

METABOLOPATIAS RELACIONADAS AL CATABOLISMO DE AMINOACIDOS: AMINOACIDURIAS

Objetivos del Trabajo Práctico

En este trabajo práctico el alumno realizará un conjunto de **pruebas de laboratorio** que le permitirán:

- cuantificar la presencia de aminoácidos en orina
- desalar esta muestra por cromatografía de intercambio iónico, e identificar los aminoácidos presentes en ella por cromatografía bidimensional en capa fina
- orientarse en el diagnóstico de aminoacidurias por medio de una batería de ensayos cualitativos

Introducción

Las enfermedades relacionadas a alteraciones del catabolismo de los aminoácidos son enfermedades genéticas de **carácter autosómico recesivo**, generalmente de baja incidencia en la población. En la **Figura 1** se observa un esquema de las vías catabólicas de los 20 aminoácidos, las cuales convergen para formar 6 productos principales que entran al ciclo del ácido cítrico. Nótese que algunos aminoácidos pueden catabolizarse de distintos modos. En este contexto, se entiende por **metabolopatías** a las enfermedades hereditarias originadas por alteraciones genéticas que ocasionan trastornos metabólicos. En el caso del catabolismo de los aminoácidos, al estar las vías catabólicas relacionadas entre sí, los síntomas clínicos no son específicos de una enfermedad sino de un grupo de ellas.

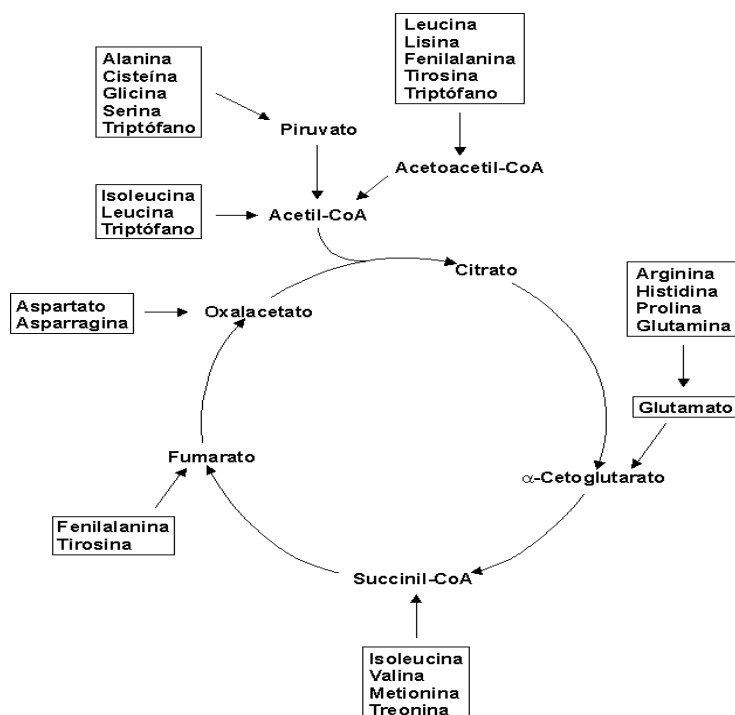


Figura 1. Catabolismo de los aminoácidos y sitios de entrada al ciclo del ácido cítrico.

La gravedad y las consecuencias clínicas de las metabolopatías relacionadas al catabolismo de los aminoácidos están relacionadas con la disminución o ausencia de actividad de una enzima específica, y como consecuencia de ello la no formación del producto final de la cadena; a la posibilidad de que otra vía metabólica alternativa pueda compensar el déficit, o a que el exceso de algún producto intermediario de la cadena resulte tóxico. Como muchas de ellas afectan al sistema nervioso central deben detectarse precozmente.

Los **programas de detección precoz neonatal** son muy eficientes para el diagnóstico de estas patologías. En el año 1986 en la provincia de Tucumán, fue sancionada la ley 5769 que dispone la

obligatoriedad de estos estudios en recién nacidos; en tanto que, la ley nacional 23413 en vigencia desde 1994, reglamenta los exámenes para la detección del hipotiroidismo congénito y de fenilcetonuria. Estos deben ser realizados a partir de las 24 horas del nacimiento y antes del séptimo día de vida para acceder al tratamiento preventivo a través de una dieta. La muestra se toma realizando una punción en el talón del recién nacido y recolectando la sangre en un papel de filtro. Con éste, se realiza el Test de Guthrie, un ensayo semicuantitativo que permite detectar niveles elevados de fenilalanina en sangre, basado en que este aminoácido revierte la inhibición del crecimiento bacteriano producida por la presencia de β -2 tienilalanina en el medio de cultivo. Fenilalanina, el producto final de su vía de síntesis, inhibe a la enzima DAHP sintetasa que participa en el primer paso de la vía. Dado que β -2 tienilalanina es un análogo de fenilalanina, “engaña” a la DAHP sintetasa y actúa inhibiendo a la enzima, provocando la carencia de fenilalanina y por lo tanto afectando la síntesis de proteínas. En una placa de agar que contiene *Bacillus subtilis* y β -2 tienilalanina, se coloca el papel de filtro impregnado con la sangre del paciente. La presencia de una cantidad extra de fenilalanina permitirá el crecimiento bacteriano, y el diámetro de la colonia puede ser comparado con discos de referencia para calcular el contenido de este aminoácido en la sangre del paciente.

Para determinar estos trastornos en recién nacidos y lactantes, los médicos se valen de la exploración física y de la historia familiar. Los síntomas clínicos como encefalopatía, ictericia, hepatomegalia, retraso en el crecimiento, dismorfia facial, olor específico; y los antecedentes de muertes neonatales previas sin causa conocida pueden aportar importante información. Sin embargo, **el diagnóstico definitivo debe ser verificado por las pruebas de laboratorio**, en tanto que la confirmación final puede ser realizada por otros ensayos, como la determinación de la actividad enzimática en cultivos de fibroblastos del paciente.

Finalmente, el conocimiento de la secuencia del genoma humano, y la posibilidad de consultar Bases de Datos de acceso público como **OMIM (On line Mendelian Inheritance in Man)** representan un gran avance para la genética clínica. El resultado de una búsqueda de información de un trastorno en particular en la página www.omim.org consistirá en una descripción de la enfermedad, de sus características clínicas y bioquímicas, de pautas para realizar el diagnóstico y el manejo clínico, de la genética de poblaciones, y de referencias bibliográficas. Como es actualizada diariamente y las entradas contienen enlaces a otros recursos representa una herramienta de gran valor en los estudios moleculares para establecer la/las mutaciones causantes de una enfermedad.

