ml de tampón fosfato 0.1N, pH 6.8 y 19 ml de KCl 0.008M.

Solución diclorofenol: prepare una solución con 16 mg de 2,6 diclorofenol-indofenol diluidos en 100 ml de agua destilada.

Preparar 100 ml de una solución de sacarosa 0.4M, y ubicar en un cubo con hielo, y en heladera. Lavar perfectamente las hojas de espinaca, pesar 8 g y llevarlas a licuadora con 50 ml de la solución de sacarosa helada. Licuar en baño de hielo, filtrar la suspensión

haciéndola pasar a través de lana de vidrio. Recoger el filtrado y centrifugar a 50 g durante 10 min. Terminado esto, tomar el sobrenadante y volver a centrifugar este a 600 g durante 10 min.

Descartar el sobrenadante, y lavar el residuo (donde se encuentran los cloroplastos) con sacarosa 0.4M. A continuación suspender los cloroplastos en 10 ml de sacarosa helada 0.4 M. Dividir la suspensión en dos partes, conservar una de ellas en baño de hielo, mientras se hierve la otra durante pocos minutos y se deja enfriar.

Preparar y numerar seis tubos de ensayo según el esquema siguiente:

I	II	III	IV	V	VI
3.5 ml de solución tampón	3.5 ml de solución tampón	3.0 ml de solución tampón	3.0 ml de solución tampón	3.0 ml de solución tampón	3.0 ml de solución tampón
		0.5 ml de solución de diclorofenol	0.5 ml de solución de diclorofenol	0.5 ml de solución de diclorofenol	0.5 ml de solución de diclorofenol
1.5 ml de cloroplastos helados	1.5 ml de cloroplastos hervidos	1.5 ml de solución de cloroplastos helados	1.5 ml de solución de cloroplastos helados	1.5 ml de solución de cloroplastos hervidos	1.5 ml de solución de cloroplastos hervidos

Situar los tubos nº 1, 2, 3 y 5 bajo luz intensa.

Situar los tubos nº 4 y 6 en la oscuridad.

Después de 15 minutos observar la coloración en los tubos de ensayo.

FOTOSÍNTESIS

DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE COMPENSACIÓN LUMINOSO

Objetivo

Para que los procesos fotosintéticos tengan lugar, es necesario que el cloroplasto reciba una cierta cantidad de energía luminosa; entonces, la maquinaria fotosintética puede contrarrestar la producción de CO_2 respiratorio. La luz con la que se alcanza este punto de equilibrio donde no se pone de manifiesto un flujo de CO_2 en ningún sentido, recibe el nombre de punto de compensación luminoso.

El punto de compensación luminosa está en el orden de 100 a 200 pie-candela para hojas adaptadas al sol, y tan bajo como 10 pie-candela para hojas de sombra. Es muy variable, aun dentro de la misma especie, y es una característica adaptativa de la planta. Sobre todo es importante porque refleja la velocidad de respiración de la planta en estudio, lo que nos indica el metabolismo activo de la misma.

En este práctico vamos a aprovechar la capacidad de la combinación del CO_2 con el agua para formar ácido carbónico, que cambiará el pH de la solución, lo que será evidenciado mediante un indicador.

Materiales

Rojo de fenol, cloruro de potasio, carbonato ácido de sodio, tubos de ensayo, gradillas, hojas de mediano tamaño, cuatro cajas de iluminación diferente: oscuridad, lámparas incandescentes de: 15 W, 30 W, 60 W, 100 W.

Procedimiento

Preparar una solución que sea 0.09N con respecto al KCl y 0.01N con respecto al NaHCO_3 , ajustar a pH 8.4, y agregar unas gotas de rojo de fenol. Llenar los tubos de ensayo hasta la mitad con la solución precedente, y colocar dentro de cada uno, una hoja de forma que el pecíolo quede dentro de la solución, y las paredes del tubo la sujeten fuera del líquido.

Poner una gradilla con diez tubos dentro de cada caja, de forma que cada hoja reciba la misma cantidad de luz. Retirar después de dos horas, observar el color de la solución, y determinar aproximadamente el punto de compensación luminoso. Explicar qué ha ocurrido dentro del tubo de ensayo.

RESPIRACIÓN

CONSUMO DE OXÍGENO DURANTE LA RESPIRACIÓN

Objetivo

El objetivo de este práctico es demostrar el consumo de oxígeno durante la respiración de un tejido vivo. El aparato que utilizaremos es un sistema cerrado donde se introduce un sujeto que consume O₂ (semillas en germinación por ejemplo). El oxígeno es consumido y el CO₂ producido es absorbido sobre una solución de KOH, lo que resulta en una pérdida de volumen de aire dentro del sistema cerrado, que se mide mediante un manómetro.

Cualquier cambio de temperatura en el sistema introduce grandes errores. Por ejemplo, en una cámara de 1 litro de capacidad, el cambio de 1 grado centígrado de temperatura puede llevar a una medición con un error de 3.5 ml de O₂ por debajo del verdadero valor. Por lo tanto es muy importante mantener la temperatura de la cámara lo más estable posible, y esto es especialmente complicado en un medio en el cual el sujeto genera su propio calor como es el caso de todos los procesos oxidativos que ocurren en los tejidos.

El manómetro de Warburg clásico mantiene la cámara respiratoria dentro de un baño de agua a temperatura ambiente. Con el respirómetro construido por nosotros esto es prácticamente imposible, por lo tanto demostraremos la existencia del fenómeno y el consumo de oxígeno. Tomaremos la cantidad consumida como aproximada.

Materiales

Dos matraces erlenmeyer de 1.000 ml de capacidad, 2 vasos de precipitados de 50 ml, 2 pipetas de 1 mm de diámetro, 2 tubos de ensayo pequeños, 2 tapones de goma, papel milimetrado, tinta roja, tensoactivo, perlas de KOH, semillas de *Phaseolus*.

Procedimiento

Tomar las semillas y remojarlas en agua durante 8 horas previas al experimento. Tomar los materiales y construir dos respirómetros simples, montando los aparatos según el dibujo adjunto.

Los respirómetros así contruidos responden a los cambios de temperatura y de presión atmosférica; por lo tanto, y para que nos sirva de control, en uno de los aparatos montados no introduciremos el material vegetal, pero sí todo lo demás. Los mantendremos a ambos juntos.

Llenar el tubo de ensayo con KOH al 10%, teniendo cuidado de no derramar la solución fuera de él. Poner la tinta roja con el tensoactivo en el vaso de precipitado. Hacer

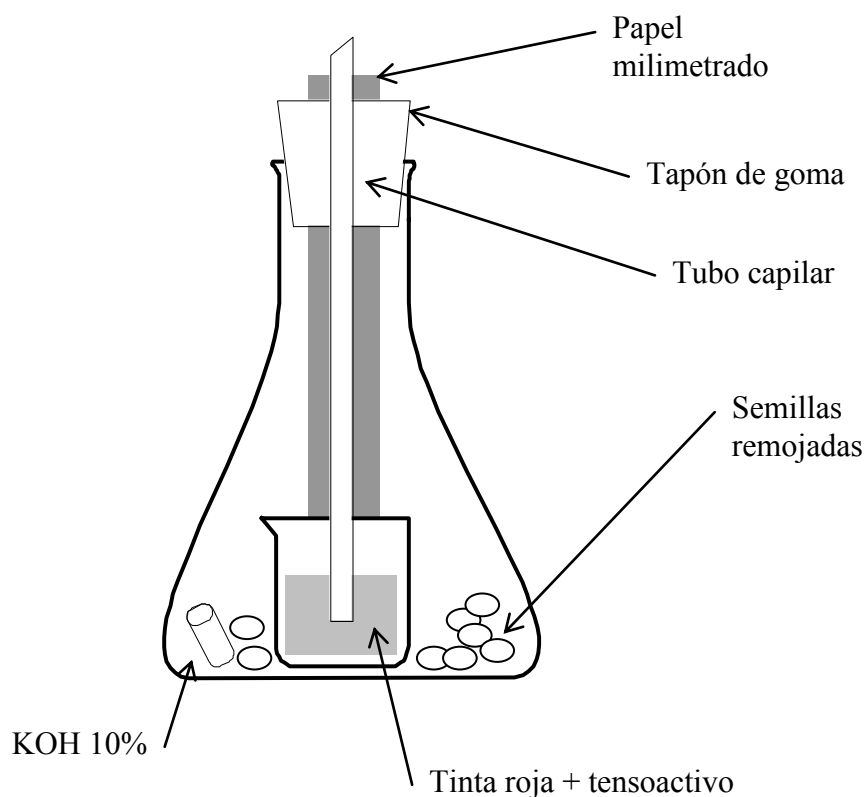
esto anterior en ambos erlenmeyers. Cerrar el respirómetro testigo introduciendo la pipeta sujeta al tapón dentro de la tinta roja. Verificar cuidadosamente que el tapón de goma cierra herméticamente el matraz.

En el segundo erlenmeyer, además, tomar 25 semillas y ubicarlas en su base. Verificar cuidadosamente el cierre. Esperar 10 minutos para que se alcance estabilidad en el intercambio gaseoso, e iniciar las lecturas, tomando como referencia cada vez (valor cero), la lectura que señale el respirómetro sin material vegetal.

Efectuar lecturas cada diez minutos durante una hora.

Si trabajamos con discos de hojas, debemos sumergirlos en una solución de sacarosa al 10%, y mantener los respirómetros durante la duración del experimento, en la oscuridad o bajo luz verde. Trabajaremos así para evitar que ocurra la fotosíntesis.

Si queremos obtener datos sobre el intercambio total de gases, pondremos agua en el tubo lateral, en vez de la solución de KOH y haremos lo mismo en el caso de querer medir la respiración anaeróbica.



SEMILLAS

TEST DE VIABILIDAD DE SEMILLAS: LIXIVIACIÓN DE NUTRIENTES AL MEDIO

Objetivo

La semilla puede considerarse como un sistema cerrado, con la energía, los nutrientes de reserva y la información, necesarios para la germinación. Solo necesita del medio externo agua, oxígeno, temperatura y (a veces) luz.

Toda esa información, energía y nutrientes están en forma de moléculas químicas, que ya tienen un comportamiento predeterminado. Según la especie, esperarán pacientemente y sin sufrir transformaciones que penetre agua y oxígeno; o una molécula que bloquee algún proceso químico, se debilitará con el tiempo, o con temperaturas primaverales, y ese proceso químico interno ulcerará las cubiertas seminales de forma tal que permita la entrada de agua y oxígeno; o bien un fuego externo debilitará las cubiertas, de forma que, para germinar, siempre tiene que existir primero un intercambio con el medio ambiente.

Ahora bien, si la semilla estimulada por la pequeña cantidad de agua y oxígeno que pueda penetrar, comienza los procesos químicos que llevan a la germinación, y posteriormente el proceso se rompe por falta de otras condiciones, esa semilla pierde toda capacidad de germinación posterior, aun cuando a los ojos parezca intacta. Es por eso que una semilla dañada pierde su capacidad germinativa.

Cuando nosotros tomamos un paquete de semillas y las sumergimos en agua bidestilada, pueden ocurrir dos cosas:

que las semillas tengan las cubiertas seminales intactas y no lixivien nutrientes al exterior;

que las cubiertas seminales estén dañadas y ocurra el pasaje de metabolitos desde el interior de la semilla al medio hipotónico formado por el agua bidestilada.

Dicho pasaje lo podemos poner de manifiesto mediante la medida de la conductividad eléctrica del "agua" donde están las semillas, y por lo tanto la medida de dicha conductividad servirá como indicación sobre la viabilidad de las semillas. Esto se debe a que al pasar la corriente eléctrica por el electrolito (o sea el agua donde están inmersas las semillas), tienen lugar dos importantes fenómenos:

1- Junto a los electrodos se verifican reacciones químicas.

