

¿Qué relación formaldehído/acetaldehído no ocasionará entrecruzamiento en las moléculas de la proteína caseína?

Beatriz Michelle Cortes, María Luisa Navarro, Raquel Martínez, Anabel Escalada, Jesús Morán
Colegio Marymount de Cuernavaca
colegio@marymount.edu.mx
Asesor: Dra. María Brenda Valderrama
Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Mor.

Resumen:

Las bebidas alcohólicas adulteradas naturalmente son una mezcla de etanol contaminado con metanol. En nuestro cuerpo, una misma enzima llamada alcohol-deshidrogenasa metaboliza tanto etanol como metanol. Al ser metabolizado el metanol es transformado en formaldehído, un producto tóxico para el organismo. El etanol es metabolizado en acetaldehído, el cual es inofensivo. El objetivo de este proyecto fue encontrar la mínima relación formaldehído/acetaldehído en la que no ocurre entrecruzamiento en las moléculas de la proteína caseína. Mediante el uso de una técnica de electroforesis y un programa computacional para analizar intensidad de bandas llamado GelEval, fue posible observar que la proteína caseína sufre entrecruzamiento en sus moléculas en la presencia de formaldehído. Por lo tanto, se pudo comprobar que el metanol presente en bebidas alcohólicas adulteradas ocasiona daños en el cuerpo al ser ingerido. Al final de nuestro proyecto se encontró que se debe tener una relación formaldehído/acetaldehído menor a 0.016 para que no ocurra entrecruzamiento en las moléculas de la proteína caseína.

Introducción

Una bebida adulterada es una mezcla de etanol contaminado con metanol. Al ser metabolizado el metanol es transformado en formaldehído, un producto tóxico para el organismo. El etanol es metabolizado en acetaldehído, el cual es inofensivo. La novedad de este proyecto consistió en encontrar la relación acetaldehído/formaldehído en la que no ocurre entrecruzamiento en las moléculas de la proteína caseína. Dado que el cuerpo humano está formado en gran parte por proteínas, esto permite relacionar la ausencia de entrecruzamiento en la proteína con la ausencia de daño en un organismo.

La pregunta al inicio de este proyecto era: ¿qué relación metanol/etanol no causará daño en el organismo? Sin embargo, no era posible contestar esta interrogante experimentando en animales, y mucho menos en humanos. El principal reto fue encontrar un sistema experimental que fuera ético, accesible en tiempo y barato. Dado que el formaldehído y el

acetaldehído son los productos metabolizados del metanol y el etanol, y gran parte de nuestro cuerpo está conformado por proteínas, se decidió diseñar un modelo experimental para observar el entrecruzamiento que el formaldehído ocasionaba en la proteína caseína, y así relacionarlo con el daño que el metanol ocasiona en nuestro cuerpo. En lugar de encontrar la mínima relación metanol/etanol que no causaría daño, se optó por buscar mejor la mínima relación formaldehído/acetaldehído que no ocasionaba entrecruzamiento en la proteína caseína. Se buscó esta relación debido a que al tratar de traducir esta información a la concentración de metanol/etanol en un modelo de bebida adulterada se debían tomar en cuenta diversos factores que hacían de éste un planteamiento más complejo. No solo se debía tomar en cuenta la cinética enzimática que se encontraba detrás de este proceso, sino que también se debían de analizar la variabilidad del porcentaje de metanol que fue excretado inocuamente por la orina a causa de la presencia de etanol, el cual actúa como inhibidor enzimático de la transformación de metanol.

Antecedentes

El metanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$), también conocido como alcohol metílico o alcohol de madera, es el alcohol más sencillo (Figura 1). Comúnmente es utilizado como solvente orgánico y está presente en productos como removedores de pintura, soluciones de limpieza, colorantes, resinas, adhesivos, productos de impermeabilización, productos de fotografía, anticongelantes y hasta en bebidas alcohólicas (Lemke y Williams, 2007; Gutiérrez, 2003).