Aminoaciduria

Es el aumento de los niveles de aminoácidos en orina causado por metabolopatías de los aminoácidos. Las aminoacidurias pueden ser por deficiencias genéticas a nivel renal en la absorción y en el transporte de los aminoácidos o por alteración en la codificación genética de alguna enzima que interviene en el metabolismo de los aminoácidos.

Clasificación de las Aminoacidurias

- i) **Aminoacidurias por Sobreflujo: el riñón funciona bien**, pero su capacidad de reabsorción está superada por las elevadas concentraciones plasmáticas de aminoácidos, por arriba del umbral de reabsorción y pueden ser por:
 - a) **Por Defectos metabólicos primarios o directos:** hereditarios con carácter autosómico recesivo. *Se asocian directamente a la ausencia o deficiencia genética de alguna enzima del metabolismo de uno o más aminoácidos. Se han descrito más de 100 diferentes trastornos hereditarios primarios.*
 - b) **Respuestas metabólicas secundarias o indirectas:** *por consecuencia de otras patologías como ser quemaduras, intoxicaciones, etc. con compromiso hepático o renal.*
- ii) **Aminoacidurias Renales:** son un grupo heterogéneo de trastornos genéticos en la función tubular renal o tubulopatías primarias. El riñón no funciona bien por trastorno congénito en el transporte de los aminoácidos en las células epiteliales de los túbulos renales. Ej: Cistinuria.

Metabolopatías de los Aminoácidos

1) Relacionadas al metabolismo de la Fenilalanina

La **fenilalanina** proveniente de las proteínas de la dieta puede seguir distintas rutas metabólicas. El bloqueo de ellas puede producir diferentes alteraciones las que se muestran en la **Figura 2**.

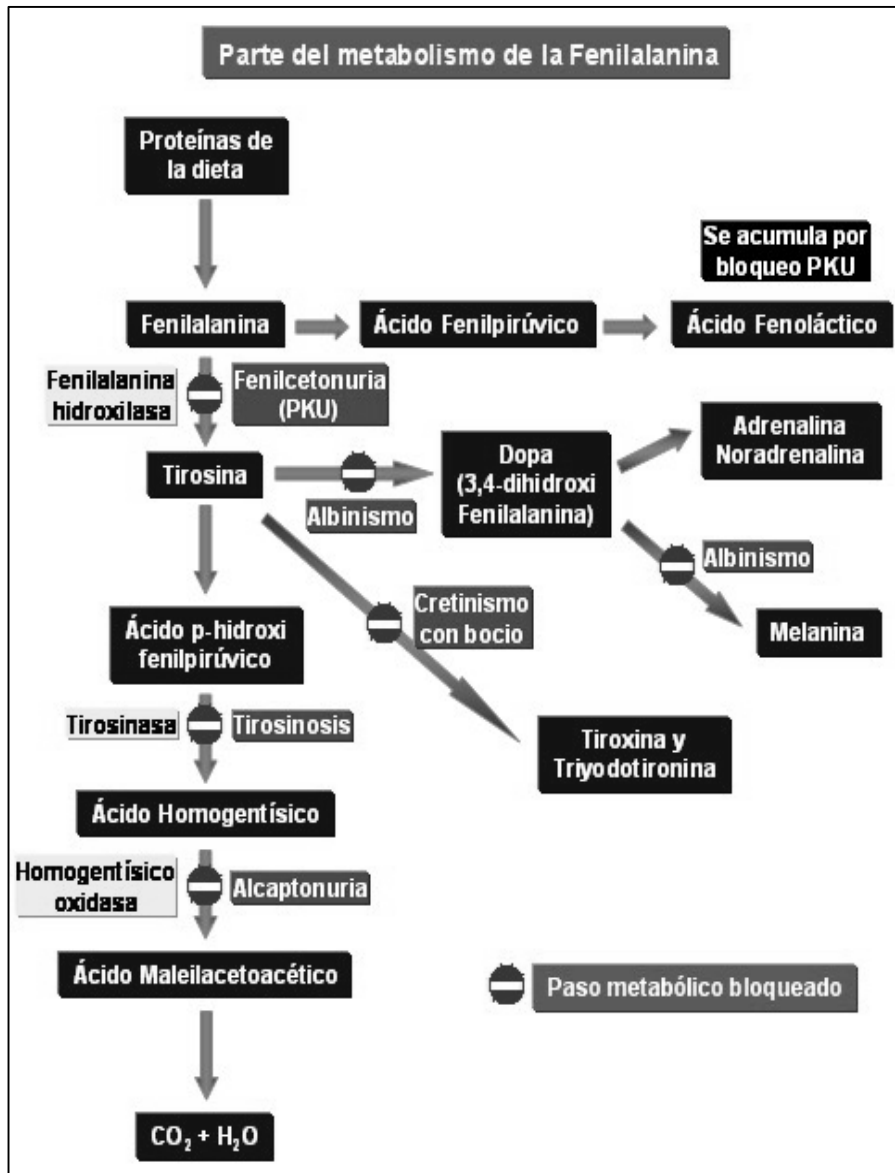


Figura 2. Metabolismo de Fenilalanina y alteración de vías catabólicas asociadas a metabolopatías

Entre las **enfermedades** relacionadas al **metabolismo de fenilalanina** estudiaremos:

- **Fenilcetonuria:** Se caracteriza por la acumulación excesiva de fenilalanina en el organismo, aminoácido esencial, que forma parte de las proteínas encontradas en los alimentos. Los niveles de fenilalanina se elevan por deficiencia genética de la fenilalanina hidroxilasa (PAH), causando una acumulación de la fenilalanina en sangre y orina, tejidos y en el cerebro, entre otros órganos. Se acumulan también las fenil-cetonas que se forman a partir de ella, que se eliminan por la orina y son las que dan el nombre a la enfermedad: fenilcetonuria o PKU.

La fenilalanina es un precursor de tirosina, la que se transforma en L-DOPA, neurotransmisor necesario para el correcto desarrollo del Sistema Nervioso. Su falta produce daños neurológicos irreversibles y retraso mental.

Aunque los niveles de fenilalanina estén aumentados, el periodo neonatal cursa sin síntomas¹. Al año ya presentan retardo mental con irritabilidad, vómitos, el pelo es claro, la piel es seca y con frecuentes erupciones. Y la orina es de olor muy fuerte a "ratón", porque se elimina gran cantidad de ácido fenilpirúvico, que es un derivado del ácido acético, que secretan los roedores en su orina. Pueden llegar a presentar convulsiones. Mientras que el desarrollo físico y la estatura son normales.

Esta enfermedad se puede prevenir disminuyendo la fenilalanina de la dieta a cantidades estrictamente necesarias para el crecimiento. Se ha encontrado que la tolerancia a la fenilalanina aumenta con la edad por la maduración de la barrera hemato-encefálica.