2- Hay un transporte de materia a través de la solución, ya que en los electrolitos la conducción eléctrica se debe a un mecanismo de transporte de materia.

Por lo tanto, si se pone de manifiesto la conducción eléctrica, nos indica la presencia de materia, que proviene de la lixiviación de las semillas.

Materiales

Conductímetro, semillas, agua bidestilada, matraces, cepillo.

Procedimiento

Tomar un cierto peso de semillas (estandarizado), lavar con jabón líquido y el cepillo, para eliminar cualquier contaminante sobre la cubierta seminal, enjuagar con agua y posteriormente con agua bidestilada, y colocar en matraz de boca ancha con una cantidad de agua bidestilada (estandarizada). Repetir cinco veces, de forma tal que se obtengan cinco muestras.

Mantener a temperatura ambiente de 25 ± 1 °C durante dos horas, al cabo de las cuales medir la conductividad eléctrica con el conductímetro provisto, teniendo cuidado de que la campana de vidrio del aparato quede cubierta totalmente por la solución y sin burbujas de aire en su interior.

Lavar cuidadosamente la celda después de cada medición con agua bidestilada varias veces, teniendo cuidado de no introducir nada al interior que pueda dañar los electrodos de platino platinizado que contiene la celda.

Expresar la conductividad en mS o en μ S, según la escala elegida.

Repetir el experimento con todas las semillas que provea la cátedra, expresar los resultados en una tabla comparativa.

Compare este método con el test del tetrazolio.

Saque sus conclusiones e indique qué ventaja tiene el utilizar un test no destructivo, como el presente.

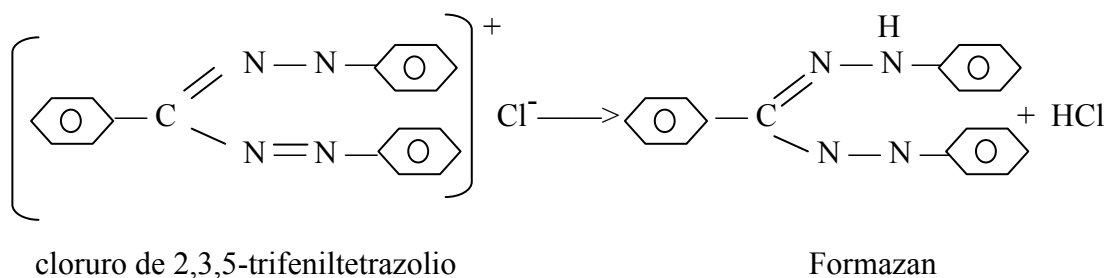
SEMILLAS

TEST DE VIABILIDAD DE SEMILLAS EMPLEANDO EL CLORURO DE TETRAZOLIO

Objetivo

La necesidad de contar con métodos rápidos para predecir el comportamiento germinativo de las semillas estimuló en el pasado a distintos investigadores en esta línea de acción. Como resultado de ello, hoy en día se cuenta con un método rápido y sin riesgo para los analistas, que consiste en explotar el hecho de que los tejidos vivos son capaces de reducir las sales de tetrazolio (que son solubles e incoloras) a "formazanes" coloreados e insolubles.

El compuesto con el que se obtienen los mejores resultados es el cloruro de 2,3,5 - trifeniltetrazolio.



Materiales

Placas de Petri, vasos de precipitado, pinzas, agujas de disección o de coser, vidrios de reloj, hojas de afeitar, lupa, cloruro de tetrazolio.

Solución de tetrazolio al 1%: pesar un gramo de tetrazolio y diluirlo a 100 ml con agua destilada. Ajustar el pH entre 6 y 8. Preparar la solución cada vez que se vaya a usar, y protegerla de la luz hasta su uso. Si se debe guardar hacerlo en lugar fresco y oscuro.

Procedimiento

1.- Toma de la muestra: tomar la muestra al azar, o seguir los métodos estadísticos generales para la toma de muestras. Para el test del tetrazolio se recomienda tomar dos muestras de 100 semillas cada una, o si la semilla es muy grande dos muestras de cincuenta semillas. Hay que recordar que cuanto menor sea el número de semillas tomadas, más estimativo será el test.

2.- Preacondicionamiento de la semilla: en general, las semillas deben ser sumergidas en agua o colocadas en sustrato humedecido por cuatro horas antes del test. Este preacondicionamiento hace que la interpretación posterior sea más fácil.

3.- Preparación de la semilla: se trata de exponer el tejido embrionario al producto; para ello se abordan distintos procedimientos.

Corte: las semillas grandes se deben cortar, previo acondicionamiento, por la mitad longitudinal transversalmente a través del embrión. Después del seccionamiento, una de las mitades se descarta y la otra se guarda poniéndola inmediatamente después del corte en la solución de tetrazolio. El corte debe ser neto y no despedazar la semilla, debe hacerse con hoja de afeitar o cuchillo muy filoso a fin de evitar daños y asegurarse un corte neto.

Pinchazo o corte de la extremidad distal: para semillas muy pequeñas del tipo de algunas gramíneas. Previo acondicionamiento, estas pueden ser pinchadas con una aguja de coser y atravesar el endosperma por sobre el embrión, o bien cortar la extremidad opuesta al embrión. Este corte o pinchazo debe hacerse bajo lupa, e inmediatamente después situar la semilla en la solución de tetrazolio.

Eliminación de los tegumentos después de la imbibición y situación de la semilla en la solución de tetrazolio.

Colocación directa: algunas semillas muy pequeñas como las de los tréboles pueden ser colocadas directamente en la solución de tetrazolio sin imbibición ni corte, pero los tegumentos deben ser removidos para la interpretación de los resultados.

4.- Test del tetrazolio: las semillas remojadas cortadas o pinchadas se introducen en la solución de tetrazolio al 1% (previa experimentación se puede usar también al 0.5% o al 0.1%), cuidando que la solución cubra totalmente las semillas. Inmediatamente el recipiente se guarda en la oscuridad completa, y se mantiene durante cuatro horas a 40°C.

Transcurrido ese tiempo, se drena la solución, y se enjuagan varias veces con agua destilada, cuidando que después del último lavado quede suficiente agua para que las semillas no se sequen, ya que si lo hacen desaparece el color. El color debe ser rojo brillante sobre las partes de la semilla (como el embrión) que necesitan estar vivas para que la semilla germine; sin embargo, hay mucha variabilidad en el color y en las partes de la semilla que toman color.

Algunos analistas quitan los tegumentos de las semillas después de la imbibición y antes de la coloración; con ello aumenta bastante la uniformidad de la coloración, pero los daños y fracturas ocasionados a la semilla durante la extracción hacen que la interpretación sea más difícil.

Muchos factores afectan la intensidad del color que se desarrolla. Las semillas viejas, muy deterioradas o mecánicamente dañadas se colorean rápidamente, intensamente y profundamente. Las semillas vigorosas se colorean más despacio de un color rojo brillante que no penetra muy profundamente. Semillas con bajo vigor dan un rosado suave, no importa cuán extenso sea el tiempo de coloración. Semillas que han estado toda la noche sobre un sustrato humedecido, se colorean más rápidamente y dan un color más limpio y brillante.

5.- Interpretación de los resultados: los test no necesitan ser interpretados inmediatamente después de la coloración y del lavado. Las semillas pueden guardarse en un lugar frío, húmedo y oscuro y la interpretación puede hacerse hasta un día después.

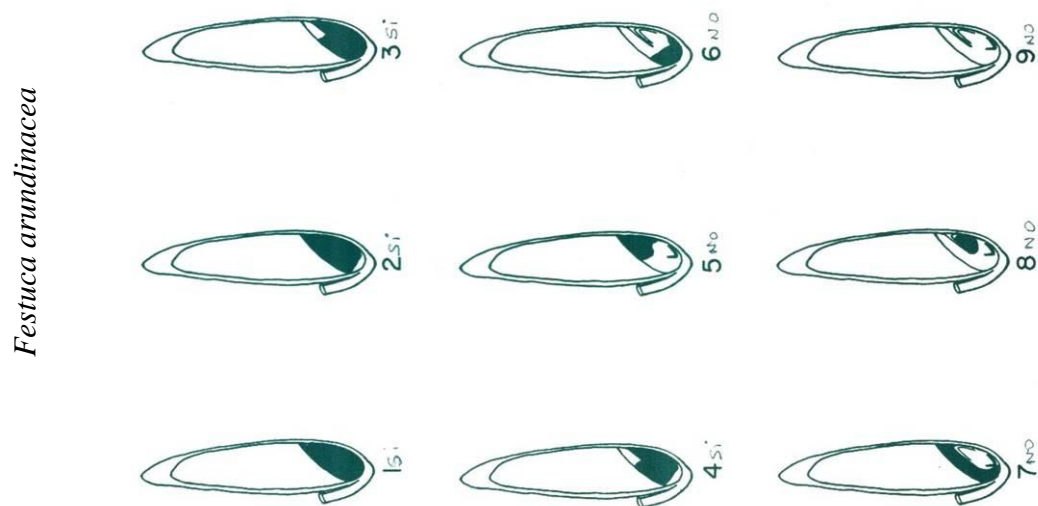
Para obtener precisión en interpretar los resultados, se deben desarrollar paralelamente test de germinación y del tetrazolio hasta que los resultados de ambos test sean equiparables y el analista entienda las posibles causas de error al utilizar solamente el test del tetrazolio.

La práctica es indispensable para conseguir un buen grado de precisión con el test del tetrazolio; un buen analista no lo aplicará en forma rutinaria hasta que no tenga confianza en sí mismo y en el test.

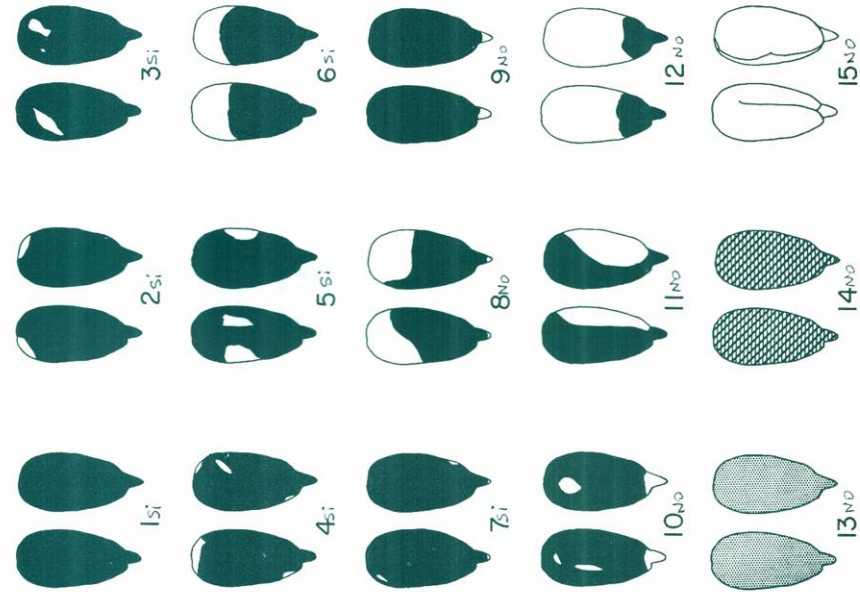
Hay que tener en cuenta que el test no diferencia entre semillas en estado latente y semillas no latentes. Más aún, en aquellos tipos de semillas con latencia profunda, los resultados con el test del tetrazolio dan mayor porcentaje de semillas viables que con la germinación.