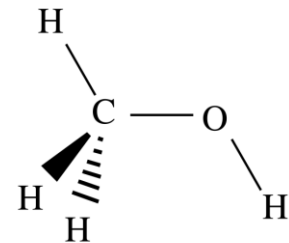


Figura 1. Molécula de metanol

El contenido de etanol de una bebida alcohólica que no se ha sometido a buenos controles de calidad y sanidad puede estar contaminado con metanol. La contaminación con metanol se produce en el momento de la fermentación de los jugos, durante la cual, además de etanol, se producen también cantidades variables de metanol y otros compuestos volátiles.

La ingesta de metanol por humanos es altamente peligrosa, pues puede resultar en acidosis metabólica, secuencias neurológicas o la muerte (Korabathina et al, 2009). Aunque el metanol se ingiere generalmente por vía oral, también puede ser absorbido por la piel o inhalado. La dosis letal es de aproximadamente 30-240 ml. La dosis tóxica mínima es de 100 mg/kg (Gutiérrez, 2003).

Cuando una persona ingiere metanol, éste se distribuye rápidamente por el agua del cuerpo; por tal razón, los primeros órganos dañados son aquellos ricos en agua, como el cerebro, el humor acuoso y el riñón. La vida media del metanol oscila entre 2 y 3 horas en concentraciones bajas y 27 horas en concentraciones altas. Sin embargo, apenas 3 % del metanol ingerido es excretado sin cambios por el riñón. La vida media del formaldehído es de aproximadamente 1-2 minutos. Posteriormente el formaldehído es metabolizado por el aldehído deshidrogenasa a ácido fórmico. El ácido fórmico es después oxidado a CO_2 y H_2O en la presencia de tetrahidrofolato, pero el proceso, al ser muy lento, promueve la acumulación de ácido fórmico en el cuerpo. Ésta es la razón de la acidosis metabólica (reducción de pH y niveles

de bicarbonato en la sangre). El formato, en cambio, es la causa principal de la ceguera, ya que ocasiona daño al nervio óptico (Korabathina *et al*, 2009).

Los síntomas de intoxicación por ingesta de metanol son al inicio parecidos a los de una intoxicación por etanol. Sin embargo, después del periodo de latencia, los individuos intoxicados comienzan a presentar náusea, vómito, dolores de cabeza y dolor epigástrico. Estos síntomas también pueden acompañarse por pérdida de la visión (Korabathina *et al*, 2009). El periodo de latencia después de la ingesta de metanol dura alrededor de 12 horas, aunque puede ser mayor cuando etanol es ingerido concurrentemente con el metanol (Gutiérrez, 2003).

Al ser metabolizado el etanol se produce acetaldehído; al ser metabolizado el metanol, formaldehído. El metanol en sí no es tóxico, pero sí lo es el formaldehído que ocasiona daño a las proteínas entrecruzando sus moléculas.

La técnica de inhibición competitiva es utilizada como base de un tratamiento para contrarrestar la intoxicación por metanol: De acuerdo a Stoker, un inhibidor enzimático es una sustancia que desacelera o detiene la función catalizadora normal de una enzima uniéndose a ella. El inhibidor enzimático debe ser una molécula lo suficientemente parecida al sustrato inicial de la enzima en forma y distribución de la carga como para competir con el sustrato inicial por la ocupación del sitio activo de la enzima (2008). En la figura 2 se plasma una explicación gráfica del principio de la inhibición competitiva. La enzima alcohol-deshidrogenasa metaboliza tanto metanol como etanol. La enzima no es sólo 10 veces más afín al etanol que el metanol, sino que la velocidad de la reacción es 10 veces más rápida; permitiendo que la transformación de etanol en acetaldehído sea 100 veces más efectiva que la de metanol en formaldehído (Stoker, 2008). Por consiguiente, si cierta cantidad de metanol se encuentra presente en el cuerpo, al administrarse etanol la enzima alcohol-deshidrogenasa metabolizará una mayor proporción de etanol en acetaldehído, mientras tanto, el metanol, que no fue metabolizado por la enzima, será secretado del cuerpo antes de ser metabolizado en formaldehído.