- **Alcaptonuria:** es un error metabólico congénito deficitario de la homogentísico di-oxigenasa (HGO, EC 1.13.11.5), enzima que cataliza la conversión de homogentisato a maleil acetoacetato. El gen responsable es el AKU; MIM, 203500, y el ácido homogentísico, intermediario de la ruta catabólica de la fenilalanina, no puede metabolizarse. El homogentisato (antes llamado alcaptona, de allí su nombre) acumulado se excreta por orina, se oxida al contacto con el aire formando un pigmento negruzco, por la formación de una sustancia del tipo de la melanina. Esta es una patología relativamente benigna, descubierta en 1649 por Lusitanus y descrita por Garrod en 1902, causando homogentísico aciduria (orina negra), ocronosis (pigmentación del tejido conjuntivo) y artrosis progresiva, especialmente de la columna. Se observan manchas negras en el cartílago de la oreja y puntos oscuros sobre el blanco del ojo y la córnea. Al igual que la mayoría de las enfermedades genéticas, la alcaptonuria en sí no se puede prevenir, pero muchas de sus manifestaciones, como la artritis, se pueden minimizar con tratamiento.

2) Relacionadas al Metabolismo de Leucina, Isoleucina y Valina

El bloqueo del metabolismo de leucina, isoleucina y valina por alteraciones en los genes que codifican las enzimas que participan en su catabolismo producen la **Leucinosis (Figura 3)**

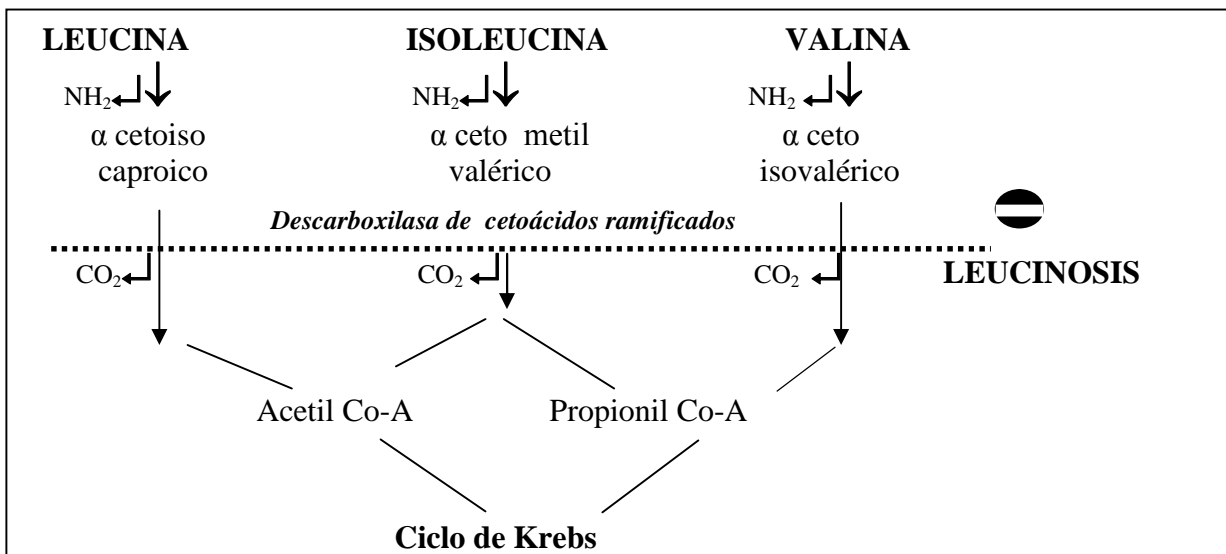


Figura 3. Metabolismo de Leucina, Isoleucina y Valina

- **Leucinosis o Enfermedad de la orina de jarabe de arce:** Esta enfermedad es consecuencia de un defecto en el metabolismo de los aminoácidos ramificados: **leucina, isoleucina y valina**. Estos se acumulan junto con los cetoácidos ramificados, que por efecto del O₂, pueden ser oxidados y polimerizarse formando una serie de pigmentos del tipo de la melanina, que dan a la orina un color y un olor dulce semejante al del jarabe de arce. Estos tres aminoácidos se degradan por rutas diferentes, pero comparten una misma enzima, la *descarboxilasa de los cetoácidos ramificados* (DCR), que es la que se halla deficiente, provocando esta enfermedad. La leucina y su cetoácido son los más tóxicos. Por ello esta enfermedad se denomina también leucinosis. El bebé nace sin problemas, ya que hasta el momento del parto su madre se encarga de metabolizar los AA, aunque sea portadora de una información errónea. Cuando el bebé comienza a alimentarse, las proteínas de la leche se degradan y liberan todos los aminoácidos, los cetoácidos ramificados no se degradan bien y comienzan a acumularse, el niño se intoxica con todos ellos y presenta un rechazo a los alimentos, vómitos, letargia e incluso coma. Por lo tanto hay que evitar la intoxicación eliminando estos AA de la dieta con una *fórmula especial* que no contiene leucina, isoleucina ni valina. Educando a los padres e hijos se logra que los niños puedan llevar una **VIDA NORMAL** en todos los sentidos con limitación sólo alimentaria.

3) Bloqueo del transporte de Lisina, Arginina, Ornitina y Cistina

El bloqueo del transporte de los aminoácidos **lisina, arginina, ornitina y cisteína** en las células epiteliales del túbulo renal y del intestino, por alteraciones en los genes que codifican los transportadores de membrana, produce **cistinuria**.

- **Cistinuria:** (OMIM 220100) es una enfermedad autosómica recesiva, causada por el defecto en la absorción intestinal y la reabsorción renal de aminoácidos básicos lisina, arginina, ornitina y cistina. Se

produce una elevada excreción urinaria de cistina, lisina, arginina y ornitina por trastorno congénito del transporte de los aminoácidos en la membrana plasmática, de las células epiteliales del túbulo renal y del intestino. Se han identificado dos genes como responsables de esta enfermedad: SLC3A1 y SLC7A9. Debido a su baja solubilidad, la cistina precipita formando cálculos a lo largo del sistema urinario que causan obstrucción, infecciones e insuficiencia renal. El sedimento urinario presenta los típicos cristales hexagonales planos, ya sean aislados o bien formando maclas. Son más fácilmente observables en la primera orina de la mañana, ya que es más ácida y concentrada; en cualquier caso si acidificamos la orina con ácido acético conseguiremos la precipitación de cristales que no son visibles con orina fresca. El tratamiento se basa en la ingesta de hasta cinco litros diarios de agua y fármacos como el Captopril para aumentar la solubilidad y reducir la formación de cálculos en el aparato urinario, los cólicos nefríticos y las infecciones urinarias, que reducen de manera notable la calidad de vida de los afectados y que a menudo acaban en fallo renal, diálisis y trasplante.

