

BIBLIOGRAFIA

1.- Adler, J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 74: 77-81.

2.- Adler, J. 1976. The Sensing of Chemicals by Bacteria. Science. Am. 234 (4): 40-47.

3.- Chet, I., R.P. Mitchell. 1976. Ecological Aspects of Microbial Chemotactic Behavior. Ann. Rev. Microbiol. 30: 321-339.

4.- Gomez Lin. M.A. y E. Garcia H. 1981. Percepción de estímulos en las bacterias. Naturaleza. 12 (4): 218-225.

5.- Melton, T., P.E. Hartman, J.P. Stratton, T.L. Lee y A. T. Davis. 1978. Chemotaxis of *Salmonella typhimurium* to amino acids and some sugars. J. Bacteriol. 133 (2): 708-716.

activos (detergentes), son moléculas cuya porción hidrofílica altamente polar puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica; aquellos cuyo grupo ionizable es un núcleo de amonio cuaternario cargado positivamente se conocen como **EFFECTO DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA** grupo cargado negativamente en su molécula, en tanto que los detergentes no iónicos poseen un grupo polar sin carga.

INTRODUCCION

Los detergentes en el agua tienden a formar micelas; y cuando se ponen en contacto con la membrana plasmática es una estructura delgada de 4 a 5 nm de espesor que rodea al citoplasma y delimita a la célula constituyendo la frontera entre el contenido citoplásmico y el medio circundante. Es dinámica, en los procariotes cumple una gran variedad de funciones, pero dada su propiedad de actuar como tamiz molecular selectivo, permite el establecimiento de gradientes de concentración a ambos lados de ella los cuales promueven la entrada de nutrientes y la salida de materiales de desecho. La organización de la membrana depende del tipo y concentración de agente tensoactivo. Al perturbarse de esta manera la organización estructural de todas las membranas biológicas estudiadas consisten de una bicapa discontinua de lípidos a la cual se asocian proteínas, ambas moléculas coexisten y se establecen mediante uniones no covalentes como son interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas de atracción. Debido a su naturaleza fluida, los lípidos pueden desplazarse lateralmente en el plano de la membrana o rotar sobre su propio eje longitudinal.

En esta práctica ensayaremos la actividad hemolítica de los detergentes siguiendo las funciones atribuidas a la membrana son desempeñadas por sus componentes; la bicapa de lípidos es responsable de la impermeabilidad hacia moléculas hidrofílicas en tanto que las proteínas están involucradas en el tránsito específico de moléculas, la generación de energía, la recepción y transducción de señales físicas y químicas provenientes del medio ambiente o actividades enzimáticas. La ordenada disposición de sus lípidos y proteínas es responsable de la integridad estructural de la membrana, por lo que cualquier agente que perturbe esta organización causará severos trastornos en su funcionalidad y en consecuencia afectará la viabilidad celular en diferente grado.

1 tubo de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticagulante
20 tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de hule

OBJETIVOS

- En este ensayo nos proponemos como objetivos los siguientes:
- 1) Estudiar el efecto de ciertos agentes tensoactivos sobre la integridad de la membrana plasmática.
 - 2) Determinar la eficiencia con la cual los distintos agentes activos de superficie ocasionan daños en la membrana celular.
 - 3) Mediante un ensayo de dosis-respuesta, establecer la concentración a la cual los agentes tensoactivos probados presentan su máxima actividad.

agua destilada. Los detergentes que se emplearán serán Tween-80, Tritón X-100, Cetrimid, Dodecil-sulfato de sodio (SDS) y Desoxicolato de sodio.

FUNDAMENTO

Solución anticoagulante: Citrato de Sodio al 4%; Disolver 0.2 gramos de citrato. Se ha postulado que las proteínas membranales se asocian con la bicapa lipídica mediante cuatro formas alternativas que involucran principalmente a las interacciones hidrofóbicas. Como los lípidos membranales, los agentes tenso

EFFECTO DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

INTRODUCCION

Las membranas plasmáticas es una estructura delgada de 4 a 5 nm de espesor que rodea al citoplasma y delimita a la célula constituyendo la frontera entre el contenido citoplasmático y el medio circundante. Es dinámica, en los procesos cumple una gran variedad de funciones, pero dada su propiedad de actuar como tamiz molecular selectivo, permite el establecimiento de gradientes de concentración a ambos lados de ella los cuales promueven la entrada de nutrientes y la salida de materiales de desecho.