Daños químicos causados por productos usados sobre las semillas (fungicidas, insecticidas) no son puestos en evidencia por el test. Las semillas con daños químicos se colorean tanto como las semillas sanas y "germinables".

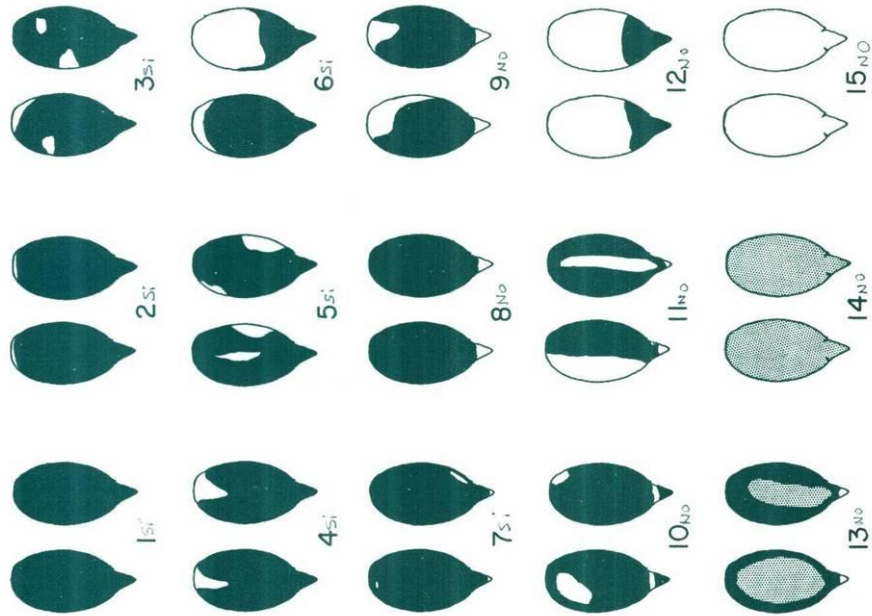
A continuación se detallan algunos ejemplos* para poner de manifiesto las posibles variaciones que pueden existir en el patrón de color del test y su correlación con la germinación. La parte negra de la semilla en el dibujo representa la parte coloreada. Al pie, al lado del número están consignados los monosílabos SI (implica que la semilla así coloreada germina) y NO (implica que la semilla así coloreada no germina).



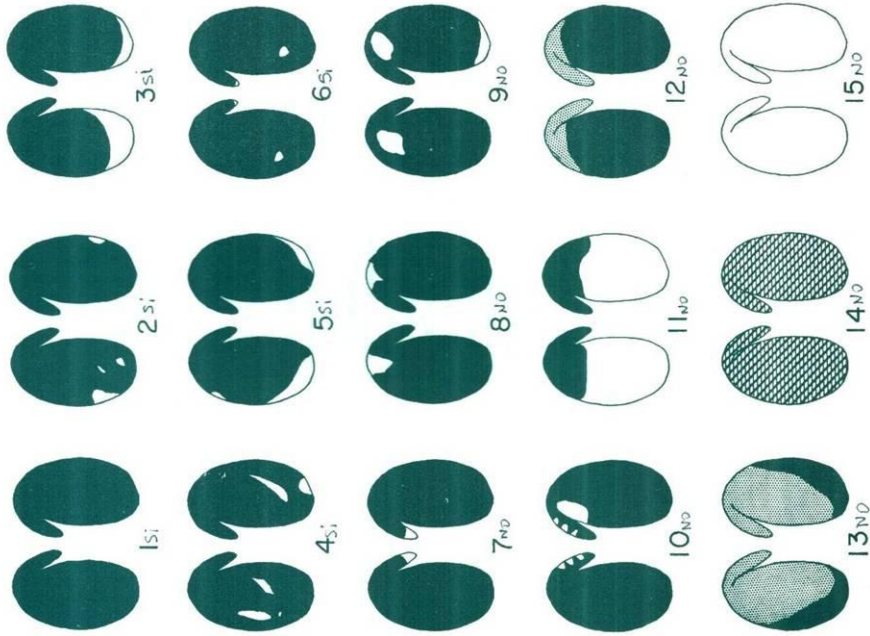
Gossypium sp.