EXPERIENCIAS DE LABORATORIO

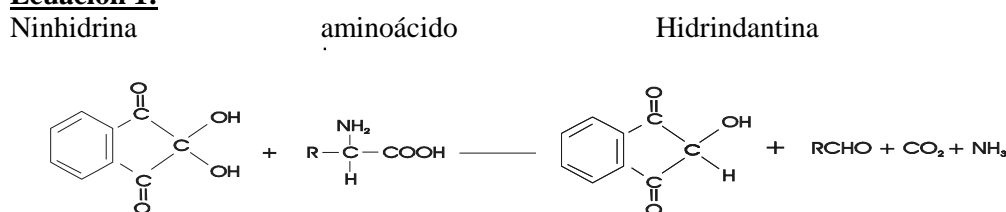
Muestras: para la realización de las pruebas deberán tomarse muestras de sangre y orina de los pacientes. Estas deberán conservarse a -20°C hasta su uso.

1) MÉTODOS CUANTITATIVOS

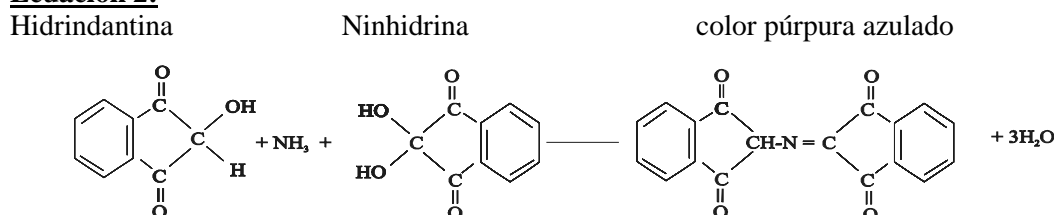
A) Determinación de aminoácidos totales: Cuantificación de nitrógeno amínico por el Método de la Ninhidrina

Fundamento de la reacción: Al calentar NH_3 , aminoácidos o ciertas aminas en presencia de ninhidrina reaccionan dando un color púrpura característico. La ninhidrina (tricetohidrindina) reacciona con los aminoácidos y estos se transforman en aldehídos con un átomo de carbono menos, liberándose NH_3 y CO_2 (reacción 1). En un segundo paso (ecuación 2) la ninhidrina reacciona con el NH_3 y la hidrindantina originados en la reacción 1, dando un compuesto de *color púrpura-azulado* (el color exacto depende del medio donde se desarrolle), que permite la detección cuali y cuantitativa de los aminoácidos.

Ecuación 1:

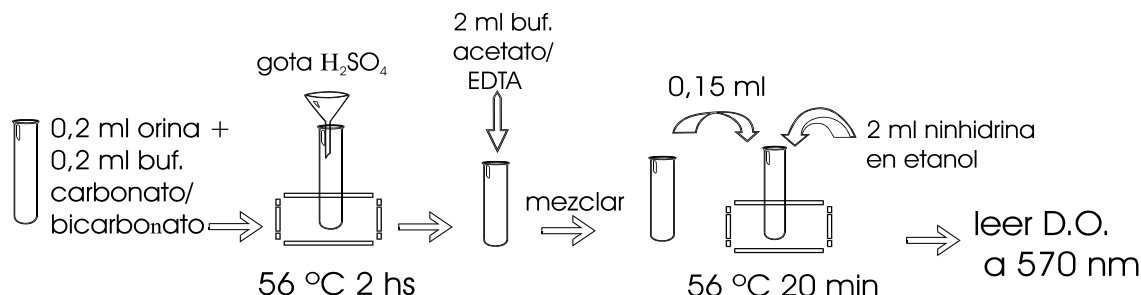


Ecuación 2:



Para medir nitrógeno amínico en orina debe tenerse en cuenta que en ella, comúnmente, se encuentran sustancias nitrogenadas que *interfieren*. Es necesario eliminarlas para detectar solamente el nitrógeno proveniente de los aminoácidos. El NH_3 es eliminado por simple destilación bajo una gota de ácido por el procedimiento de Hotchkiss.

Método de Hotchkiss: Colocar 0,2 ml de orina en un tubo de ensayo y agregar 0,2 ml de buffer carbonato-bicarbonato. Mezclar bien. Sumergir el vástago de un embudo pequeño en H₂SO₄ concentrado para que una gota de ácido se adhiera a la pared interna del mismo. Limpiar la pared externa y colocar el embudo así preparado en el tubo, 1 o 2 cm por arriba del líquido, con la precaución de no dejar caer ácido sobre la orina. Dejar 2 hs. a 56 °C o toda la noche a temperatura ambiente. Con este procedimiento se efectúa la extracción del NH₃ de la orina. Sacar el embudo, agregar 2 ml de buffer acetato-EDTA y mezclar. De allí se toman 0,15 ml para continuar con la reacción, como se esquematiza más abajo.



B) Curva Standard de nitrógeno y nitrógeno amínico en orina sin NH₃: 0,2 ml de orina se reemplazan por distintas cantidades de glicina, completando el volumen con agua y tener cantidades crecientes de nitrógeno. Mezclar con vortex. Tomar 0,15 ml de cada tubo de la curva standard y de la muestra problema sin NH₃ y colocarlos en sendos tubos limpios. Agregar a cada uno de ellos 2 ml de ninhidrina en etanol. Mezclar e incubar los tubos tapados, en baño de 56 °C durante 20 minutos, cuidando que el baño cubra el volumen del líquido en los tubos. Leer la densidad óptica a 570 nm.

Curva Standard De Nitrógeno

Tubo N°	Stand. o Muestra.	H ₂ O	Bf. Carb/ bicarb..	Bf. acet./ EDTA	Tomar de c/tubo	Ninhid. en EtOH	56 °C	DO. 570 nm	Calc. µg Nitróg.
1 - Bl	--	0,20 ml	0,20 ml	2 ml	0,15 ml	2 ml	20 min		
2	0,05 ml	0,15 ml	"	"	"	"	"		
3	0,10 ml	0,10 ml	"	"	"	"	"		
4	0,15 ml	0,05 ml	"	"	"	"	"		
5	0,20 ml	--	"	"	"	"	"		
6 - orina sin NH ₃	--	--	--	--	"	"	"		

Calcular los µg de nitrógeno presentes en orina sin NH₃, en base a la curva St. y a la lectura de la muestra problema, como ya se hizo en otros prácticos de Química Biológica I.