Todas las membranas biológicas estudiadas consisten de una bicapa discontinua de lípidos a la cual se asocian proteínas, ambas moléculas coexisten establemente mediante uniones no covalentes como son interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas de atracción. Debido a su naturaleza fluida los lípidos pueden desplazarse lateralmente en el plano de la membrana o rotar sobre su propio eje longitudinal.

Las funciones atribuidas a la membrana son desempeñadas por sus componentes; la bicapa de lípidos es responsable de la impermeabilidad hacia moléculas hidrofílicas en tanto que las proteínas están involucradas en el tránsito específico de moléculas, la generación de energía, la recepción y transducción de señales físicas y químicas provenientes del medio ambiente o actividades enzimáticas. La ordenada disposición de sus lípidos y proteínas es responsable de la integridad estructural de la membrana, por lo que cualquier agente que perturbe esta organización causará severos trastornos en su funcionalidad y en consecuencia afectará la viabilidad celular en diferente grado.

OBJETIVOS

En este ensayo nos proponemos como objetivos los siguientes:

- 1) Estudiar el efecto de ciertos agentes tensoactivos sobre la integridad de las membranas plasmáticas.
- 2) Determinar la eficiencia con la cual los distintos agentes activos de superficie ocasionan daños en la membrana celular.
- 3) Mediante un ensayo de dosis-respuesta, establecer la concentración a la cual los agentes tensoactivos probados presentan su máxima actividad.

FUNDAMENTO

Se ha postulado que las proteínas membranales se asocian con la bicapa lipídica mediante cuatro formas alternativas que involucran principalmente a las interacciones hidrofóbicas. Como los lípidos membranales, los agentes tenso-

MÉTODOS
 activos (detergentes), son moléculas anfipáticas cuya porción hidrofílica altamente polar puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica; aquellos cuyo grupo ionizable es un núcleo de amonio cuaternario cargado positivamente se conocen como **detergentes catiónicos**, los **detergentes aniónicos** llevan un grupo cargado negativamente en su molécula, en tanto que los **detergentes no iónicos** poseen un grupo polar sin carga.

3.- Los detergentes en el agua tienden a formar micelas, y cuando se ponen en contacto con la membrana se asocian con ella insertando sus porciones no polares; esta unión rompe las interacciones hidrofóbicas existentes entre las proteínas y lípidos circundantes destruyéndose la bicapa lipídica. Las proteínas son liberadas en forma de complejo con moléculas de detergente y unos cuantos lípidos; los lípidos son solubilizados también por el detergente en forma de micelas.

6.- Resuspender el paquete celular con NaCl 0.85%, ajustando el volumen original El grado de daño ocasionado a la membrana depende del tipo y concentración de agente tensoactivo. Al perturbarse de esta manera la organización estructural de la membrana sobreviene pérdida de su permeabilidad manifestándose en la liberación de metabolitos intracelulares, bloqueo en el transporte activo y del metabolismo energético; cuando el daño es severo ocurre la destrucción total de la membrana y la lisis celular. Estas propiedades han hecho de los detergentes candidatos en el empleo como agentes bactericidas.

En esta práctica ensayaremos la actividad hemolítica de los detergentes siguiendo espectrofotométricamente la liberación de hemoglobina a partir de las células rotas. Se emplearán diferentes concentraciones de agente tensoactivo.

9.- Preparar cuatro series de 3 tubos de ensayo de 13 x 100 mm, y adicionarles **MATERIAL Y REACTIVOS** 0.85%.

- Sangre humana fresca los tubos 0.5 ml de la suspensión diluida de eritrocitos, y Gradilla azucar de la forma ya indicada.
 - Jeringa y aguja estériles
 - 1 tubo de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante
 - 20 tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de hule
 - 2 pipeta graduada de 5 ml
 - 1 pipeta graduada de 1 ml
 - 3 pipetas graduadas de 0.1 ml
 - 1 pipeta Pasteur con bulbo de caucho
 - 1 matraz Erlenmeyer de 50 ml
 - 1 centrifuga
 - 1 Baño de agua
 - 1 espectrofotómetro
- 2a. serie de tubos: Cetrimida al 1%
- 3a. serie de tubos: Dodecil sulfato de sodio al 1%

- Solución Salina: NaCl 0.85 %: Disolver 0.85 gramos de NaCl en 100 ml de agua destilada.
- Soluciones de detergente al 1% : Disolver 0.1 gramos de detergente en 10 ml de agua destilada. Los detergentes que se emplearán serán Tween-80 Tritón X-100, Cetrimida, Dodecil-sulfato de sodio (SDS) y Desoxicolato de sodio.
- Solución anticoagulante: Citrato de Sodio al 4%: Disolver 0.2 gramos de citrato de sodio en 5 ml de agua destilada. Distribuir volúmenes de
- 15.- Registrar 0.5 ml en tubos de ensayo de 13 x 100.