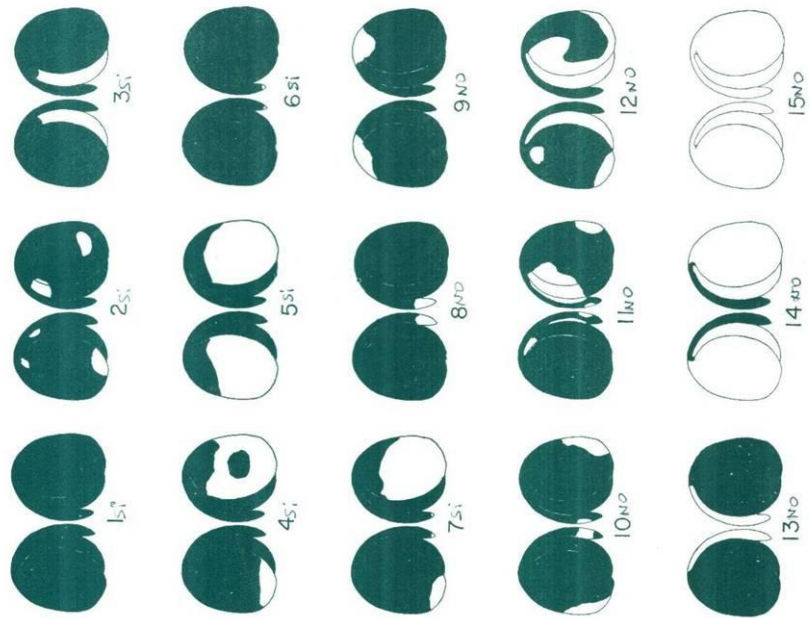
Citrullus vulgaris



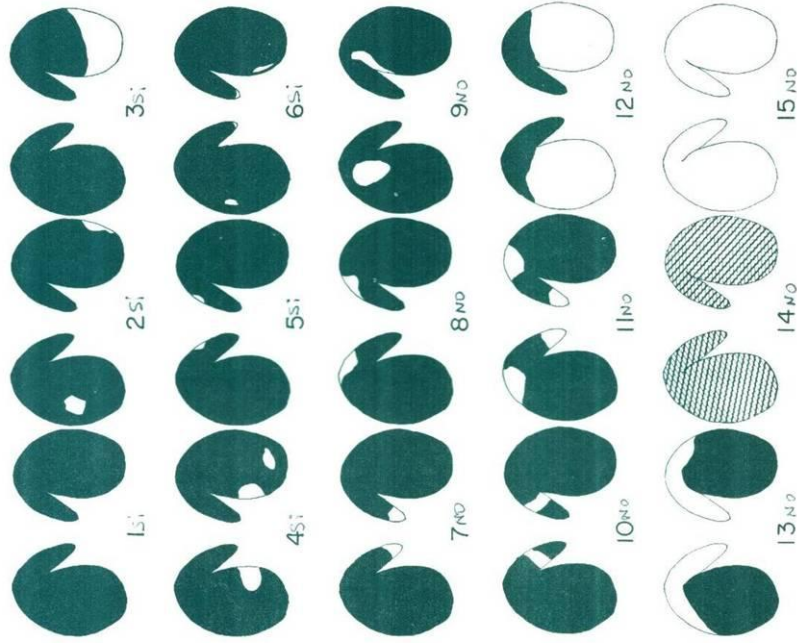
Glicine max



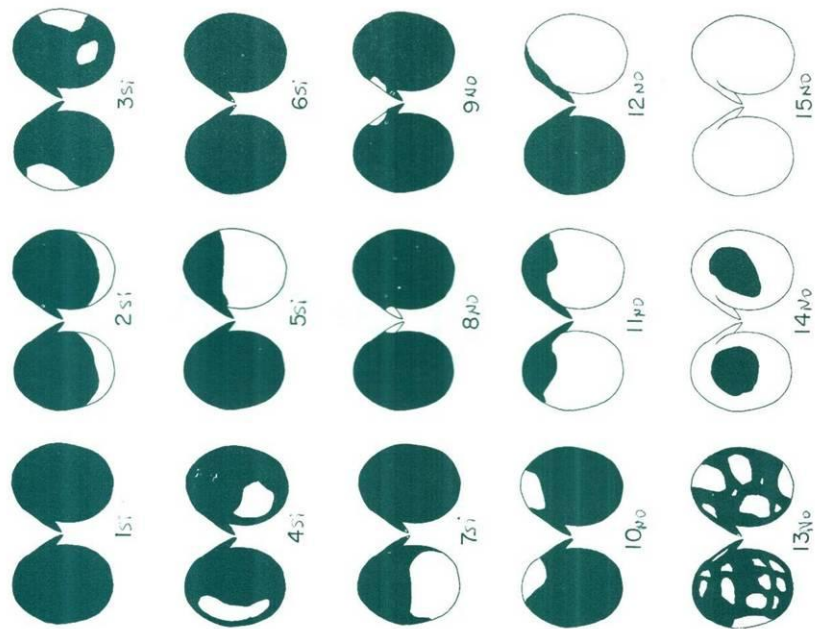
Raphanus sativus



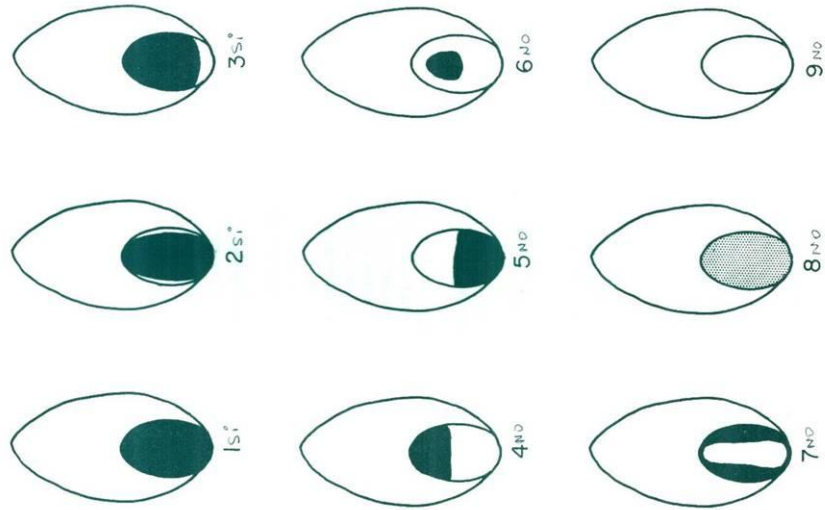
Trifolium incarnatum



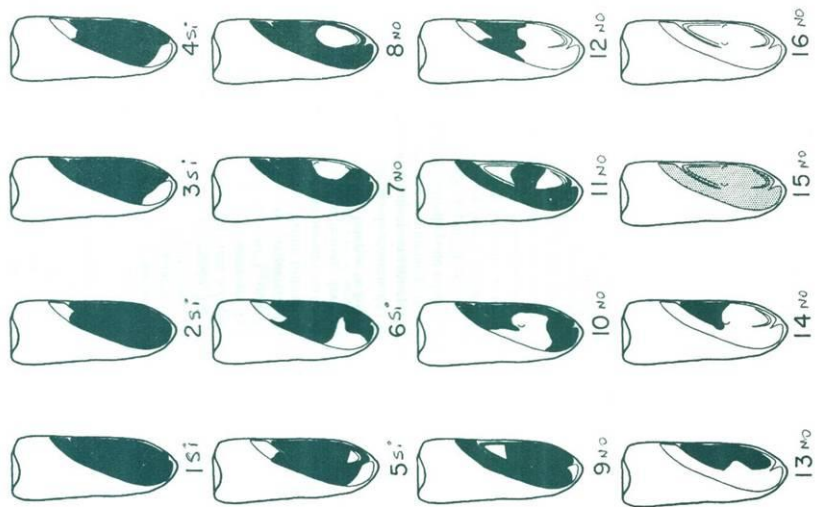
Vicia villosa



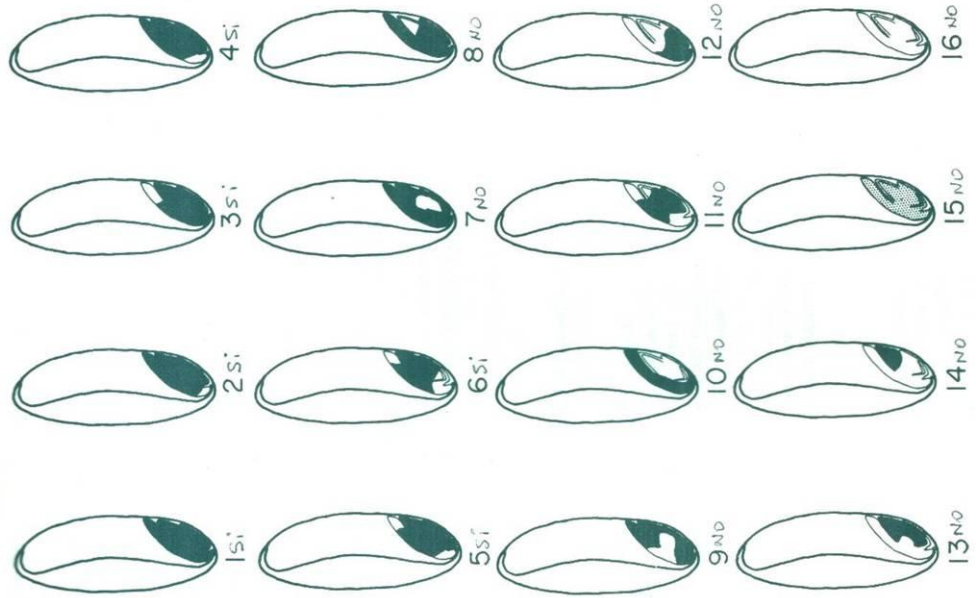
Cynodon dactylon



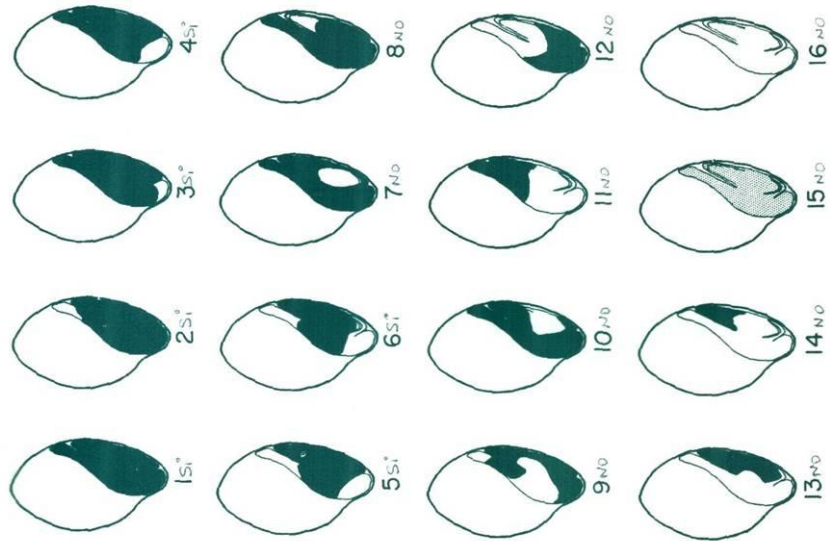
Zea mays



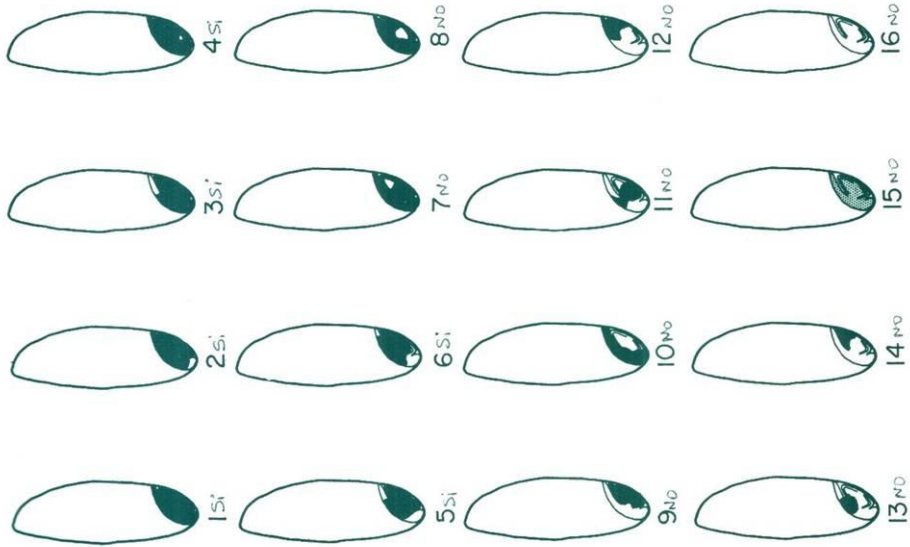
Triticum sp.



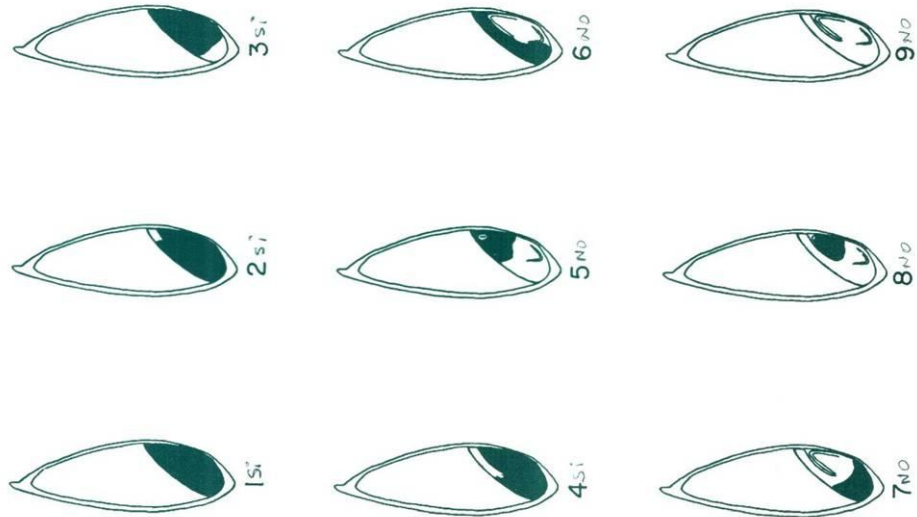
Sorghum sp.



Orvza sativa



Paspalum notatum



* Reproducido de James C. Delouche, T. W. Still, M. Raspetand y M. Lienhard. "The Tetrazolium Test for Seed Viability". Tec. Bull. - Nov. 1962 - Mississippi State Univ.

CULTIVO "in vitro"

CULTIVO "in vitro" DE CÉLULAS Y TEJIDOS. MERISTEMAS APICALES

Objetivo

Cultivar "in vitro" una célula o grupo de células, consiste en aislar el material predeterminado de la planta madre y ponerlo en un recipiente, en general de vidrio, con un medio nutritivo adecuado, condiciones de luz y temperatura controladas para que, inducida en el tejido la totipotencia, desarrolle un callo (acúmulo no uniforme de células), el que originará una planta completa o parte de ella (raíces, tallos).

El objetivo primordial es la obtención de una población de respuesta uniforme y óptima, ya que solamente se propagan los mejores individuos, o aquellos que poseen una característica valiosa. Uniformidad en la calidad de la madera, forma del fuste, sabor de la infusión (caso del té), tamaño, color, y sabor del fruto. Se obtiene un cultivo "clonal" y se estandariza el producto. Los mayores inconvenientes son que las respuestas al estrés, al frío, a las enfermedades, también son más uniformes, de forma que cuando surge un inconveniente, toda la población clonal lo acusa de forma marcada.

En nuestro práctico nos limitaremos al cultivo de meristemas.

Materiales

Todos los reactivos para formar las sales minerales de Murashige y Skoog (referirse al práctico de "Carencias de elementos minerales en las plantas"), tiamina·HCl, piridoxina·HCl, ácido pantoténico, extracto de malta, inositol, ácido indol acético, agar-agar, sacarosa. Lavandina comercial, alcohol de 96°. Autoclave y cámara de flujo laminar, tubos de ensayo, tapones, gradillas.

Procedimiento

Preparar el medio de cultivo de la siguiente forma.

Tomar las cinco soluciones de la formulación inorgánica de Murashige y Skoog, y pipetear a un erlenmeyer de 1.000 ml de capacidad, al que se ha vertido en su interior un poco de agua, 10 ml de cada una de las soluciones stock (el agua evita que las soluciones de sales muy concentradas, interactúen entre sí, y se formen precipitados insolubles).

Añadir 2 mg de tiamina·HCl, 2 mg de piridoxina·HCl, 5 mg de extracto de malta, 1 mg de inositol, 0.5 mg de ácido pantoténico y 0.2 mg de ácido indol acético (AIA). Aforar a 900 ml con una probeta. Ajustar el pH de la solución a 5.5. Añadir 30 g de sacarosa, volver a aforar a 1.000 ml, colocar en el erlenmeyer original y añadir 10 g de agar-agar. Tapar con papel de aluminio y disolver el agar en la autoclave o al fuego. Una vez disuelto,

distribuir en tubos de ensayo, tapar, y esterilizar en autoclave (junto con placas de Petri y agua destilada) a 120°C durante 20 minutos.

Mientras tanto, preparar el material a propagar, que en este caso consistirá en meristemas de *Citrus* spp. Se desnudan los ápices seleccionados en el huerto, dejando aproximadamente 3 cm de tallo y los 2 ó 3 primordios foliares cerca de la yema terminal, que tiene forma de domo. El material se desinfecta con lavandina comercial al 2% de cloro activo, durante tres minutos. Se introduce ahora en el interior de la cámara de flujo donde se enjuaga con agua estéril varias veces. Después se ubica en una placa de Petri estéril, listo para ser utilizado.

Se toma uno de los ápices, se coloca en una placa de Petri estéril y húmeda, y con ayuda de unas pinzas y escalpelo se procede a separar el meristema (3 a 4 filas de células de la parte superior del domo). Una vez separado se siembra sobre el medio de cultivo que se ha preparado para el caso.

Se tapa el tubo de ensayo, para mantener las condiciones de esterilidad.

La siembra se ubica en una cámara de cultivo, a $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluencia de fotones, y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Observar el cultivo cada cinco días, tomar nota de los tubos contaminados, para poder expresarlo como porcentaje de contaminación, y tomar nota detallada de las transformaciones que va sufriendo el tejido sembrado.

INJERTOS

INJERTOS

Objetivo

Los "injertos" son una forma de propagación agámica de un material, pero cuyo material se propaga sobre un pie o patrón de origen sexual. El injerto se utiliza sobre todo en huertos semilleros y huertos frutales. Presenta dos grandes ventajas:

- a) uniformidad en las copas (uniformidad en frutos y semillas);
- b) eliminación de la fase juvenil del vegetal, con lo que rápidamente produce flores, frutos y semillas.