C) Separación de aminoácidos por Cromatografía Bidimensional en Capa Fina

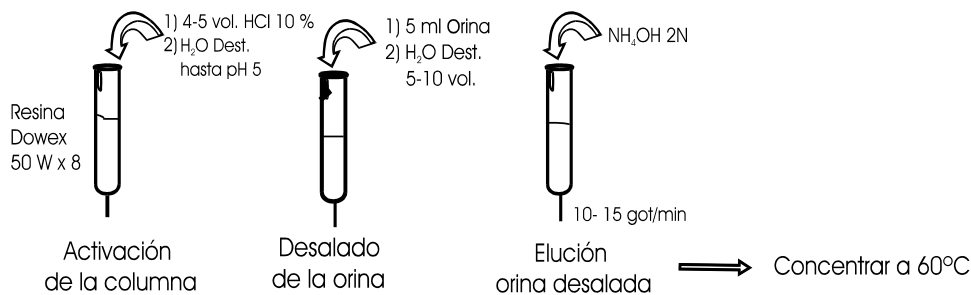
Repasar los principios y fundamentos de la cromatografía en capa fina vistos en Qca. Biol. I en el T. P. "Cromatografía".

En este trabajo práctico se hará una cromatografía bidimensional en capa fina de una orina problema, de una orina control y de una solución standard de aminoácidos puros (comerciales) como referencia, para identificar las manchas de acuerdo a los valores de R_f.

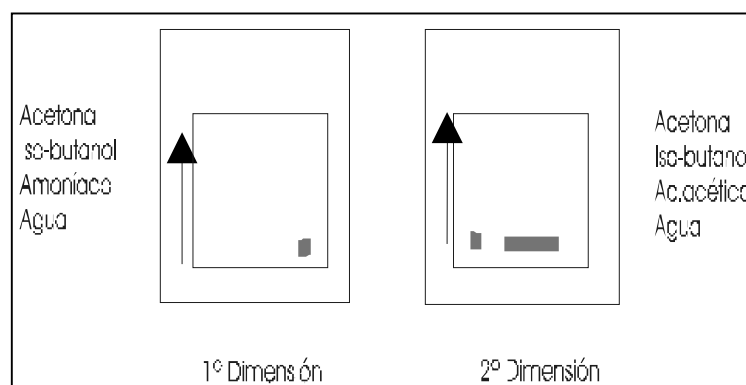
a) Preparación de la muestra de orina: Debido a que las sales inorgánicas distorsionan la cromatografía, se debe desalar la orina mediante una cromatografía de intercambio iónico (catiónica), usando una *columna de resina Dowex 50 W x 8 (H⁺)*.

b) Activación de la columna de resina Dowex: Se llena una columna de vidrio con una suspensión de resina en agua. Se hace pasar por la columna 4 a 5 volúmenes de HCl al 10 % para que el Na⁺ de la resina se intercambie con los H⁺ del ácido, por efecto de la concentración, quedando la resina protonada. Se lava luego con agua destilada hasta que el pH del eluido sea de 4-5 (para eliminar el exceso de HCl). De esta manera se activa la columna.

- c) **Desalado de la orina por resina dowex** Se siembran 5 ml de orina sobre el lecho de la columna. Posteriormente se lava la misma con 5 a 10 volúmenes de agua destilada, para eliminar todas las sustancias que no son retenidas por la columna. Se retienen todos los aminoácidos (menos la taurina), por sus grupos NH_3 , liberando H^+ .
- d) **Elución de los aminoácidos de la orina retenidos en la columna** Para eluir los aminoácidos de la columna se hacen pasar NH_4OH 2 N con un goteo de 10 a 15 gotas/min., y se recogen fracciones de 2 ml hasta que se observe un cambio de color. (Solo interesan las fracciones más amarillentas).
- e) **Concentración de la muestra:** La fracción de orina desalada es concentrada en estufa a 60°C .
- f) **Regeneración de la columna:** Lavar la columna con agua destilada hasta que el pH sea 8 - 9, luego pasar 4 a 5 vol. de HCl al 10 % y por último agua destilada hasta pH 5.

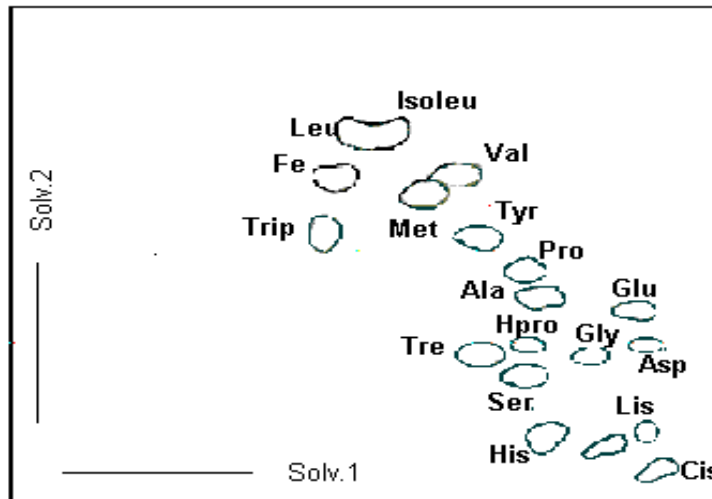


- g) **Cromatografía bidimensional:** Se usan placas delgadas de sílica gel G de 0.3 mm de espesor, utilizando como solventes para la *1ª dimensión*: acetona / iso-butanol / amoníaco conc. / agua (30/50/7/23, v/v) y para la *2ª dimensión*: acetona / iso-butanol / ác. Acético / agua (70/70/20/40).
- i) **Siembra** una alícuota de la orina problema (desalada y concentrada) se siembra en forma puntual, en el extremo inferior izquierdo de una placa de sílica, a 2 cm de la base y a 2 cm del borde lateral. De la misma manera, en sendas placas se siembra una muestra de orina normal (desalada y concentrada) y una muestra de la solución standard de aminoácidos.
- ii) **Corrida cromatográfica** Se efectúa la *1ª* corrida con el solvente de la *1ª* dimensión.



Una vez finalizada la misma se evapora el solvente con secador de pelo.