RESULTADOS

METODOS

- 1.- Colectar 5 ml de sangre humana con una jeringa estéril y transferirla a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio al 4%.
- 2.- Mezclar suavemente por inversión para no causar hemólisis.
- 3.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.- Eliminar el suero con una pipeta Pasteur.
- 5.- Lavar dos veces el paquete celular con NaCl al 0.85%.
- 6.- Resuspender el paquete celular con NaCl 0.85%, ajustando al volumen original de sangre.
- 7.- Preparar diluciones de la suspensión de eritrocitos de manera que cuando se adicionen 0.5 ml de la dilución a 4.5 ml de Triton X-100 al 1%, el sobrenadante obtenido después de centrifugar, muestre una absorbancia de 0.8 - 0.9 a 540 nm. El valor de absorbancia obtenido se considerará como el 100% de lisis; por lo que el porcentaje de hemólisis ocasionado por los diferentes agentes podrá calcularse a partir de este valor.
- 8.- La suspensión de eritrocitos deberá diluirse con NaCl al 0.85% a la dilución que mostró el valor de densidad óptica recomendado anteriormente.
- 9.- Preparar cuatro series de 3 tubos de ensaye de 13 x 100 mm, y adicionarles 4.5 ml de NaCl 0.85%.
- 10.- Añadir a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión diluida de eritrocitos, y mezclar de la forma ya indicada.
- 11.- A cada uno de los tres tubos de ensaye de la primera serie añadirles 10, 30 y 50 μ l respectivamente de Tween-80 al 1%. Mezclar cuidadosamente por inversión e incubar los tubos en baño de agua durante 20 minutos.
- 12.- De manera similar proceder con las tres series de tubos restantes, empleando los agentes tensoactivos como sigue:
 - 2a. serie de tubos: Cetrimida al 1%
 - 3a. serie de tubos: Dodecil sulfato de sodio al 1%
 - 4a. serie de tubos: Desoxicolato de sodio al 1%
- 13.- Después de la incubación, centrifugar todos los tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células que permanecieron intactas.
- 14.- Determinar la absorbancia de todos los sobrenadantes a 540 nm en un espectro fotómetro.
- 15.- Registrar los valores.

activos (detergentes), son moléculas anfipáticas cuyas porciones hidrofílicas altamente polar puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica; aque-
 llos cuyo grupo ionizable es un núcleo de amonio cuaternario cargado positivamente se conocen como detergentes catiónicos, los detergentes aniónicos llevan un
 grupo cargado negativamente en su molécula, en tanto que los detergentes no ióni-
 cos poseen un grupo polar sin carga.

Los detergentes en el agua tienden a formar micelas, y cuando se ponen en
 contacto con la membrana se asocian con ella insertando sus porciones no polares;
 esta unión rompe las interacciones hidrofóbicas existentes entre las proteínas y
 lípidos circundantes destruyéndose la bicapa lipídica. Las proteínas son libera-
 das en forma de complejo con moléculas de detergente y unos cuantos lípidos; los
 lípidos son solubilizados también por el detergente en forma de micelas.

El grado de daño ocasionado a la membrana depende del tipo y concentra-
 ción de agente tensoactivo. Al perturbarse de esta manera la organización es-
 tructural de la membrana sobreviene pérdida de su permeabilidad manifestándose
 en la liberación de metabolitos intracelulares, bloqueo en el transporte activo
 y del metabolismo energético; cuando el daño es severo ocurre la destrucción to-
 tal de la membrana y la lisis celular. Estas propiedades han hecho de los deter-
 gentes candidatos en el empleo como agentes bactericidas.

En esta práctica ensayaremos la actividad hemolítica de los detergentes
 siguiendo espectrofotométricamente la liberación de hemoglobina a partir de las
 células rojas. Se emplearán diferentes concentraciones de agente tensoactivo.