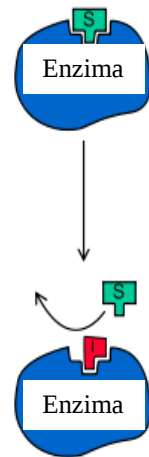


Figura 2: Inhibición competitiva

El daño que ocasiona en un organismo la ingesta de metanol puede ser determinado en la medida en que las moléculas de una proteína sufren entrecruzamientos por causa del formaldehído. Una proteína es una molécula estructural de todos los organismos. El formaldehído puede combinarse con cierto número de grupos funcionales de las proteínas, formando en muchos casos puentes de unión entre las proteínas. Es por esto que el formaldehído es un fijador polimerizante (Figura 3).

Al establecerse entrecruzamientos en una proteína por causa del formaldehído, se crean nuevos enlaces covalentes, puentes de hidrógeno o puentes bisulfuro que desnaturalizan a ésta, es decir, que alteran su estructura provocando un mal funcionamiento de ésta. Cuando una proteína no lleva a cabo su función apropiadamente, se afecta a la células que forman tejidos,

los cuáles se acoplan para desarrollar órganos; llevando a un disfuncionamiento de un órgano, que podría ocasionar la muerte.

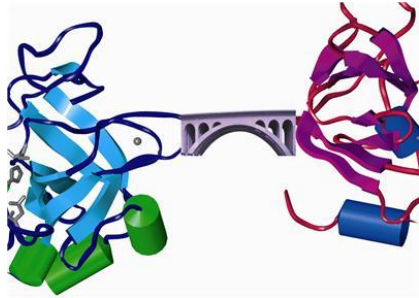


Figura 3. Dos moléculas proteicas se entrecruzan, formando un componente de mayor peso molecular.

La proteína que se utilizó para este proyecto fue la caseína, debido a que su proceso de purificación es sencillo y de fácil extracción. Además, el número de aminoácidos que componen a esta proteína la hace adecuada para los propósitos de este proyecto debido a que el poseer 169 aminoácidos es una molécula de bajo peso molecular, pero aún así representativa. También, la presencia de dos grupos de cisteína permite a esta molécula ser muy reactiva y crear puentes bisulfuro entre unidades de caseína.

Durante este proyecto, los entrecruzamientos en la proteína fueron medidos mediante la utilización de una técnica llamada electroforesis (Figura 4). La electroforesis es una técnica de separación moléculas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una malla porosa (Nelson, 2001). De acuerdo a Nelson, la movilidad electroforética es proporcional al cociente de su carga y masa. Este procedimiento permite analizar el número de entrecruzamientos que hay en una proteína debido a que se generan diferentes bandas con masas distintas en la placa de electroforesis.