- iii) Posteriormente se efectúa la *2ª* corrida en sentido perpendicular a la *1ª* con el solvente de la *2ª* dimensión.
- iv) **Revelado** Pulverizar cuidadosamente la placa con la solución reveladora (ninhidrina nitrato de cobre) y llevar a estufa 30 min a 60°C o 10 min a 110°C . Si el cromatograma es calentado por un período más largo el fondo toma una coloración rosada. Controlar la formación de manchas de color marrón, azul, amarillo etc. porque alcanzan un máximo y desaparecen. Luego se identifican los aminoácidos de acuerdo a los valores de R_f .
- v) **Cromatograma de AA St.**
- vi) **Cromatograma de una Mezcla de Aminoácidos Standard**



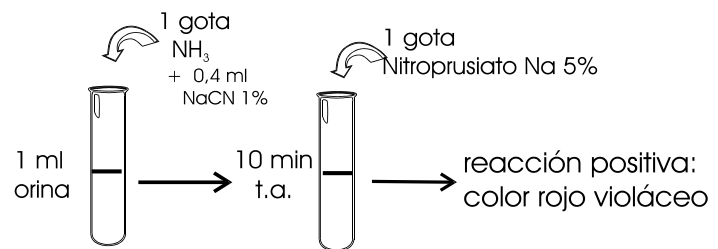
2) MÉTODOS CUALITATIVOS

- A) **ALCALINIZACIÓN DE LA ORINA: Alcaptonuria.** Una muestra de orina del paciente, se alcaliniza con KOH hasta un pH 10. Se compara con una muestra control. Al cabo de unos minutos la orina del paciente adquiere un color negro. Esta técnica es de tipo cualitativa.



- B) **TEST DEL NITROPRUSIATO: Cistinurias.** La cistina se reduce a cisteína por acción del NaCN (reductor suave) y los grupos sulfhidrilos libres reaccionan con el nitroprusiato dando un color **rojo violáceo**. La aparición de un color amarillo rosado indica la presencia de trazas de cistina.

Procedimiento: En un tubo colocar 1 ml de orina, alcalinizar con 1 gota de NH_3 concentrado y agregar 0,4 ml de NaCN al 1 %. Mezclar y esperar 10 min. Agregar 1 gota de nitroprusiato de sodio al 5 %, mezclar y observar el color. La posterior identificación de la cistina se lleva a cabo por cromatografía y análisis cuantitativo de aminoácidos. El test del nitroprusiato también da positivo con

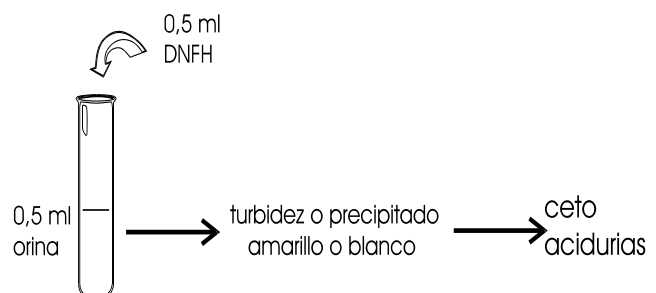


la homocistina, que se excreta por orina en pacientes con homocistinuria. Esta enfermedad se debe a una deficiencia de una enzima hepática de la vía de la metionina.

- C) **DINITROFENILHIDRAZINA: Test para cetoacidurias.** Esta prueba permite detectar la presencia de cetoácidos en orina.

La reacción de los grupos carbonilos con la Dinitrofenilhidrazina (DNPH) hace que se formen hidrazonas insolubles. La prueba da resultados positivos en 1 enfermedad de la orina de jarabe de arce y en la fenilcetonuria.

Procedimiento: En un tubo colocar 0,5 ml de orina más 0,5 ml de 2,4-DNPH. El test es positivo cuando aparece una turbidez o precipitado de color amarillo o blanco al cabo de 5 min.



D) TEST DEL FeCl_3 O MÉTODO DE PERRY: Fenilcetonuria, Alcaptonuria. Una forma muy rápida para la detección de Fenilcetonuria, aunque poco sensible e inespecífica, se basa en el uso del FeCl_3 . El ion férrico provoca una quelación de los grupos enol y produce una reacción de color con los cetoácidos y aminoácidos correspondientes. **Procedimiento:** En un tubo pequeño colocar 0.5 ml de orina, agregar 1 gota de H_2SO_4 , y 2 gotas de FeCl_3 . Agitar y observar el cambio de color. La reacción es positiva cuando da una coloración **verde grisáceo**.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA EL TRABAJO PRÁCTICO

Determinación de aminoácidos totales

Buffer carbonato-bicarbonato 0,2 M pH 10,5. Mezclar 40,5 ml de Na_2CO_3 0,2 M con 9,5 ml de NaHCO_3 0,2M. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

Buffer acetato-EDTA (EDTA 0,24% en buffer acetato 0,15 M pH 3,7): a 8 ml de agua destilada agregar 9 ml de ácido acético glacial y 2,4 g de EDTA Na_2 (sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético). Ajustar a pH 3,7 con NaOH y llevar a 1 litro con H_2O destilada. Conservar a 4°C.

H_2SO_4 concentrado.

Solución stock de glicina: disolver 5,358 g de glicina en 100 ml de H_2O . A partir de esta solución se prepara una solución de trabajo diluyendo 1 ml a 100 ml con H_2O . La solución resultante contiene **100 μg de nitrógeno de glicina por ml**. Se puede conservar congelada durante 1 a 2 meses.

Reactivo de Ninhidrina en etanol: disolver 0.2 g de ninhidrina en 100 ml de alcohol absoluto. Se mantiene estable de 3 a 4 semanas.

Cromatografía Bidimensional

Resina Dowex 50W x8 (H+): suspender 50 g de resina en 100 ml de etanol-acetona (1:1), agregar acetato de sodio sólido hasta tener una concentración final 1 M. Filtrar. Resuspender en NaOH 0,5 M. Filtrar. Repetir 2 veces la operación. Lavar y resuspender en agua destilada. Agregar HCl hasta una concentración final de 3 M: 25 ml en 100 ml. Filtrar.

NH_4OH 2 N

Sílica gel G: preparar placas de 0,3 mm de espesor.

Solvente 1° dimensión: acetona/iso-butanol/amoníaco conc./agua (30/50/7/23, v/v).

Solvente 2° dimensión: acetona/iso-butanol/ác. acético/agua (70/70/20/40, v/v).

Solución Reveladora: Ninhidrina-nitrato de cobre

Solución 1: 0,1 g de ninhidrina en 50 ml de alcohol absoluto.

Solución 2. Solución al 1 % de nitrato de cobre en alcohol absoluto.

Solución 3: ácido acético glacial.

Mezclar: 50 ml de solución 1, 3 ml de solución 2 y 10 ml de solución 3.

Métodos Cualitativos

Test del FeCl_3

FeCl_3 al 10% en HCl 0,02 N: pesar 10 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y disolver en HCl 0,02 N. Guardar en frasco oscuro en la heladera.

Test del Nitroprusiato

NH_3 concentrado.

NaCN al 1 %: 1g se disuelve en 100 ml de agua destilada (estable 3 meses).

