

BIOQUIMICA I

Tema 4.10 Métodos de  
purificación e identificación

4.11 Digestión de  
carbohidratos

ALUMNA: ANAHÍ GUADALUPE GÓMEZ BONIFAZ

DOCENTE: ALEJANDRA GUADALUPE ALCÁZAR RAMOS

# TEMA 4.10 MÉTODOS DE SEPARACION E IDENTIFICACIÓN

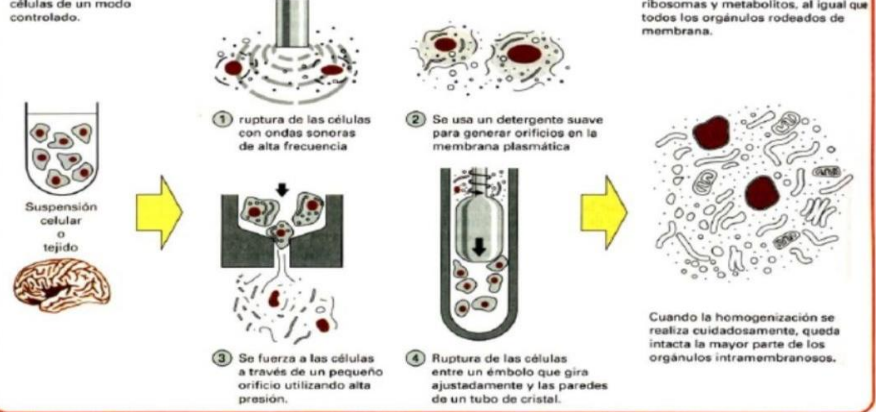
- ▶ En las células se encuentran miles de proteínas. Todas están constituidas por secuencias de solamente 20 aminoácidos, aunque biológicamente tienen funciones extraordinariamente diferentes, químicamente son muy semejantes. Sin embargo, si un bioquímico está interesado en estudiar las características y función de una sola proteína lo más probable es que tenga que purificarla de todas las demás. Esto, hasta hace muy pocos años, constituía un reto muy grande, pues la separación y purificación de compuestos por los métodos químicos tradicionales implicaba metodologías para distinguir diferencias físicas y/o químicas entre una sustancia y otra para poder separarlas. Los laboratorios actuales disponen de métodos muy poderosos para purificar una proteína en muy poco tiempo; anteriormente el tiempo requerido se medía en meses y hasta en años, ahora pueden ser días o semanas. El propósito de esta sección es estudiar algunos de los métodos más empleados para purificar proteínas.

### ROMPIENDO CÉLULAS Y TEJIDOS

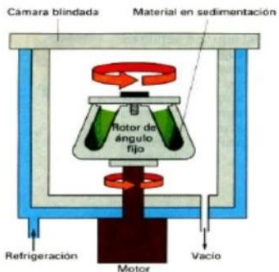
La primera etapa en la purificación de la mayor parte de las proteínas es romper los tejidos y las células de un modo controlado.

Utilizando procedimientos mecánicos suaves, denominados de homogenización, las membranas plasmáticas de las células pueden romperse de modo que liberan su contenido. Aquí se muestran cuatro procedimientos empleados comúnmente.

El caldo espeso resultante (denominado homogenizado o extracto) contiene moléculas grandes y pequeñas del citosol, como enzimas ribosomas y metabolitos, al igual que todos los orgánulos rodeados de membranas.



### CENTRIFUGACIÓN



La centrifugación es el procedimiento más utilizado para separar un homogenizado en diferentes partes o fracciones. El homogenizado se coloca en tubos de ensayo y se rota a altas velocidades en una centrífuga o en una ultracentrífuga. En la actualidad las ultracentrífugas rotan a velocidades hasta de 100 000 revoluciones por minuto y producen enormes fuerzas, incluso de 600 000 veces la fuerza de la gravedad.



Tales velocidades requieren que las cámaras centrifugas estén refrigeradas y sujetas a vacío de modo tal que la fricción no eleve la temperatura del homogenizado. La centrífuga está rodeada por un grueso blindaje metálico, ya que un rotor fuera de su punto de equilibrio puede romperse y liberar energía en forma explosiva. Un rotor de ángulo fijo puede sostener volúmenes más grandes que un rotor de brazo oscilante, pero se forma un precipitado menos uniforme.