Se puede injertar de múltiples formas, pero lo importante es que el tejido floemático del pie donde se injerta esté en íntimo contacto con el floema de la yema, o del tejido que se injerta, y que el tejido cambial de ambos no haya sido excesivamente dañado por el corte. Unidos en íntimo contacto los dos tejidos floemáticos, y no excesivamente dañados, el tejido cambial comienza a diferenciarse en vasos de conducción que aseguran la provisión de agua y nutrientes a la yema. Más tarde se forma el callo, que dará consistencia a la unión. Se debe mantener una determinada humedad en el corte para que no se sequen los tejidos, pero evitando la invasión de patógenos.

El injerto entre especies dentro del mismo género es en general posible, pero entre géneros diferentes existen fenómenos de incompatibilidad de tejidos que hacen que el injerto no "prenda", es decir no forme callo de unión. Estas incompatibilidades desaparecen al nivel de células; por ello la fusión de protoplastos como método para superar las incompatibilidades entre tejidos se ve con gran esperanza.

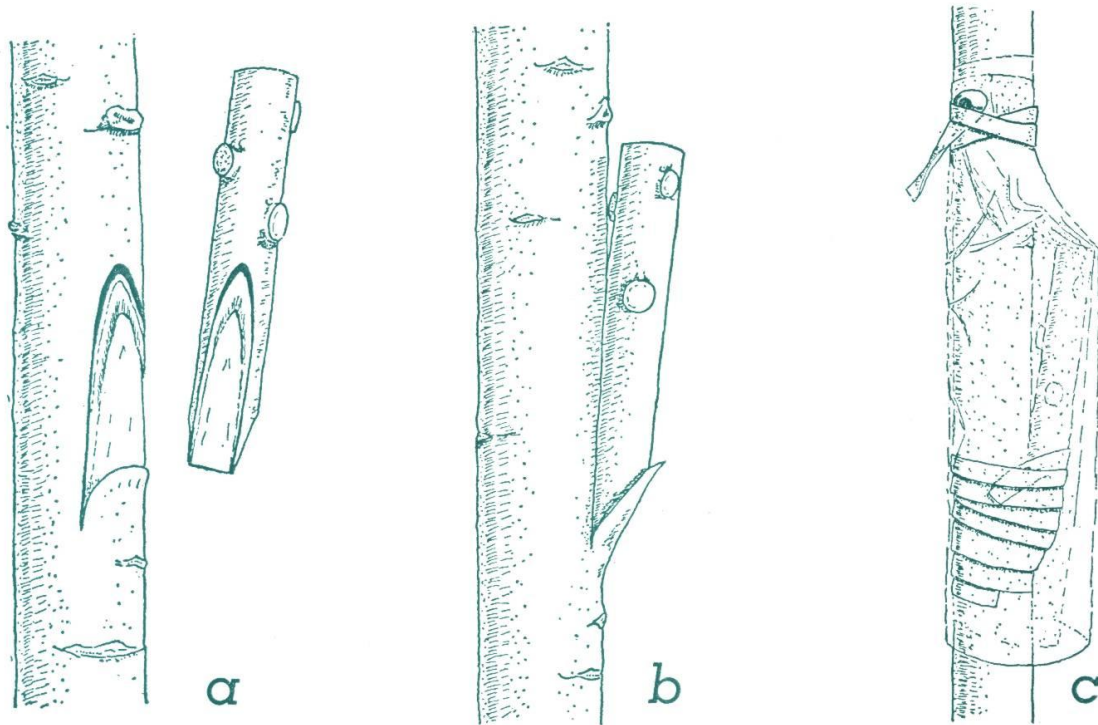
Materiales

Navaja de injertar bien afilada, tiras de material plástico, colofonia, cera de abeja y grasa animal.

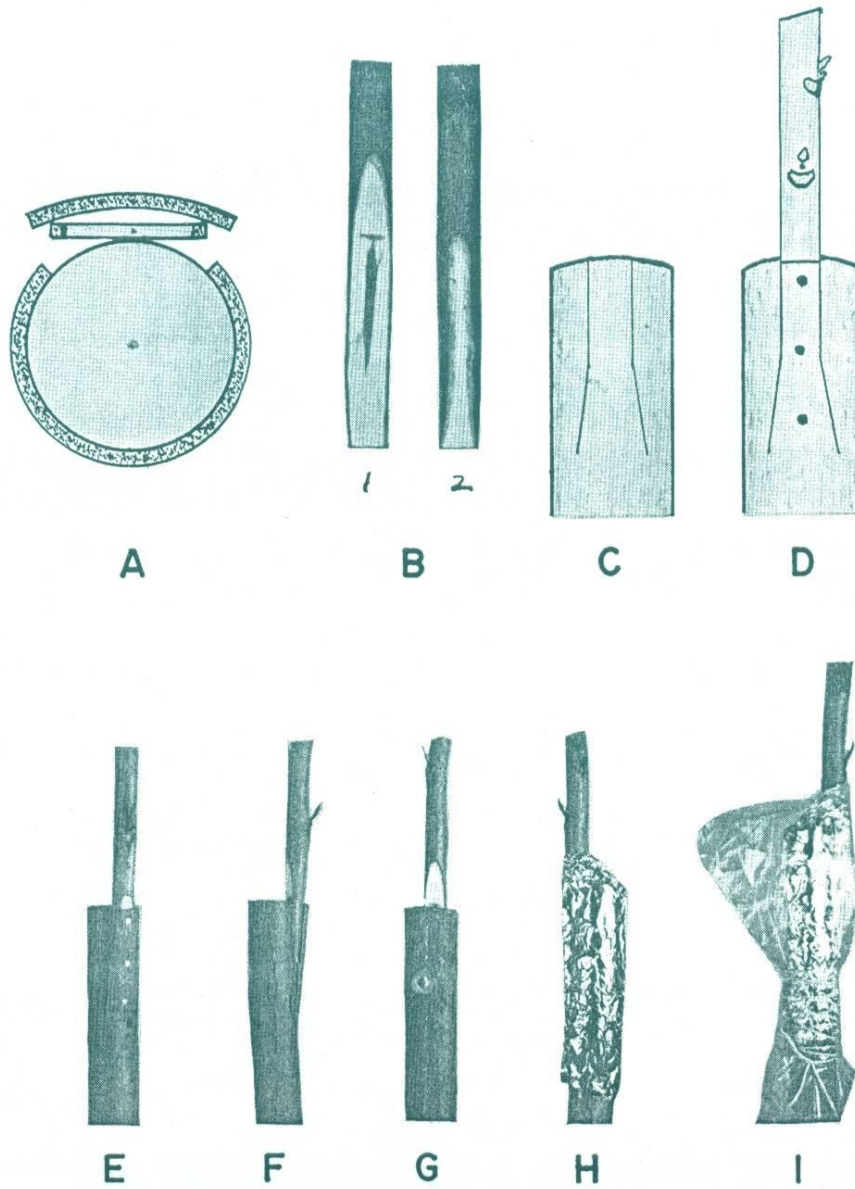
Procedimiento

Los injertos reciben distintos nombres: en T invertida, en escudete, en púa, de placa, atendiendo a la forma de corte en el pie, o cómo se corta la yema. Puede efectuarse en otoño o en primavera. Modernamente se prefiere la época de la primavera debido a que en esa fecha la separación del floema y xilema del pie, por ruptura del cambium, es mucho menos agresiva.

Se recomienda ver láminas y seguir las instrucciones de la clase.



Injertos sobre *Theobroma cacao* L.
de Proc. Am. Soc. for Hort. Sci. Caribbean region. XII Encuentro Anual. Kingston,
Jamaica. Julio 5 - 11, 1965.



Injerto de nuez pecan sobre nuez pecan

ECOLOGÍA FISIOLÓGICA

MEDIDA Y CONTROL DEL MEDIO AMBIENTE

Objetivo

Como una planta está limitada en su hábitat por las condiciones del medio, es obvio que estudios en esta área deben estar dirigidos al conocimiento de las variables que modelan el medio ambiente incluido el suelo.

En este práctico vamos a estudiar tres variables: la humedad del suelo, su temperatura y la intensidad luminosa que incide sobre la vegetación que cubre ese suelo. Al mismo tiempo anotaremos las especies que crecen en el recinto elegido (2 a 3 m²), y la cantidad de ellas.

Este quiere ser un ejemplo de una experiencia real, porque después de haber recogido la información señalada no vamos a saber cómo procesar dicha información o dónde encajarla en nuestro cuerpo lógico de conocimientos. Pero vamos a guardarla, vamos a crear una página abierta, y esperaremos a que reunamos información adicional (en clase de Ecología por ejemplo) para poder ligar los datos con otros datos y/o conceptos. Todos juntos nos brindarán conocimiento valioso sobre algún aspecto de las comunidades vegetales.

Materiales

Fotómetro y comparador ambiental. Probetas y aparato de medida de la humedad (higrómetro) y la temperatura del suelo.

Procedimiento

Ubicar cinco recintos, si es posible naturales, con comunidades vegetales. Los recintos pueden ser de ubicación horizontal o vertical. Estos recintos los diferenciaremos por la intensidad luminosa que llega a ellos. En los cinco casos debe ser diferente y cuanto más marcada la diferencia mejor.

Medir en ellos, después de calibrar los aparatos según las instrucciones, la humedad y la temperatura del sustrato que sustenta a la comunidad vegetal. Medir también la superficie ocupada. No olvidar la intensidad luminosa ya medida.

Reseñar qué especies vegetales encontramos en el lugar y el número de veces que se repiten los individuos. Reseñar el número de individuos totales que sustenta el lugar, y cualquier otro imponderable que surja y que usted crea importante.



Aspectos Interdisciplinarios

MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

La capa superficial del suelo es un universo complejo, donde millones de microorganismos (algas, bacterias, virus, protozoos, nemátodos y hongos) han vivido durante millones de años sus vidas, multiplicándose en su tiempo de regeneración, luchando entre sí por el espacio, el alimento y la supervivencia y, finalmente, muriendo para ser reemplazados por otros. No obstante, al igual que los seres humanos, cada microorganismo ejerce su efecto sobre el universo.

TABLA 1: Microorganismos de un suelo de arcilla fértil a distintas profundidades **

Profundidad (en cm)	Bacterias (por g de suelo)
2.54	4.000.000.000
10.16	3.000.000.000
20.32	2.000.000.000
30.48	1.000.000.000
50.80	500.000.000
76.20	1.000.000
182.88	100

* Se admiten amplias variaciones según la época del año, la edad del cultivo, tipo del cultivo, abonado reciente, etc.

** Extraído de "Microbiología" de Martin Frobisher.

En una tierra buena para la silvicultura, el agua que la moja contiene iones en solución. La clase de iones en solución depende de la composición de las rocas originales, de las prácticas silviculturales, de los abonos, de la flora y fauna micro y macroscópica, y de otros factores. Estos elementos en forma mineral vienen acompañados en el suelo por una diversidad de compuestos orgánicos derivados de la descomposición de los residuos vegetales y animales y de las actividades sintéticas de los microorganismos: hidratos de carbono, oscilando en complejidad desde la glucosa a los almidones, celulosa y polisacáridos gomosos; compuestos nitrogenados que van desde la urea a los aminoácidos y proteínas; grasas; ceras; ácidos orgánicos como el acético; pirimidinas; vitaminas del grupo B y otras; etc.