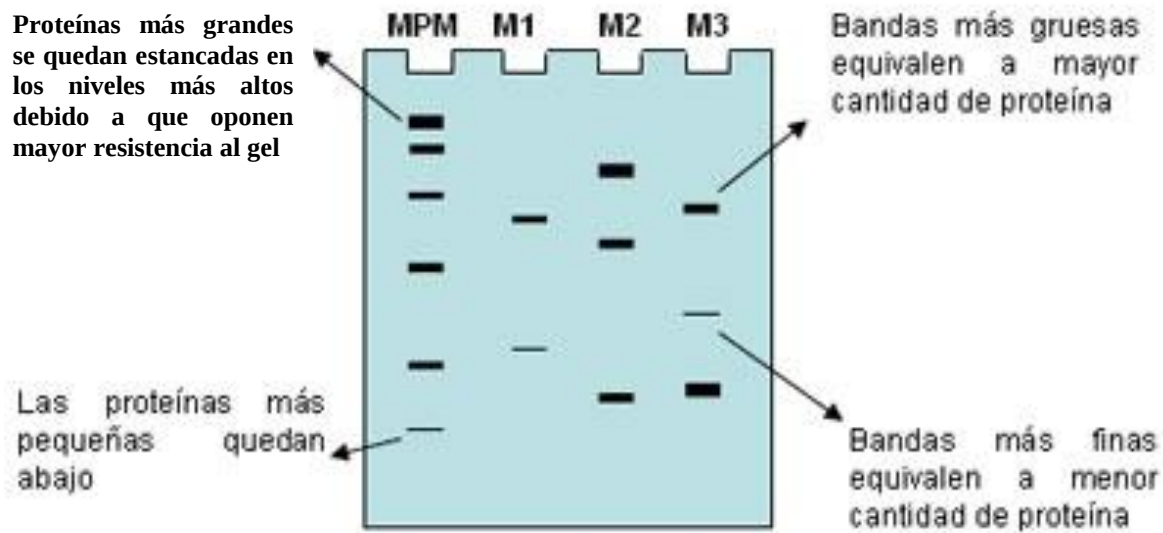


Figura 4. Explicación gráfica de técnica de electroforesis (Martini, 2006).

Un aparato de electroforesis tiene dos polos, uno positivo inferior y uno negativo superior. Las proteínas que van a ser analizadas ya han sido cargadas negativamente con anterioridad (por medio de SDS); por lo tanto, al pasar por el aparato una corriente eléctrica, las proteínas migrarán hacia la parte inferior. Sin embargo, las proteínas se insertan en el aparato de electroforesis junto con un gel (en nuestro caso, de poliacrilamida). El gel actúa como una malla que impide el paso de las moléculas de mayor tamaño, pero que permite que las moléculas de menor tamaño atraviesen más fácilmente. Cuando una proteína ha sufrido entrecruzamientos en sus moléculas, se observará una mayor cantidad de proteína en la parte superior de la placa de electroforesis.

Hipótesis

Existe una relación formaldehído/acetaldehído que no causará entrecruzamiento en las moléculas de una proteína.

Objetivos

General

Determinar la formaldehído/acetaldehído que causará entrecruzamientos en las moléculas de la proteína caseína.

Específicos

1. Purificar caseína de la leche.
2. Comprobar que no existan entrecruzamientos en la caseína purificada.
3. Agregar diversas concentraciones de formaldehído a la caseína y analizar el patrón de entrecruzamiento mediante electroforesis.
4. Realizar diversas mezclas con concentraciones de formaldehído y acetaldehído y aplicarlas a la caseína, para después analizar el patrón de entrecruzamiento mediante electroforesis.
5. Encontrar una relación formaldehído/acetaldehído en la cual no habrá entrecruzamiento en las moléculas de la caseína.

Metodología

Lugar: laboratorio de la Dra. María Brenda Valderrama en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

1. Se purificó caseína a partir de 50 ml de leche Lala Silhouette. Se utilizó esa leche pues tiene menos grasa y por lo tanto fue más fácil separar la proteína. Puede consultarse el protocolo de la purificación en el Anexo 1.
2. *Electroforesis 1*: Se corrió una electroforesis de 3 réplicas de caseína pura (22.5 mg/ml), con el objeto de comprobar que no hubiera ningún tipo de entrecruzamiento ocasionado por la purificación, previo a la adición de formaldehído o de las mezclas formaldehído/acetaldehído.
3. *Electroforesis 2*: Se prepararon 6 muestras de caseína agregando una concentración diferente de formaldehído a cada una (Tabla 1). Una de las muestras fue un control de

caseína sin formaldehído. Esto se realizó para comprobar el daño ocasionado a la proteína por el formaldehído.