EL TRABAJO DE PURIFICACIÓN DE UN COMPUESTO, QUE SE ENCUENTRE DENTRO DE UN TEJIDO U ÓRGANO, SE INICIA CON ALGÚN MÉTODO DE MACERACIÓN, PARA ROMPER LAS CÉLULAS Y DEJAR LIBRE EL CONTENIDO, SUSPENDIDO EN ALGÚN LÍQUIDO, GENERALMENTE SE USA UN BUFFER. ESTO SE LLAMA UN HOMOGENADO. EN EL RECIPIENTE QUE CONTIENE EL HOMOGENADO ESTÁN EN SOLUCIÓN TODOS LOS COMPUESTOS QUE SE ENCUENTRAN EN ESTA FORMA EN EL CITOPLASMA DE LA CÉLULA Y SUSPENDIDOS LOS ORGANELOS INTRACELULARES TALES COMO MITOCONDRIAS, LISOSOMAS O NÚCLEOS Y FRAGMENTOS DE MEMBRANAS. EL HOMOGENADO ES UNA MEZCLA MUY COMPLEJA, POR LO QUE EL SIGUIENTE PASO ES HACER UNA SEPARACIÓN PARCIAL DE SUS COMPONENTES.

# Métodos empleados

- ▶ Un **homogeneizador** es un elemento del equipamiento de laboratorio utilizado para la homogeneización de distintos tipos de materiales, tales como tejidos , plantas, alimentos ,suelo , y muchos otros. En bioquímica los homogeneizadores tratan de disgregar los tejidos y romper las células , con el menor daño a la membrana plasmática. El proceso de rotura celular se puede producir por tres mecanismos:
  - ▶ Fuerzas de cizalladura producidas por líquidos
  - ▶ Fuerzas de cizalladura producidas por sólidos.
  - ▶ Fuerzas producidas por un mecanismo cavitación gaseosa.
- ▶ Métodos químicos y bioquímicos:
  - ▶ Empleo de un medio hipotónico.
  - ▶ Hidrólisis enzimática.



- ▶ La **cromatografía** es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas cuyo objetivo es separar los distintos componentes, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia; en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos dan como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y, por tanto, una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.
- ▶ La cromatografía puede cumplir dos funciones básicas que se excluyen mutuamente:
- ▶ Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente (etapa final de muchas síntesis).
- ▶ Medir la proporción de los componentes de la mezcla (finalidad analítica). En este caso, las cantidades de material empleadas suelen ser muy pequeñas.



► La **centrifugación** del homogenado, permite separar de una forma bastante aceptable los componentes que lo constituyen. El principio de este procedimiento es el de aumentar la fuerza de la gravedad  $g$ , utilizando una centrífuga cuyo rotor gira a muchas revoluciones por minuto. Bajo estas condiciones, las partículas más pesadas se van al fondo del recipiente más rápidamente que las menos pesadas. En un homogenado sometido a las condiciones descritas, se pueden separar, por ejemplo, los núcleos de las mitocondrias, ya que los primeros son más pesados que las segundas, por lo que se va a obtener en el fondo del recipiente una fracción que consta de núcleos mientras que las mitocondrias van a permanecer en la suspensión. Si, en un segundo paso, se centrifuga la fracción que se ha separado de los núcleos a una velocidad mayor que la que se imprimió la primera vez, ahora son las mitocondrias las que van a precipitarse al fondo, quedando en suspensión sólo partículas más pequeñas que ellas, tales como ribosomas y fragmentos de membranas.

► Después de varias centrifugaciones se tienen varias fracciones, las cuales pueden ser, o ricas en núcleos, o en mitocondrias, o ribosomas etc. Si, por ejemplo, la proteína que interesa estudiar está en las mitocondrias, se pueden descartar las otras fracciones y conservar únicamente la que es rica en estos organelos, para trabajar en pasos posteriores de purificación únicamente con esta parte. Las fracciones todavía son muy complejas por lo que respecta al número de moléculas diferentes que contienen, de tal manera que a este nivel todavía se está muy lejos de poder lograr la purificación de algún compuesto.