Nitroprusiato de Na al 5 %: 500 mg en 10 ml de agua destilada (estable 1 semana en heladera).

Reacción de la Dinitrofenilhidrazina

2,4-DNFH (2,4-dinitrofenilhidrazina): 100 mg en 100 ml de HCl 2N. Guardar en frasco oscuro en la heladera.

NOTAS DE SEGURIDAD

Algunos de los materiales usados en el laboratorio representan riesgos para la salud. Se recomienda utilizar los elementos de protección adecuados al manipularlos (guantes, barbijos, anteojos de protección). A continuación se mencionan brevemente la toxicidad y primeros auxilios. Ante un accidente se debe contactar al médico en todos los casos.

Ninhidrina: Nocivo por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. En caso de *Inhalación:* trasladar a la persona al aire libre.

Contacto con la piel: lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropas contaminadas.

Contacto con los ojos: lavar con agua abundante (mínimo durante 15 minutos), manteniendo los párpados abiertos. En caso de irritación, pedir atención médica.

Ingestión: beber agua abundante. Provocar el vómito. Pedir atención médica.

Nitroprusiato: Tóxico por ingestión. En caso de:

Inhalación: aire fresco. En caso necesario, respiración asistida o por medios instrumentales.

Contacto con la piel: aclarar con abundante agua. Eliminar ropa contaminada.

Contacto con los ojos: aclarar con abundante agua, manteniendo abiertos los párpados.

Ingestión: beber abundante agua, provocar vómito. Llamar enseguida al médico.

Dinitrofenilhidrazina: Nocivo por ingestión. Irrita los ojos y la piel. Seguir las mismas indicaciones que para ninhidrina.

Acido Sulfúrico: Corrosivo. Higroscópico. Reacciona con el agua. Puede ocasionar daños en riñones y pulmones, en ocasiones ocasionando la muerte. Causa efectos fetales de acuerdo a estudios con animales de laboratorio. Peligro de cáncer. Puede ser fatal si se inhala. Ocasiona severas irritaciones en ojos, piel, tracto respiratorio y tracto digestivo con posibles quemaduras.

Efectos adversos potenciales para la salud:

Inhalación: Irritación, quemaduras, dificultad respiratoria, tos y sofocación. Altas concentraciones del vapor pueden producir ulceración de nariz y garganta, edema pulmonar, espasmos y hasta la muerte.

Ingestión: Corrosivo. Quemaduras severas de boca y garganta, perforación del estómago y esófago, dificultad para comer, náuseas, sed, vómito con sangre y diarrea. En casos severos colapso y muerte. Durante la ingestión o el vómito se pueden broncoaspirar pequeñas cantidades de ácido que afecta los pulmones y ocasiona la muerte.

Piel: Quemaduras severas, profundas y dolorosas. Si son extensas pueden llevar a la muerte (shock circulatorio). Los daños dependen de la concentración de la solución de ácido sulfúrico y la duración de la exposición.

Ojos: Es corrosivo y puede causar severa irritación (enrojecimiento, inflamación y dolor) Soluciones muy concentradas producen lesiones irreversibles, opacidad total de la córnea y perforación del globo ocular. Puede causar ceguera.

Efectos crónicos: La repetida exposición a bajas concentraciones puede causar dermatitis. La exposición a altas concentraciones puede causar erosión dental y posibles trastornos respiratorios. El efecto crónico es la generación de cáncer.

Procedimientos de primeros auxilios:

Inhalación: Trasladar al aire fresco. Si no respira administrar respiración artificial. Si respira con dificultad suministrar oxígeno. Evitar el método boca a boca. Mantener la víctima abrigada y en reposo. Buscar atención médica inmediatamente.

Ingestión: Lavar la boca con agua. Si está consciente, suministrar abundante agua para diluir el ácido. No inducir el vómito. Si éste se presenta en forma natural, suministre más agua. Buscar atención médica inmediatamente.

Piel: Retirar la ropa y calzado contaminados. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón, mínimo durante 15 minutos. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica inmediatamente.

Ojos: Lavar con abundante agua, mínimo durante 15 minutos. Levantar y separar los párpados para asegurar la remoción del químico. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica.

Hidróxido de Amonio: Provoca quemaduras, irrita las vías respiratorias. En caso de:

Inhalación: Tome precauciones para su propia seguridad (use los elementos de protección). Retire a la víctima del sitio y llévela al aire fresco; personal capacitado debe aplicar respiración artificial si la víctima no respira u oxígeno si respira con dificultad. Evite el contacto boca-boca si la víctima ha ingerido o inhalado la sustancia. Acuda inmediatamente al médico.

Contacto con los ojos: Lave con abundante agua por 20 minutos, abriendo los párpados. No efectúe medidas de neutralización. Acuda inmediatamente al oftalmólogo. Siga lavando mientras llega el especialista.

Contacto con la piel: Lave con abundante agua durante 20 minutos. Quite inmediatamente la ropa y zapatos contaminados. Extraiga la sustancia con algodón impregnado de polietilenglicol 400, si hay disponible. Acuda al médico. Descontamine completamente las prendas antes de volver a utilizarlas.

Ingestión: Enjuague los labios y boca con abundante agua. Dé a beber lentamente un litro de agua.

NO INDUZCA AL VOMITO debido al riesgo de perforación. Llame al médico inmediatamente. No suministre nada si la víctima está inconsciente o desvaneciéndose. Si el vómito ocurre naturalmente, mantenga la víctima agachada.

EDTA: Irritante. Riesgo de lesiones oculares graves. En caso de:

Inhalación: No es peligroso por inhalación.

Contacto con la piel: Lávese inmediatamente con jabón y agua abundante. Si los síntomas persisten consultar a un médico.

Contacto con los ojos: Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico.

Acetona: El acetona es un líquido incoloro, de olor característico agradable, volátil, altamente inflamable y sus vapores son más pesados que el aire. Utilice bata, lentes de seguridad y, si es necesario, guantes de hule natural o neopreno (no utilizar PVC), en una zona bien ventilada, de preferencia en una campana. Evite un contacto prolongado de la piel con este producto químico. No debe utilizarse ropa de rayón ni lentes de contacto cuando se maneje este producto. Al trasvasar pequeñas cantidades con pipeta, siempre utilizar propipetas, **NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.**

Inhalación: En forma de vapor, causa irritación de ojos nariz y tráquea. En concentraciones muy altas (aproximadamente 12 000 ppm), puede afectar al sistema nervioso central, presentándose dolor de cabeza y cansancio. En casos extremos puede perderse la conciencia. Si la inhalación ha sido prolongada, transportar al intoxicado a una zona bien ventilada. Si no respira, dar respiración artificial. Mantenerlo caliente y en reposo. Si es necesario, administrar oxígeno.