MATERIAL Y REACTIVOS

Sangre humana fresca
 Gradilla
 Jeringa y aguja estériles
 1 tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante
 20 tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de hule
 2 pipetas graduadas de 5 ml
 1 pipeta graduada de 1 ml
 3 pipetas graduadas de 0.1 ml
 1 pipeta Pasteur con bulbo de caucho
 1 matraz Erlenmeyer de 50 ml
 1 centrifuga
 1 Baño de agua
 1 espectrofotómetro

Solución Salina: NaCl 0.85 %; Dissolver 0.85 gramos de NaCl en 100 ml de agua des-
 tilada.

Soluciones de detergente al 1%: Dissolver 0.1 gramos de detergente en 10 ml de
 agua destilada. Los detergentes que se emplearán serán Tween-80
 Tritón X-100, Cetrimida, Dodecil-sulfato de sodio (SDS) y
 Desoxicolato de sodio.

Solución anticoagulante: Citrato de Sodio al 4%: Dissolver 0.2 gramos de citrato
 de sodio en 5 ml de agua destilada. Distribuir volúmenes de
 0.5 ml en tubos de ensaye de 13 x 100.

RESULTADOS

1.- Registre enseguida la dilución a la que se preparó la suspensión de eritrocitos empleada en el ensayo. Así mismo anote la densidad óptica considerada como el 100% de Hemólisis.

Dilución: _____
D.O. a 540 nm: _____

2.-Registre las densidades ópticas debidas a la liberación de hemoglobina tras la lisis eritrocítica causada por las distintas dosis de detergentes.

| DETERGENTE | D.O. 540 | | |
|--------------------------|----------|-------|-------|
| | 10 µl | 30 µl | 50 µl |
| TWEEN-80 | | | |
| CETRIMIDA | | | |
| DODECIL SULFATO DE SODIO | | | |
| DESOXICOLATO DE SODIO | | | |

3.-Calcule los porcentajes de hemólisis para las concentraciones ensayadas de cada uno de los detergentes.

| | | | |
|--------------------------|--|--|--|
| DODECIL SULFATO DE SODIO | | | |
| DESOXICOLATO DE SODIO | | | |

4.- Construya en papel milimétrico una gráfica de dosis-respuesta, anotando en las abscisas el volumen de detergente utilizado, y en las ordenadas el porcentaje de hemólisis ocasionado.

MÉTODOS

- 1.- Colectar 5 ml de sangre humana con una jeringa estéril y transferirla a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8%.
- 2.- Mezclar suavemente por inversión para no causar hemólisis.
- 3.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.- Eliminar el suero con una pipeta Pasteur.
- 5.- Lavar dos veces el paquete celular con NaCl al 0.85%.
- 6.- Resuspender el paquete celular con NaCl 0.85%, ajustando al volumen original de sangre.
- 7.- Preparar diluciones de la suspensión de eritrocitos de manera que cuando se adicionen 0.5 ml de la dilución a 4.5 ml de Triton X-100 al 1%, el sobrenadante obtenido después de centrifugar, muestre una absorbancia de 0.8 - 0.9 a 540 nm. El valor de absorbancia obtenido se considerará como el 100% de lisis; por lo que el porcentaje de hemólisis ocasionado por los diferentes agentes podrá calcularse a partir de este valor.
- 8.- La suspensión de eritrocitos deberá diluirse con NaCl al 0.85% a la dilución que mostró el valor de densidad óptica recomendado anteriormente.
- 9.- Preparar cuatro series de 3 tubos de ensaye de 13 x 100 mm, y adicionarles 4.5 ml de NaCl 0.85%.
- 10.- Añadir a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión diluida de eritrocitos, y mezclar de la forma ya indicada.
- 11.- A cada uno de los tres tubos de ensaye de la primera serie añadirles 10, 30 y 50 µl respectivamente de Tween-80 al 1%. Mezclar cuidadosamente por inversión e incubar los tubos en baño de agua durante 20 minutos.
- 12.- De manera similar proceder con las tres series de tubos restantes, empleando los agentes tensioactivos como sigue:
 - 2a. serie de tubos: Cetrimida al 1%
 - 3a. serie de tubos: Dodecil sulfato de sodio al 1%
 - 4a. serie de tubos: Desoxicolato de sodio al 1%
- 13.- Después de la incubación, centrifugar todos los tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células que permanecieron intactas.
- 14.- Determinar la absorbancia de todos los sobrenadantes a 540 nm en un espectrofotómetro.
- 15.- Registrar los valores.