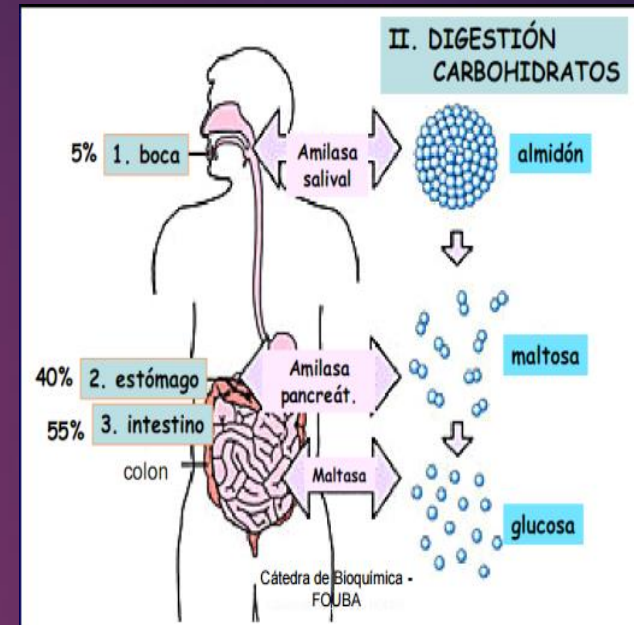
El siguiente paso es separar todas las proteínas de otras moléculas existentes en la mezcla, como por ejemplo metales, carbohidratos o lípidos. Un método consiste en el procedimiento de **diálisis**


- ▶ En la diálisis se usa una bolsa que tenga poros lo suficientemente pequeños para impedir el paso de moléculas grandes (proteínas), pero lo bastante grandes, como para que las moléculas pequeñas puedan pasar a través de ellos. Dentro de la bolsa se coloca alguna fracción del homogenado y se cierra herméticamente. El sistema así construido se pone dentro de un recipiente con agua destilada, que se renueva continuamente. Bajo estas condiciones se tiene una diferencia de concentraciones, entre el líquido del interior de la bolsa y el agua destilada, y como se analizó en el Capítulo 2, va a existir una tendencia a igualar las concentraciones, por lo que las moléculas del interior van a tratar de salir hacia el agua destilada, pero como las moléculas de proteína no pueden pasar por los poros, solamente lo harán las moléculas pequeñas, el transporte de materiales seguirá hasta que se igualen las concentraciones en los dos compartimentos. Si el agua destilada se cambia continuamente, se evitará que se llegue al equilibrio, de tal manera que seguirán saliendo moléculas pequeñas. Si este proceso continúa, en el interior de la bolsa quedarán únicamente moléculas de proteína. Con este procedimiento se tiene ahora una mezcla de muchas proteínas; el siguiente paso es purificar la que se requiere.

- ▶ Otra forma de separar proteínas con tamaños diferentes, es mediante **la filtración en gel** . En este método se usa un gel hidrófilo, fabricado con un polímero, como por ejemplo el dextrán, que se coloca en un tubo. Este material tiene la propiedad de formar una malla molecular en la que los poros son muy pequeños. En un extremo del tubo se pipetea una solución que contenga la mezcla de proteínas. Las proteínas más pequeñas pueden pasar por los poros del gel y las más grandes no, de tal manera que del otro lado del tubo salen, en primer lugar, las proteínas grandes, las pequeñas se van a retardar debido a que tienen que atravesar toda la malla molecular. Si el líquido que está saliendo de la columna se colecta en diferentes recipientes, éstos llevan diferentes tipos de proteínas.
- ▶ Combinando varios de los métodos que se describen aquí, junto con otros adicionales, es posible obtener en un tubo de ensaye una proteína totalmente pura. Habiendo logrado esto se está listo para estudiarla, en cuanto a su estructura y función.



# TEMA 4.11 DIGESTIÓN DE CARBOHIDRATOS



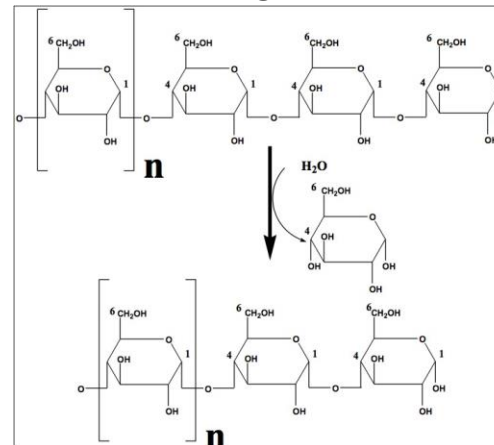


El proceso de la digestión es la degradación enzimática de las moléculas complejas que constituyen a los alimentos, para convertirlas en compuestos más sencillos. Así, las proteínas son convertidas a aminoácidos y los di, oligo y polisacáridos son hidrolizados a monosacáridos. Los productos de la digestión son absorbidos por el intestino delgado e ingresan a la sangre para ser distribuidos a todas las células del organismo.


La celulosa y el almidón son los polisacáridos más abundantes en los alimentos que consumimos. Nuestra dieta también es rica en los disacáridos sacarosa y lactosa por lo que analizaremos cómo son digeridos y absorbidos estos compuestos.