Dichas sustancias experimentan hidrólisis rápidas y otros cambios complejos. Como consecuencia hay un aumento considerable en la temperatura interna del suelo, en su acidez

debido a la fermentación, en el contenido en CO₂, NH₃, y sales amónicas, y en sustancias alimenticias orgánicas relativamente simples: ácidos grasos, aminoácidos, peptonas, y alcoholes. Todo ello supone un enorme incremento en el número de las formas de vida heterótrofas, así como de las autótrofas facultativas, capaces de crecer en un medio semejante de fermentación activo, ácido, parcialmente aerobio y anaerobio.

Los microorganismos oxidantes consumen rápidamente todo el oxígeno disponible. Las esporas de Clostridium pueden germinar y, tanto los anaerobios estrictos como los facultativos, pueden medrar. Si se extrae todo el aire, como en las ciénagas, arcillas densas y suelos compactos, los procesos fermentativos predominan y el suelo se hace ácido. El avenamiento, la aireación y el abono con cal colaboran a la alcalinidad de tales suelos. Más tarde, los ácidos son metabolizados o neutralizados, se forman hidratos de carbono y la acidez inicial se transforma en alcalinidad, especialmente si el suelo está bien aireado por cultivo y drenaje.

En la comunidad del suelo se destacan como muy prominentes diversos saprófitos mixobacteriales, actinomicetales y hongos superiores que muestran actividad en la descomposición de muchas sustancias resistentes, incluyendo la celulosa, quitina, queratina, lignina, e incluso parafina y caucho vulcanizado.

Los diversos protozoos del suelo convierten gran parte de la materia orgánica en "protoplasma". Una parte principal de su dieta está constituida por bacterias; de este modo los protozoos son la base de una importante relación ecológica de control del suelo. Otro mecanismo de control del suelo es ejercido por los bacteriófagos, antibióticos y, probablemente las bacteriocinas.

Infinidad de gusanos, desde nemátodos microscópicos a las grandes lombrices de tierra se alimentan de materia orgánica. La digieren con ayuda de sus propios enzimas y bacterias intestinales y la devuelven en parte a la tierra en forma de sustancias más simples y solubles. De modo semejante los animales de madriguera y las larvas de los insectos colaboran en la transformación de la materia orgánica del suelo.

Esta breve descripción de la relación que existe entre la fertilidad del suelo y la presencia de microorganismos en él, es para indicar la conveniencia, en ciertos casos para un fisiólogo, de la determinación de los microorganismos presentes en el suelo, sobre todo de aquellos en los que existe una relación directa entre el microorganismo y el elemento mineral.

Lo que sigue son una serie de protocolos que servirán al fisiólogo para detectar la presencia de microorganismos así como de algunas carencias eventuales de elementos minerales que puedan existir en el suelo (por ej. P y Ca).

MEDIOS DE CULTIVO MÁS FRECUENTES EN MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

Solución de oligoelementos

Molibdato potásico	0.05 g
Borato sódico	0.05 g
Cloruro férrico	1 gota
Nitrato de cobalto	0.05 g
Sulfato de cadmio	0.05 g
Sulfato de cobre	0.05 g
Sulfato de zinc	0.05 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Agua destilada	1000 ml

Tierra mojada

- 1.- Pesar aproximadamente 100 g de tierra problema.
- 2.- Añadir en una proporción definida, según el caso, la sustancia energética necesaria (manita, glucosa, maltosa etc.).
- 3.- Agregar agua en cantidad suficiente para formar una pasta espesa.
- 4.-
 - a) Para trabajar con aerobios:
 - 1) Repartir en placas Petri, ocupando solo la mitad de la profundidad.
 - 2) Alisar la superficie con un portaobjetos.
 - 3) Colocar las placas sin cubierta en la estufa a 26°C dentro de otra placa mayor que contenga un poco de agua y tapar el conjunto.
 - b) Para trabajar con anaerobios:
 - 1) Llenar con la pasta de tierra 9 cm de profundidad de las placas de Borrel.

Extracto de tierra

- 1.- pesar 100 g de tierra;
- 2.- añadir igual cantidad de agua;
- 3.- dejar macerar durante 24 horas;
- 4.- llevar a autoclave una hora a 130°C;
- 5.- dejar decantar y filtrar sobre papel;
- 6.- ajustar a pH 7;
- 7.- repartir en tubos y esterilizar a 115°C durante 20 minutos.

Agar extracto de tierra

- 1.- agregar agar en la proporción de 15% al extracto de tierra;
- 2.- fundir en autoclave;
- 3.- filtrar sobre papel;
- 4.- ajustar a pH = 7;
- 5.- esterilizar a 115°C durante 12 minutos.

Solución salina estándar

Prepárese la solución siguiente: 5 g de Fosfato bipotásico, 2,5 g de Sulfato magnésico, 2,5 g de Cloruro sódico, 0,05 g de Sulfato férrico, 0,05 g de Sulfato de manganeso.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA MICROFLORA TOTAL DE UN SUELO

Materiales

Tierra problema, 10 portaobjetos, 4 tubos de ensayo, 1 vaso de precipitado, 1 pipeta de 1 ml, eritrosina, ácido fénico.

Preparación de la solución de eritrosina: Eritrosina extra: 10 g; ácido fénico: 50 g; agua: 950 ml.

Procedimiento

Estudio microscópico directo

- 1.- Hacer una dilución 1/10 de la tierra problema.
- 2.- Homogeneizar bien la dilución.
- 3.- Tomar una gota de la dilución y depositarla sobre el portaobjetos.
- 4.- Secar, fijar, teñir con eritrosina durante 20 minutos, lavar, secar y observar al microscopio.

Método del porta enterrado

- 1.- Preparar tierra mojada.
- 2.- Colocarla en un vaso de precipitado de 20 ml.
- 3.- Introducir un portaobjetos.
- 4.- Tapar el vaso con papel de filtro previamente humedecido.
- 5.- Llevar a estufa a 28°C durante 4 a 6 días.
- 6.- Retirar el portaobjetos del vaso de precipitado.
- 7.- Lavar con cuidado.
- 8.- Fijar al calor, teñir con eritrosina, secar y observar al microscopio.

FIJADORES SIMBIÓNTICOS DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE *RHIZOBIUM* A PARTIR DE NÓDULOS

Materiales

Cristalizadores, pinza estéril, portaobjetos, pipeta Pasteur, 10 tubos de ensayo, cloruro mercúrico, nódulos.

Preparación del medio de cultivo: 2 g de Cloruro sódico, 0.5 g de Fosfato dipitásico, 0.2 g de Sulfato magnésico, 0.1 g de Carbonato cálcico, 10 g de Manitol, 10 g de Agar, 100 g de Agua de levadura, 900 g de Agua.

Procedimiento

- 1.- Lavar el nódulo con agua para arrastrar las partículas de suelo adheridas a él.
 - 2.- Introducirlo en un baño de cloruro de mercurio al 1% durante un tiempo de 1 a 5 minutos según el grosor del nódulo y estado de su superficie.
 - 3.- Sacarlo con unas pinzas estériles y llevarlo a un baño de agua estéril durante 1 hora.
 - 4.- Cambiarlo a un segundo baño de agua estéril y mantenerlo durante otra hora.
 - 5.- Colocar el nódulo sobre un portaobjetos estéril.
- Nódulo grande: puncionar el nódulo y extraer una gota con una pipeta Pasteur de extremidad muy fina.
- Nódulo pequeño: aplastar el nódulo sobre el portaobjetos estéril con otro portaobjetos estéril. Tomar un poco de líquido tisular con el asa de platino.
- 6.- Sembrar sobre agar inclinado.
 - 7.- Incubar en la estufa durante 24 - 48 horas. Aparecen colonias traslúcidas, viscosas de *Rhizobium*.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE *AZOTOBACTER*

Objetivo

El *Azotobacter* es una bacteria no simbiótica del suelo, que fue descubierta por Beijerinck en 1901 y que es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, que combinado en su estructura, es captado del aire y liberado al suelo en forma de molécula inorgánica (nitratos, nitritos) por los desechos o la muerte de la bacteria.

El *Azotobacter* crece en suelos bien aireados, neutros o ligeramente alcalinos, y se alimenta casi autotróficamente. Sin embargo, requiere sustancias orgánicas como fuente de energía, que provienen de la descomposición de la celulosa, almidones y similares, por otros microorganismos del suelo. Los hidratos de carbono que se añaden al suelo en forma de melaza o desechos de almidón estimulan la acumulación de nitrógeno en el suelo a través del crecimiento del *Azotobacter* y de otros gérmenes no simbióticos que fijan el nitrógeno.

Tenemos pues tres géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno: *Clostridium*, *Azotobacter* y *Rhizobium*. Es de utilidad para un Fisiólogo el determinar si existen en un determinado suelo, y en qué proporción están presentes, ya que ello nos indicará el valor cultural del mismo, y su posible necesidad de inóculo.

Materiales

4 portaobjetos, 12 placas de Petri, pinza de Debrand, cubeta de tinción, mechero, microscopio, 300 g de tierra problema, 3 g de glucosa, 3 g de piruvato sódico, 3 g de manitol, 12 g de carbonato de calcio, 30 g de fosfato dipotásico.

Procedimiento

Examen microscópico directo

Proceder como se indica en la práctica "Microflora total de un suelo. Estudio microscópico directo". En razón del pequeño número de *Azotobacter* presente en el suelo, son difícilmente detectados. Cuando se observan se presentan frecuentemente en forma de pequeños montones y de microcolonias.

Tierra mojada. Técnica de Winogradsky

Tomar los 300 g de tierra problema y mezclarlos con 3 g de piruvato sódico, y 3 g de glucosa (ó 3 g de manitol). El medio así constituido se coloca en placas Petri y se incuba a 28°C.

Las colonias de *Azotobacter* aparecen a los dos o tres días, en forma

de manchas brillantes ligeramente elevadas. A los cuatro días aparecen de color pardo y débilmente escamosas.

Hacer las lecturas al 3° y 6° día.

Estudio de los resultados:

- 1) Colonias confluentes: tierra muy rica en *Azotobacter*.
- 2) Colonias aisladas donde el recuento es fácil: tierra medianamente rica, la riqueza es función del número de colonias.
- 3) Ausencia de colonias: es imposible llegar a una conclusión sin realizar pruebas complementarias.

La ausencia de colonias puede deberse a una ausencia de *Azotobacter* en el suelo, o bien a una carencia de algún elemento mineral indispensable, lo más corriente P ó Ca.

Determinación de una carencia eventual de P o Ca.

Preparar tres lotes de placas Petri con tierra moldeada, de la misma muestra y con la misma sustancia hidrocarbonada que en el apartado B.

Añadir al primer lote carbonato cálcico al 2%, al segundo fosfato dipotásico al 5% y al tercero la misma proporción de uno que del otro.

Incubar a 28°C, y observar los resultados.

Si en el primer lote no hay crecimiento y aparecen en el segundo, nos indica que la carencia era de P. Si es a la inversa la carencia era de Ca. Si en un lote da positivo, pero hay más colonias en las placas del segundo, nos indica que la carencia era parcial. Si el número de colonias es sensiblemente idéntico en las dos placas no hay ninguna carencia. Si no hay crecimiento en ninguno de los lotes nos indica una ausencia de *Azotobacter*.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE *AZOTOBACTER*

Objetivo

Ver el práctico "Análisis cualitativo de *Azotobacter*".

Materiales

Matraz erlenmeyer de 100 ml y de 500 ml, 25 tubos de ensayo, 6 pipetas estériles de 1 ml, 2 gradillas, 1 pipeta de 10 ml, tierra problema, glucosa, fosfato dipotásico, sulfato magnésico, cloruro sódico, sulfato férrico, sulfato de manganeso.