4. Se seleccionaron 3 bandas para analizar en la electroforesis, de acuerdo con su masa molecular (KDa). (Figura 5).

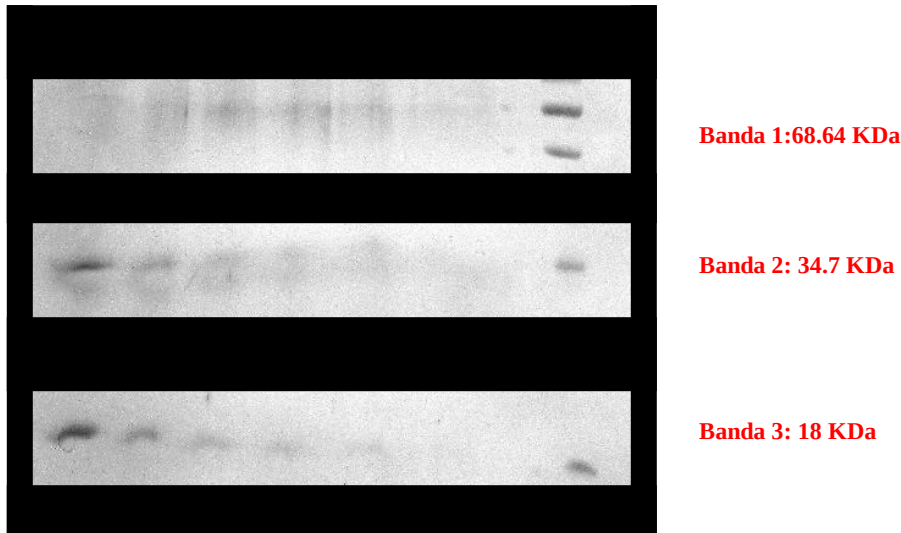


Figura 5. Representación de ubicación de bandas en electroforesis formaldehído/caseína.

5. Se analizó la masa molecular (en KDa) de cada una de las bandas de la electroforesis 2 formaldehído/caseína, utilizando gráficas asociadas a la migración relativa del carril de los marcadores. Esto se realizó para comprobar que las bandas superiores tenían una masa molecular mayor a la de las bandas inferiores. El procedimiento puede consultarse en el Anexo 2.
6. Se analizaron los entrecruzamientos en la caseína con diferentes concentraciones de formaldehído. Utilizando un programa computacional llamado GelEval (densitómetro), se midieron los cambios de intensidad en las bandas de la electroforesis 2 (Figura 6).
7. Se graficó el exceso molar formaldehído/caseína de cada una de las muestras contra el cambio de intensidad de las bandas observadas en la electroforesis 2 y se analizó el cambio en la intensidad de las bandas 1, 2 y 3 de la electroforesis 2 formaldehído/caseína al aumentar el exceso molar (Gráfica 1).
8. *Electroforesis 3:* Se prepararon 7 muestras nuevas de caseína con diferentes concentraciones de formaldehído en cada una (Tabla 2). Las concentraciones se redujeron y fueron menores a las utilizadas en la electroforesis anterior de formaldehído/caseína. Una de las muestras fue un control de caseína sin formaldehído.
9. Dado que no fue posible realizar un análisis cuantitativo de la electroforesis 3, se llevó a cabo un análisis cualitativo para determinar si existía una concentración de formaldehído en la cual no se observara entrecruzamiento en la proteína.
10. *Electroforesis 4:* Se realizaron 8 muestras de caseína agregando diferentes mezclas de formaldehído/acetaldehído a cada una de ellas (Tabla 3). Esto se realizó porque una bebida alcohólica adulterada contiene una mezcla de metanol/etanol, y por lo tanto sus

dos productos metabolizados estarán presentes en el cuerpo. La concentración de acetaldehído agregada se mantuvo constante en todas las muestras (1.7µl), mientras que las diferentes concentraciones de formaldehído fueron iguales a las utilizadas en la electroforesis 3 (formaldehído/caseína). Se propuso la concentración de 1.7 µl debido a que éste está asociado al mayor exceso molar encontrado en las muestras de la electroforesis 2 en las cuales sólo se analizaron los entrecruzamientos de la proteína en presencia de diferentes concentraciones de formaldehído.

11. Dado que no fue posible realizar un análisis cuantitativo de la electroforesis 4, se llevó a cabo un análisis cualitativo para determinar si el agregar acetaldehído ocasionaba algún cambio en el entrecruzamiento provocado en la proteína por el formaldehído. También se buscó si existía una relación formaldehído/acetaldehído en la cual no se observara entrecruzamiento en la proteína.

En la figura 6 se muestra esquemáticamente la metodología realizada para este proyecto de investigación.