Contacto con los ojos: En forma de vapor, los irrita causando lagrimeo y fluido nasal; el líquido puede causar daño a la córnea. Lávelos con agua o disolución salina, asegurándose de que los ojos se encuentren abiertos durante el lavado.

Contacto con la piel: Un contacto prolongado y constante con la piel provoca resequead, agrietamiento y dermatitis. El líquido puede penetrar a través de la piel, lo mismo que el vapor a concentraciones mayores de 5000 mg/m³. Lavar el área contaminada con agua y jabón. En caso necesario, elimine la ropa contaminada.

Causa irritación gástrica, dolor y vómito. Lavar la boca con agua. Si se ingirió, diluir tomando agua. No inducir el vómito.

Peligros reproductivos: La exposición de mujeres embarazadas a este producto, a una concentración entre 30 y 300 mg/m³ produce efectos embriotóxicos, aumentando los niveles de lípidos, incluso, hasta niveles embriotóxicos.

Iso-butanol: Causa irritación en ojos, piel y vías respiratorias. Inflamable.

Inhalación: Causa irritación al tracto respiratorio, experimentando malestar nasal y descarga con dolor en el pecho y tos. Puede causar pérdida del conocimiento. Remueva al aire fresco. Suministre respiración artificial si no respira. Si se dificulta la respiración se debe suministrar oxígeno por personal calificado. Obtenga atención médica.

Ingestión: Puede causar náusea, vómito, diarrea y narcosis. Lo mismo que dolor de cabeza. **NO induzca al vomito.** Dar grandes cantidades de agua. Obtenga atención médica inmediatamente.

Contacto con la piel: Causa irritación con malestar enrojecimiento local e hinchazón. Inmediatamente remueva ropa y zapatos contaminados. Lave la piel con abundante agua y jabón por al menos 15 minutos. Obtenga atención médica inmediatamente. Lave la ropa antes de reusarla.

Contacto con los ojos: Causa severa irritación, experimentada con malestar o dolor, excesivo par-padeo y producción de lagrimas con excesivo enrojecimiento e hinchazón de la conjuntiva. Inmediatamente lave los ojos con abundante agua al menos por 15 minutos. No remueva los lentes de contacto, si los usa. Obtenga atención médica inmediatamente preferiblemente del oftalmólogo.

Efectos Crónicos: Reseca u cuartea la piel debido a su propiedad de eliminar la grasa de la piel.

Acido Acético: Los efectos de la toxicidad se relacionan con sus propiedades altamente corrosivas.

Inflamable. Provoca quemaduras graves.

Inhalación: Irritación de nariz y garganta, dificultad para respirar, tos, flema. Llevar a lugar fresco y bien aireado.

Contacto con la piel: Riesgo de irritaciones y quemaduras severas. Quitar ropa y calzado contaminados en caso de derrame (bajo una ducha si es necesario) y lave con abundante agua la piel afectada.

Contacto con los ojos: Irritación severa de los ojos, lesiones oculares graves. En caso de salpicadura en los ojos, enjuague lo antes posible con agua corriente por lo menos 15 minutos manteniendo los párpados abiertos. Si no se pudieron mantener los párpados abiertos aplicar colirio analgésico en la zona afectada.

Ingestión: Irritación, quemadura y perforación del tracto gastrointestinal. Náuseas y vómitos. Dificultad para respirar. Moderadamente tóxico. enjuague boca y suministre agua fresca. Si no estuviera consciente no suministre nada por la boca. No provocar vomito. En todos los casos consulte con un medico inmediatamente o traslade a la persona al hospital

Cianuro: ¡Veneno! ¡Peligro! Puede ser fatal si es ingerido, inhalado o absorbido a través de la piel. En contacto con ácidos libera gas venenoso. Causa quemaduras de piel, ojos y tracto respiratorio. Afecta la sangre, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central y la tiroides.

Inhalación: El polvo o neblina pueden ser muy irritantes para la nariz y la garganta. La sustancia reacciona con la humedad y se forma el vapor de cianuro de hidrógeno que es muy tóxico. La inhalación de 20 a 40 ppm puede resultar en ligeros síntomas de envenenamiento. Altas concentra-ciones pueden causar la muerte dentro de minutos u horas. Los síntomas incluyen debilidad, dolor de cabeza, confusión, ansiedad, náuseas, vómito, contracción del pecho, shock, inconsciencia, convulsiones y la muerte. Una concentración de 270 ppm puede ser fatal en un minuto. Trasladar al aire fresco. Si no respira administrar respiración artificial (evite el método boca a boca). Si respira con dificultad suministrar oxígeno. Tratar el shock: levantar los pies y mantenga la víctima abrigada y en reposo. Buscar atención médica.

Ingestión: Sensación de quemadura en el tracto digestivo, salivación, náuseas, vómito, debilidad, desvanecimiento, confusión, dificultad respiratoria, muerte. Grandes dosis de cianuro pueden resultar en repentina pérdida del sentido y una pronta muerte; las dosis pequeñas prolongarán los síntomas anteriores 1 a 2 horas. Lavar la boca con agua. No dar a beber nada porque puede aumentar la absorción del veneno. No inducir el vómito. Buscar atención médica inmediatamente.

Contacto con la piel: Puede ser absorbido a través de la piel en cantidades perjudiciales. En contacto con la piel puede causar irritación de la piel y posibles quemaduras, especialmente si la piel esta mojada o húmeda. Si es absorbido, causa síntomas similares a los de la ingestión. La absorción por la piel puede causar inconsciencia. La absorción dentro del cuerpo puede causar cianosis (decoloración azulada de la piel debido a la deficiente oxigenación de la sangre). Retirar la ropa y calzado contaminados. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón, mínimo durante 15 minutos. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica.

Contacto con los ojos: Irritación, lagrimeo excesivo, enrojecimiento y dolor. La exposición a altas concentraciones del vapor cianuro de hidrógeno podría dañar la retina y los nervios del ojo. Lavar con abundante agua, mínimo durante 15 minutos. Levantar y separar los párpados para asegurar la remoción del químico. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica.

Efectos crónicos: Un amplio rango de síntomas son experimentados por exposición a bajo nivel, frecuentemente a menos de 10 ppm. Estos síntomas incluyen debilidad, mareo, vértigo, dolor de cabeza, náuseas, vómito, dolor abdominal, irritación de la garganta, calambre muscular, pérdida de peso.

Referencias Bibliográficas

Farreras-Rozman (2008) Medicina Interna. 16 Ed. Editorial Elsevier.

Lehninger Principios de Bioquímica

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