Preparación del medio de cultivo: 10 g de Glucosa, 1.000 ml de solución salina estándar al 1/20.

Procedimiento

Repartir 10 ml del medio de cultivo por tubo de ensayo. Tapar con algodón y esterilizar a 120°C durante 20 minutos en autoclave.

Pesar exactamente 5 g de tierra, añadir 45 ml de agua estéril, y agitar para formar una suspensión lo más homogénea posible. A partir de esta dilución 10^{-1} hacer diluciones hasta 10^{-5} siguiendo la técnica habitual. Por cada dilución, sembrar en cinco tubos, con 0.2 ml por tubo de ensayo, con pipeta estéril, e incubar a 30°C.

Lectura de resultados

Para la lectura de los resultados se utiliza el método de McCrady, determinación del número característico y utilización de la Tabla.

Para la determinación del número característico, observar el número de tubos donde ha habido crecimiento, es decir que presentan en su superficie un velo de *Azotobacter*. Supongamos que los resultados son los siguientes:

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Nº de tubos positivos	5	5	3	2	0

La última dilución donde todos los tubos son positivos es 10^{-2} , 5 es la primera cifra del número característico, las dos siguientes son las correspondientes a las dos diluciones siguientes: 3 y 2. El número característico es 532. Se traslada a la tabla de McCrady, y se encuentra el número correspondiente que es 14.

Eso quiere decir que en 0.2 ml de la suspensión al 10^{-2} el número probable de gérmenes susceptibles de desarrollarse en igualdad de condiciones es 14. De donde se puede decir que la suspensión contiene:

$$14 \times 5 \times 100 = 7\,000 \text{ gérmenes por gramo de tierra}$$

Tabla de McCRADY

Número de tubos sembrados: cinco

Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

FIJADORES ANAERÓBICOS DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO GÉNERO *CLOSTRIDIUM*

Objetivo

El género *Clostridium* es un amplio grupo que comprende casi 100 "especies". Todos son bastoncillos anaeróbicos obligados, gram positivos, con esporas. El grupo incluye microorganismos que producen el tétanos, la gangrena gaseosa, y el botulismo, pero la mayoría son saprófitos inofensivos y valiosos. Muchos producen enzimas, productos químicos y fermentaciones industriales de gran valor. Todos están presentes en el suelo, y ampliamente distribuidos en él.

Una propiedad interesante de algunos de estos microorganismos es que pueden fijar nitrógeno atmosférico y utilizarlo en la síntesis de biomoléculas, el que posteriormente es liberado y utilizado por los vegetales cuando mueren las bacterias.

Materiales

2 placas de Petri, 1 tamiz, 1 cámara de anaerobios, tierra problema, carbonato cálcico, fosfato dipotásico, sulfato magnésico, cloruro sódico, sulfato de magnesio, glucosa.

Procedimiento

Impregnar dos placas de silica-gel con la solución salina estándar (ver práctico general de medios de cultivo para microorganismos del suelo) adicionada con 0.5% de carbonato cálcico, a razón de 2 ml por placa.

Cuando las placas estén secas espolvorear, a través de un fino tamiz, uniformemente con 0.25 g de glucosa por placa. Esterilizar a la luz ultravioleta durante una hora.

Sembrar cada placa con 25 granitos de tierra problema. Llevarlo a la cámara de anaerobios, e incubar a 28°C durante ocho días.

Se observa que algunos o todos los granos tienen a su alrededor una colonia más o menos hialina, algunas veces hinchada con aspecto de coliflor, y que la placa desprende un olor a butírico.

Se cuentan los granos positivos, lo que nos da una idea aproximada de la riqueza en *Clostridium*s fijadores.

PRESENCIA DE *ACTINOMICETOS* EN EL SUELO

Objetivo

El orden de las Actinomicetales comprende unas bacterias semejantes a los mohos, ya que presentan verdadera ramificación, formando un micelio vegetativo, muy ramificado en algunas familias.

Son agentes causales de enfermedades humanas como la tuberculosis y la lepra, de enfermedades en los vegetales como la roya de la papa, pero también algunas familias están compuestas por individuos saprófitos que descomponen activamente una gran variedad de materiales orgánicos, algunos muy complejos. Aumentan por lo tanto la fertilidad del suelo. Son aerobias, les gustan los suelos bien drenados y necesitan un pH de 8 ó 9 para crecer activamente.

Algunas especies del género *Nocardia* que viven en el suelo son saprófitas, y destructoras de materiales tan complejos como la celulosa, proteínas, polisacáridos, lípidos, parafinas, fenol, naftaleno, caucho y cresol que utilizan como fuentes de energía y carbono.

Materiales

Matraz erlenmeyer de 500 ml, 8 tubos de ensayo, 20 placas de Petri, 9 pipetas estériles de 1 ml, 1 gradilla, tierra problema.

Preparación del medio de cultivo: 10 g de Glucosa, 0.5 g de asparraguina, 0.5 g de fosfato dipotásico, 15 g de agar, 1.000 ml de agua.

Procedimiento

Ajustar el medio de cultivo a pH = 7.0, esterilizar a 120°C durante 20 minutos en autoclave.

Hacer diluciones de tierra desde 10^{-5} hasta 10^{-8} . Sembrar con la técnica habitual, por dilución, cinco placas de Petri. Añadir el medio anteriormente preparado fundido a 45°C. Incubar a 28°C durante cinco días.

Observar la presencia del micelio, sobresaliente o no, con el microscopio.

PODER AMONIFICANTE DE LOS SUELOS

Objetivo

Si todo el nitrógeno fijado permaneciera unido a la materia orgánica, los llamados abonos (esqueletos de animales, pescados, estiércol, guano, urea, etc.) no podrían ser "abonos", no podrían aprovecharse para la agricultura. La única forma de nitrógeno aprovechable por los organismos vivos sería el poco amoniacado producido por la luz. Todos las formas de vida no fijadoras de nitrógeno deberían esperar la lenta actividad de los organismos nitrificantes y fijadores del nitrógeno, para obtener nitrógeno adecuadamente combinado. Pero no es este el caso. Tan pronto como un organismo muere, comienza a sufrir la descomposición biológica, liberando el nitrógeno contenido en sus estructuras.

Las proteínas y otros compuestos nitrogenados se hidrolizan en aminoácidos, los que mediante algunos microorganismos son desintegrados en compuestos más sencillos, y los grupos amino ($-NH_2$), se liberan en forma de amoniacado (NH_3).

En este práctico vamos a determinar el poder amonificante de un suelo, es decir la cantidad de microorganismos en el suelo que pueden producir la amonificación.

Materiales

24 tubos de hemólisis, 24 tubos de ensayo, 1 gradilla de hemólisis, 1 gradilla, 1 pipeta de 10 ml, de 1 ml, 1 probeta de 250 ml, 1 matraz erlenmeyer de 300 ml. Solución salina estándar, solución de oligoelementos (referirse al práctico de medios de cultivo), asparraguina, yoduro mercúrico, yoduro potásico, hidróxido potásico, tierra problema.

Procedimiento

Preparación del reactivo de Nessler: Solución A = 50 g de yoduro mercúrico y 36.5 g de yoduro potásico. Triturar en mortero y añadir poco a poco 1.000 ml de agua destilada. Solución B = 150 g de hidróxido potásico diluido en 1.000 ml de agua destilada.

Mezclar las soluciones A y B, dejar reposar un tiempo antes de usar. Otra forma de preparar el reactivo de Nessler se encontrará en la guía práctica correspondiente a la determinación de nitrógeno.

Prepárese 250 ml del siguiente medio: 1.000 ml de solución salina estándar al 1/20, 1 ml de solución de oligoelementos, 0.2 g de asparraguina.

Repartir el medio en tubos a razón de 10 ml por tubo. Esterilizar a 120° durante 20 minutos en autoclave. Preparar una suspensión - dilución de tierra problema desde 10^{-1} a 10^{-8} . Sembrar tres tubos por dilución, a razón de 1 ml por tubo. Incubar a 30°C.

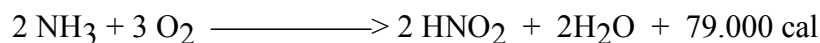
Leer los resultados a los 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12 y 15 días de la siguiente forma: tomar con una pipeta estéril 1 ml de cada tubo, comenzando por la mayor dilución (10^{-8}), y colocarlo en un tubo de hemólisis. Añadir a cada tubo dos gotas del reactivo de Nessler. Se considera que la amonificación se ha producido cuando el tubo toma una coloración amarillo-naranja.

Anotar en cada lectura y en cada dilución el número de tubos positivos. Determinar el número de gérmenes amonificantes por gramo de tierra, utilizando la tabla de McCrady.

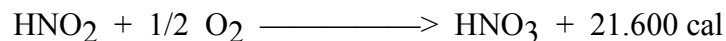
PODER NITRIFICANTE DE UN SUELO

Objetivo

Las *Nitrosomonas* y las *Nitrosocystis* son los géneros representativos de un grupo de bacterias que oxidan el amoníaco a nitritos. Este proceso se denomina nitrosificación. De este proceso las bacterias extraen la energía para su crecimiento.



Bacterias del género *Nitrobacter*, posteriormente continúan con la oxidación del nitrito a nitrato, extrayendo también energía para su crecimiento. Este proceso se denomina nitrificación.



La nitrosificación y la nitrificación se denominan a menudo, conjuntamente, nitrificación.

El nitrógeno en forma de amonio debe ser inmediatamente combinado en el suelo, como sales amónicas y por los organismos nitrificantes, ya que si no se evaporaría hacia la atmósfera, y el ciclo vital lo perdería. Una clase de microorganismos lo oxidan a nitritos. Pero la mayor parte de las plantas superiores no pueden utilizar los nitritos como fuente de nitrógeno; de hecho, los nitritos son tóxicos para muchas plantas y animales. En una segunda fase las *Nitrobacter* oxidan los nitritos a nitratos, en cuya forma es otra vez aprovechable por las plantas.

Sin embargo, los nitratos como fertilizantes presentan un inconveniente: el que son muy solubles y desaparecen rápidamente del suelo.

Materiales

60 tubos de hemólisis, 12 tubos de ensayo, 1 gradilla de hemólisis, 1 gradilla, 1 pipeta de 5 ml y una de 1 ml, 1 probeta de 100 ml, 2 matraces erlenmeyer de 100 ml. Solución salina estándar, sulfato amónico, carbonato cálcico, nitrito sódico, urea, ácido sulfúrico, difenilamina, tierra problema.

Procedimiento

Preparación del reactivo de difenilamina: 10 g de Difenilamina, 1.000 ml de Ác. sulfúrico, 200 ml de agua.

Preparar 50 ml de los siguientes medios de cultivo.

Para nitrosos

1.000 g de Solución salina estándar al 1/20, 0.5 g de Sulfato amónico, 1 g de Carbonato cálcico.

Para nítricos

1.000 g Solución salina estándar al 1/20, 0.5 g Nitrito sódico, 1 g Carbonato cálcico.

Repartir cada medio en tubos de hemólisis a razón de 1 ml por cada tubo. Esterilizar a 120°C, durante 20 minutos. Preparar una suspensión - dilución de tierra problema desde 10^1 a 10^{-6} .

Sembrar cinco tubos por dilución, a razón de 0.5 ml por tubo. Incubar a 30°C durante 15 días. Cada dos días agitar todos los tubos para que se suspenda el carbonato cálcico y obtener de este modo una mejor neutralización de los ácidos.

Lectura de los resultados

a) Para nitrosos: vaciar completamente los tubos de hemólisis de tal modo que no quede más de dos gotas de medio en el tubo.