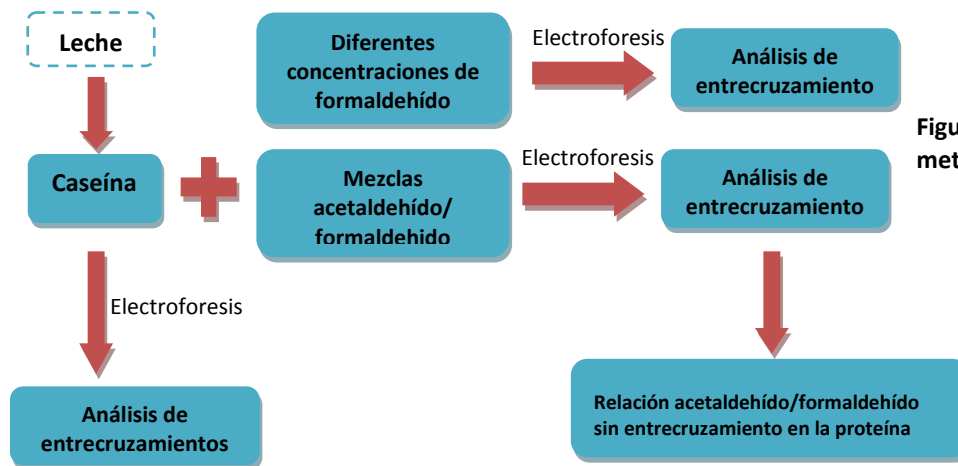


Figura 6. Explicación gráfica de la metodología.

Resultados

1. Electroforesis 1, de tres réplicas de caseína pura:

Se observó la ausencia de entrecruzamientos en la proteína caseína pura (Figura 7). Se comprobó que al purificar la caseína de la leche, la proteína no había sufrido entrecruzamiento en sus moléculas durante el proceso. Dado que se utilizó una concentración de 5 mg/ml, las bandas de esta muestra se ven más intensas que las que se destacan en el inciso 2 (electroforesis de caseína con formaldehído), pero la migración relativa de ambas es la misma.

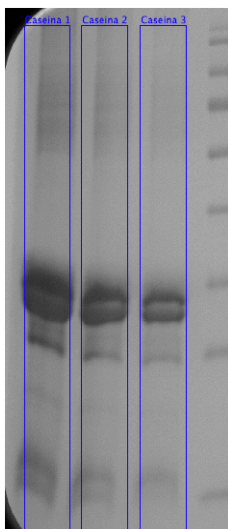


Figura 7. Electroforesis de la caseína pura. Tres réplicas.

2. Electroforesis 2, de las primeras muestras de caseína a las que se agregaron diferentes concentraciones de formaldehído:

Se agregaron diferentes concentraciones de formaldehído a la proteína caseína para observar si ocurría entrecruzamiento en sus moléculas, y de ser así, observar el cambio en el entrecruzamiento de sus moléculas conforme la concentración de formaldehído aumentaba. Se utilizó un control de caseína sin formaldehído. Las diferentes pruebas realizadas pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferentes concentraciones de formaldehído agregadas a caseína

	Control	1	2	3	4	5
Caseína concentrada a 1.25 mg/ml(μ l)	50	50	50	50	50	50
Hepes/NaCl/EDTA (μ l)	70	60	50	40	30	10
Paraformaldehído (μl)	0	10	20	30	40	60
Exceso molar formaldehído/caseína	0	0.023	0.0464	0.0704	0.0927	0.139

Después, se corrió la electroforesis de las muestras, la cual se observa en la Figura 8. Se observó que, en el gel de electroforesis, al aumentar la concentración de formaldehído había una mayor cantidad de proteína concentrada en la parte superior del gel. Se cuantificó por medio del programa computacional GelEval el cambio de intensidad de las bandas.