La digestión del almidón se inicia en la boca, durante la masticación, ya que en la saliva se encuentra una hidrolasa, que recibe el nombre de amilasa salival, la cual, introduciendo una molécula de agua, rompe el enlace glucosídico  $\alpha - 1 \rightarrow 4$ , que mantiene unidas a las moléculas de glucosa en el polímero. Cada vez que actúa la enzima se produce una molécula de glucosa libre y almidón, que tiene una unidad menos de las que

► Reacción catalizada por la amilasa salival.




La acción de la amilasa salival dura únicamente mientras los alimentos pasan de la boca hacia el estómago, a través del esófago, debido a que el pH del estómago es muy bajo y el pH óptimo de la amilasa salival es cercano a 7. Por ello la amilasa salival se inactiva al llegar a este órgano.



En el estómago los carbohidratos no sufren ninguna transformación química. Es en el intestino delgado en donde ocurre la mayor parte de la digestión de los carbohidratos, ya que ahí se secretan los fluidos producidos por el páncreas y algunas células de las paredes del intestino, que llevan en solución enzimas específicas para hidrolizar carbohidratos.

El páncreas sintetiza la amilasa pancreática, que actúa de manera idéntica a la salival, pero durante el tiempo suficiente para lograr la degradación total de una molécula de almidón hasta glucosa. Las dos amilasas que se han analizado rompen solamente enlaces glucosídicos  $\alpha - 1 \rightarrow 4$ . En el caso de la amilopectina que tiene ramificaciones  $\alpha - 1 \rightarrow 6$ , se requiere además otra enzima, producida también por el páncreas, que hidroliza estos enlaces para lograr su degradación total hasta glucosa.

La celulosa es otro polímero de glucosa que ingerimos en grandes cantidades pero, **los humanos no poseemos ninguna enzima capaz de degradar los enlaces glucosídicos  $\beta - 1 \rightarrow 4$**  que tienen esta macromolécula, por lo que pasa a lo largo de todo el tracto digestivo sin sufrir modificaciones y es expulsada en las heces fecales. Todos los herbívoros son capaces de degradar a la celulosa gracias a las modificaciones estructurales que tiene su aparato digestivo y a unos protozoarios que habitan, de manera simbiótica, en su intestino. Estos microorganismos producen una celulasa capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$ .



Las responsables de la degradación de los disacáridos son las células de las paredes del intestino delgado, las cuales sintetizan varias **disacaridasas** . Por ejemplo, la **lactasasacarasa** hidroliza a la lactosa, para producir una molécula de galactosa y otra de glucosa. Se obtiene una molécula de sacarosa y otra de glucosa cuando la rompe a la sacarosa. Gracias a la acción de las enzimas que se han mencionado, en el intestino delgado queda una mezcla de monosacáridos provenientes de los carbohidratos complejos. Estas unidades son absorbidas por las células de las paredes intestinales, pasando hacia la sangre y a través del sistema porta - hepático son conducidos hacia el hígado.

Por lo tanto, el hígado recibe una mezcla de monosacáridos. Los más abundantes son glucosa, fructosa y galactosa. Hay que hacer hincapié en que en condiciones normales no ingresan a la sangre carbohidratos complejos.

En el hígado los monosacáridos diferentes a la glucosa son convertidos a este compuesto; la glucosa "nueva" puede seguir dos rutas: ser liberada a la sangre para ser transportada hacia otros tejidos del organismo, o ser almacenada en forma de glucógeno, constituyendo así una reserva de carbonos y de energía que será usada cuando el organismo lo demande y en esos momentos no haya otra fuente de energía disponible.

# PREGUNTAS

- ▶ 1.-¿ Como se le llama al método para romper las células?R.. Maceración
- ▶ 2.-¿ Que nombre recibe el líquido que sirve durante la purificación? R.. Buffer
- ▶ 3.-¿Cuáles son los procesos de rotura celular? R.. Fuerza producida por líquidos, sólidos Y por un mecanismo de cavitación gaseosa
- ▶ 4.-¿Para que sirve la cromatografía? R.. Es un método físico de caracterización de mezclas complejas para la separación de sus componentes
- ▶ 5.-¿ Quiénes son las que participan en la digestión de carbohidratos?R.. Numerosas enzimas
- ▶ 6.-¿Cuáles son los polisacáridos más abundantes en nuestro sistema? R.. La celulosa y el almidón
- ▶ 7.-¿En donde comienza la digestión del almidón? R.. En la boca durante la masticación
- ▶ 8.-¿En que parte del cuerpo humano ocurre la mayor parte de la digestión de carbohidratos? R.. En el intestino delgado