Agregar seguidamente en cada tubo, 10 gotas de ácido sulfúrico y 10 gotas del reactivo de difenilamina. La presencia de nitritos o nitratos se confirma por la aparición de color azul más o menos intenso.

b) Para nítricos: verter los tubos completamente como en el apartado anterior se ha descrito. Añadir 50 mg de urea y 10 gotas de ácido sulfúrico, en cada tubo, para eliminar los nitritos que queden en el medio.

Seguidamente agregar 10 gotas del reactivo de difenilamina.

Los tubos con nitrato positivos se determinan por la aparición de color azul intenso.

Interpretación: en las series nitrosa y nítrica, anotar los números de tubos positivos por cada dilución. Determinar el número de gérmenes nitrosos y nítricos por gramo de tierra, utilizando la tabla de McCrady.

PODER DESNITRIFICANTE DE UN SUELO

Objetivo

En la desnitrificación, los nitratos son utilizados por los diversos microorganismos del suelo, facultativos y anaerobios, como aceptores de hidrógeno, y son reducidos de nitratos a nitritos, a nitrógeno gaseoso, o a amoníaco, dependiendo del grado de reducción de la especie afectada y de la disponibilidad de oxígeno libre. Es lo opuesto a la nitrificación, y no es un proceso agradable para el agricultor.

Este proceso explica en parte la falta de fertilidad de las tierras constantemente húmedas, que sostienen el crecimiento de especies anaerobias reductoras del nitrógeno como el *Thiobacillus denitrificans* y diversas especies de *Clostridium*.

Materiales

48 tubos de hemólisis, 6 tubos de ensayo, 1 gradilla de hemólisis, 1 gradilla, 1 pipeta de 10 ml y una de 5 ml, 1 probeta de 100 ml, 1 matraz de 300 ml. Solución salina estándar, solución de oligoelementos, nitrato potásico, glucosa, carbonato cálcico, urea, ácido sulfúrico, reactivo de difenilamina, reactivo de Nessler, tierra problema.

Procedimiento

Preparar 100 ml del siguiente medio: 1.000 ml de Solución salina estándar al 1/20, 2 g de Nitrato potásico, 10 g de Glucosa, 5 g de Carbonato cálcico, 1 g de Sol. de oligoelementos.

Repartir el medio en los tubos de hemólisis a razón de 1 ml por tubo. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos en autoclave. Preparar una suspensión - dilución de tierra problema desde 10^{-1} a 10^{-6} . Sembrar 8 tubos por dilución a razón de 0.5 ml por tubo. Incubar a 30°C. Leer los resultados a los 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 13 días.

Tomar cada día un tubo de cada dilución. Repartir su contenido aproximadamente en tres tubos de hemólisis e investigar presencia de nitratos (en el primer tubo), presencia de nitritos (en el segundo tubo) y presencia de amoníaco (en el tercer tubo) según las técnicas descriptas en los prácticos precedentes.

Lectura de resultados: anotar en cada lectura los tubos positivos de cada dilución. Determinar el número de gérmenes desnitrificantes por gramo de tierra, utilizando la tabla de McCrady.

Valorar la actividad del grupo trazando unas curvas de desaparición de los nitratos en función del tiempo y de la dilución.

PODER PROTEOLÍTICO DE UN SUELO

Objetivo

La mayor parte de las especies del género *Bacillus* y algunos *Aspergillus*, son productores activos y versátiles de enzimas hidrolizantes, y por lo tanto pueden utilizar como fuente de alimento una gran variedad de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, glucósidos, alcoholes y ácidos orgánicos. En consecuencia, son grandes destructores de materia orgánica, por lo que su presencia en el suelo no dará una indicación de la fertilidad de este.

Materiales

24 tubos de hemólisis, 8 tubos de ensayo, 1 gradilla para hemólisis, 1 gradilla, 1 pipeta de 5 ml y una de 1 ml, 1 probeta de 100 ml y 1 matraz de 200 ml. Solución salina estándar, solución de oligoelementos, gelatina, tierra problema.

Procedimiento

Preparar 100 ml del siguiente medio: 1.000 ml de Solución salina estándar al 1/20, 30 g de Gelatina, 1 ml de Solución de oligoelementos. Fundir la gelatina al calor y ajustar a pH 7.2.

Repartir el medio en tubos de hemólisis a razón de 2 ml por tubo. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos en autoclave. Preparar una suspensión - dilución de tierra desde 10^{-1} a 10^{-8} . Sembrar tres tubos por dilución, a razón de 0.5 ml por tubo. Incubar a 30°C. Leer los resultados a los 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12 y 15 días manteniendo previamente los tubos en heladera durante 90 minutos.

Se considera que la proteolisis se ha producido en los tubos donde el medio es líquido. Devolver después los tubos a la estufa.

Anotar en cada lectura y por cada dilución el número de tubos con medio licuado. Determinar el número de gérmenes proteolíticos por gramo de tierra, utilizando la tabla de McCrady.

PODER AMIOLÍTICO DE UN SUELO

Objetivo

Las consideraciones son las mismas que para el práctico anterior.

Materiales

24 tubos de hemólisis, 34 tubos de ensayo, 1 pipeta de 10 ml , una de 5 ml y 8 de 1 ml, 1 gradilla de hemólisis, 1 gradilla, 1 probeta de 500 ml, 1 matraz erlenmeyer de 500 ml. Solución salina estándar, solución de oligoelementos, extracto de tierra, almidón de arroz, nitrato amónico, yodo, yoduro potásico, tierra problema.

Procedimiento

1.- Solución de yodo - yoduro: 10 g de Yodo, 25 g de Yoduro potásico, 1000 ml de Agua destilada

2.- Preparar 300 ml del siguiente medio de cultivo: 50 ml de Solución salina estándar, 10 ml de Extracto de tierra, 1.5 g de Almidón de arroz, 1 g de Nitrato amónico, 1 ml de Solución de oligoelementos, Agua destilada hasta 1.000 ml.

Repartir el medio en tubos a razón de 10 ml por tubo. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos en autoclave. Preparar una suspensión - dilución de tierra problema desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . Sembrar tres tubos por dilución a razón de 1 ml por tubo. Incubar a 28°C.

Leer los resultados a los 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12 y 15 días de la siguiente forma: tomar en forma estéril 1 ml de cada tubo comenzando por la dilución mayor (10^{-8}), y colocarlo en un tubo de hemólisis. Añadir una gota de solución de yodo-yoduro, e inmediatamente 2 ó 3 ml de agua. Se considera que la amilolisis se ha producido en los tubos que toman una coloración amarilla muy débil. La amilolisis es negativa en los tubos con coloración del azul al violeta.

Anotar en cada lectura el número de tubos positivos por dilución. Determinar el número de gérmenes utilizando la tabla de McCrady. Valorar la actividad del grupo trazando una curva de desaparición del almidón en función del tiempo y la dilución.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Química Biológica

1. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*. Wiley, 1990.
2. Lehninger, A. L. *Biochemistry* (2nd ed.) Worth Pub., 1975.
3. Stryer, L. *Biochemistry* (3rd ed.) Freeman, 1988.
4. Devlin, T. M. (Ed.) *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 1986.
5. White, A.; Handler, P.; Smith, E. L. *Principles of Biochemistry*. Mc Graw Hill, 1978.
6. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principles of Biochemistry* (2nd Ed.) Worth Publishers, 1992.
7. Budecke, E. *Elementos de Bioquímica*. Omega S.A. Barcelona, 1983.
8. Villavicencio Nuñez, M. *Bioquímica*. Concytec, Lima, 1996.
9. Bonner, J.; Varner, J. E. *Plant Biochemistry*. Academic Press, 1965.
10. Villar Palasi, V.; Santos Ruiz, A. *Tratado de Bioquímica*. Augusta Ed., Barcelona, 1968.
11. Azcon-Bieto, J.; Talon, M. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana, McGraw Hill. 1996.
12. Plummer, D. T. *Introducción a la Bioquímica Práctica*. Mc Graw Hill, 1981.
13. Kozlowski, T. T. *Seed Biology*. Academia Press. 1972.
14. Barret, G. C. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids*. Chapman and Hall. 1985.
15. Blackburn, S. *Amino Acid Determination*. Dekker, Nueva York. 1968.
16. Bailey, J. L. *Techniques in Protein Chemistry*. (2nd Ed). American Elsevier, Nueva York, 1967.
17. Burdon, R. H.; Van Knippenberg, P. H. (Eds.) *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 17, Elsevier, 1987.
18. Work, T. S.; Burdon R. H. (Eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. I, North Holland Biomedical Press, 1980.
19. Work T. S.; Work, E. (Eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 7, North Holland, 1979.
20. Work, T. S.; Burdon R. H. (Eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 11, Elsevier, 1983.
21. Boyer, P. D. (Ed.) *The Enzymes* (3rd Ed.) Vol. 16, Academic Press. 1983.
22. Boyer P. D.; Krebs, E. G. *The Enzymes* (3rd Ed.). Vol.18. Academic Press, 1987.

Fisiología Vegetal

1. Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology* (2nd Ed.), Sinauer Associated Inc., 1998.
2. Salisbury, F. B.; Ross, C. W. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericano. 1994
3. Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Soc. of Plant Physiologist. 2000.

4. Anderson, S. (Ed.) *Biology of Plants*. W.H. Freeman and Company. 1999.
5. Larcher, W. *Ecofisiología Vegetal*. RiMa Artes e Textos. 2000.
6. Steward, F. C. *Plant Physiology. A treatise*. Academic Press. 1972.
7. IA. *Cellular organization and respiration*.
8. IB. *Photosynthesis and Chemosynthesis*.
 - VA. *Analysis of growth: Behavior of plants and their organs*.
 - VB. *Analysis of growth: The response of cells and tissues in culture*.
 - VIA. *Physiology of development: Plants and their reproduction*.
 - VIB. *Physiology of development: The hormones*.
 - VIC. *Physiology of development: From seeds to sexuality*.
9. Bastin, R. *Fisiología Vegetal*. C.E.C.S.A. 1970.
10. Steward, F. C. *Plants at Work*. Addison Wesley. 1964.
11. Barceló-Coll, J.; Nicolás Rodrigo, G.; Sabater García, B.; Sanchez Tames, R. Ediciones Pirámide, 1983.
12. Leopold, A. C.; Kriedemann, P. E. *Plant Growth and Development*. Mc Graw Hill. 1975.
13. Chapman, H. D.; Pratt, P. F. *Methods of Analysis for Soils Plants and Waters*. Univ. of California. 1962.
14. Rovalo Merino, M.; Rojas Garcidueñas, M. *Fisiología Vegetal Experimental*. Limusa. 1982.
15. Larqué-Saavedra, A. *Fisiología Vegetal Experimental. El agua en la planta*. Chapingo, México. 1980.
16. Roberts, J.; Whitehouse, D. C. *Practical Plant Physiology*. Engman, Londres. 1976.
17. Ross, C. W. *Plant Physiology laboratory manual*. Wadsworth, Belmont. 1974.
18. Delouche, J. C.; Wayne Still, T.; Raspet, M.; Lienhard, M. *The Tetrazolium Test for Seed Viability*. Technical Bulletin 51. Mississippi State Univ. 1962.

Aspectos interdisciplinarios

1. Hernandez, E. *Prácticas de Laboratorio*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Cátedra de Microbiología. 1970.
2. Becker, J. M.; Caldwell, G. A.; Zachgo, E. A. *Biotechnology, a Laboratory Course*. Academic Press. 1996.



Centro Gráfico de la
Editorial Universitaria

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
Impreso en el mes de abril de 2008
San Luis 1870
Posadas, Misiones
centrografico@argentina.com