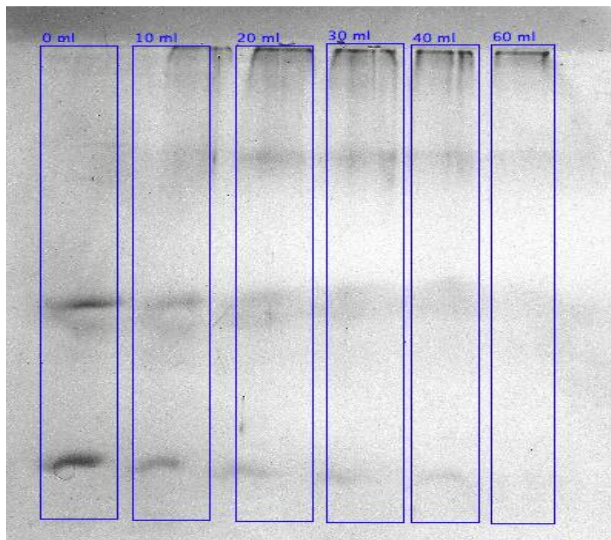


Figura 8. Electroforesis de caseína con formaldehído, variando las concentraciones de formaldehído. Las diferentes concentraciones se observan en la parte superior.

Al graficar el exceso molar formaldehído/caseína contra el cambio de intensidad de las bandas (Figura 9), se observó lo siguiente:

- Conforme aumentaba el exceso molar formaldehído/caseína, la intensidad de la banda 1 también aumentaba.
- Conforme aumentaba el exceso molar formaldehído/caseína, la intensidad de las bandas 2 y 3 disminuía, hasta que éstas desaparecían casi por completo.
- Después de la segunda muestra (exceso molar 0.046), la intensidad de la Banda 1 comenzaba a bajar porque mayor cantidad de proteína se concentraba en puntos aún más arriba de la Banda 1, los cuales se encontraban barridos y no fue posible cuantificar.

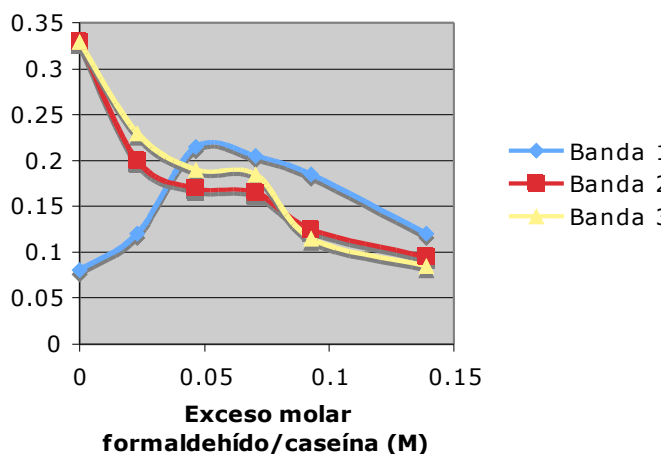


Figura 9. Cambio de intensidad de bandas en electroforesis de caseína con diferentes concentraciones de formaldehído.

- Electroforesis 3, de las muestras de caseína a las que se agregaron diferentes concentraciones de formaldehído, menores a las agregadas en la electroforesis 2:

Se realizó una nueva electroforesis de caseína con diferentes mezclas de formaldehído, pero se redujeron las concentraciones hasta el volumen mínimo que podía ser agregado con micropipeta, con el objeto de encontrar la mínima concentración en la que no se observará entrecruzamiento en la proteína. Nuevamente, se utilizó un control sin formaldehído (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones mínimas de formaldehído con caseína

	Control	Experimento					
	1	2	3	4	5	6	7
Caseína 3 mg/ml (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Hepes/NaCl/EDTA (μl)	70	67.5	65	60	50	40	69
Paraformaldehído al 4% (μl)	0	2.5	5	10	20	30	1
Exceso molar formaldehído/caseína (M)	0	0.006	0.012	0.023	0.046	0.070	0.002

Seguidamente, se corrió la electroforesis de las diferentes muestras (Figura 10). Sin embargo, no fue posible cuantificar el cambio de intensidad de las bandas para determinar la relación entre el entrecruzamiento y la cantidad agregada de formaldehído, pues las muestras en una misma banda tenían diferente intensidad y algunas estaban difusas. Por lo tanto, se realizó un análisis cualitativo: fue evidente que ni siquiera en la menor concentración agregada de formaldehído (2.5 μl) hubo ausencia de entrecruzamiento. En las muestras a las que se había agregado formaldehído (2-7), en ningún momento desaparecieron las bandas superiores, que sí están ausentes en la muestra sin formaldehído (1).

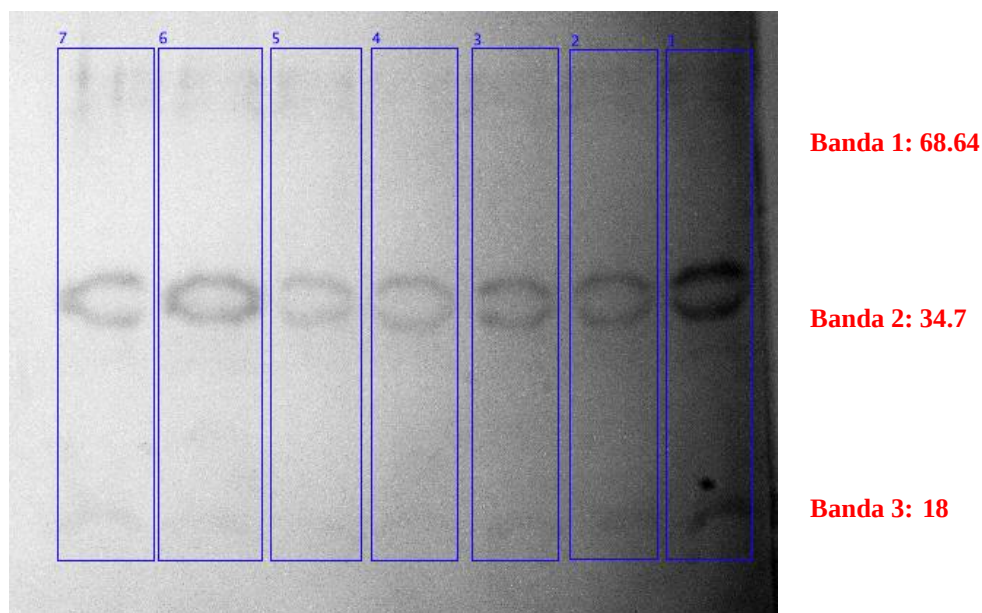


Figura 10. Electroforesis 3, de caseína con concentraciones menores de formaldehído.

4. *Electroforesis 4, de las muestras de caseína a las que se agregaron diferentes mezclas de formaldehído/acetaldehído:*

Dado que, al ingerir una bebida alcohólica adulterada con una mezcla metanol/etanol, en nuestro cuerpo encontraremos también una mezcla de sus productos metabolizados acetaldehído/formaldehído, se agregó una concentración fija de 1.7 μ l de acetaldehído a las concentraciones de formaldehído que se habían añadido anteriormente a la caseína (Tabla 3). Se utilizaron dos controles: uno de caseína pura y uno sin paraformaldehído.

Tabla 3. Concentraciones mínimas de formaldehído con volúmenes fijos de acetaldehído en caseína.

	Control		Experimento					
	1	2	3	4	5	6	7	8
Caseína 3 mg/ml (μ l)	50	50	50	50	50	50	50	50
Hepes/NaCl/EDTA (μ l)	70	68.3	65.8	63.3	58.3	48.3	38.3	67.3
Paraformaldehído al 4% (μ l)	0	0	2.5	5	10	20	30	1
Acetaldehído (μ l)	0	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7

En la figura 11 se puede observar la electroforesis 4, de caseína con diferentes mezclas de formaldehído/acetaldehído. Al igual que la electroforesis 3, no fue posible cuantificar el cambio de intensidad de las bandas. Sin embargo, fue posible ver que tampoco en ninguna muestra hubo ausencia de entrecruzamiento.

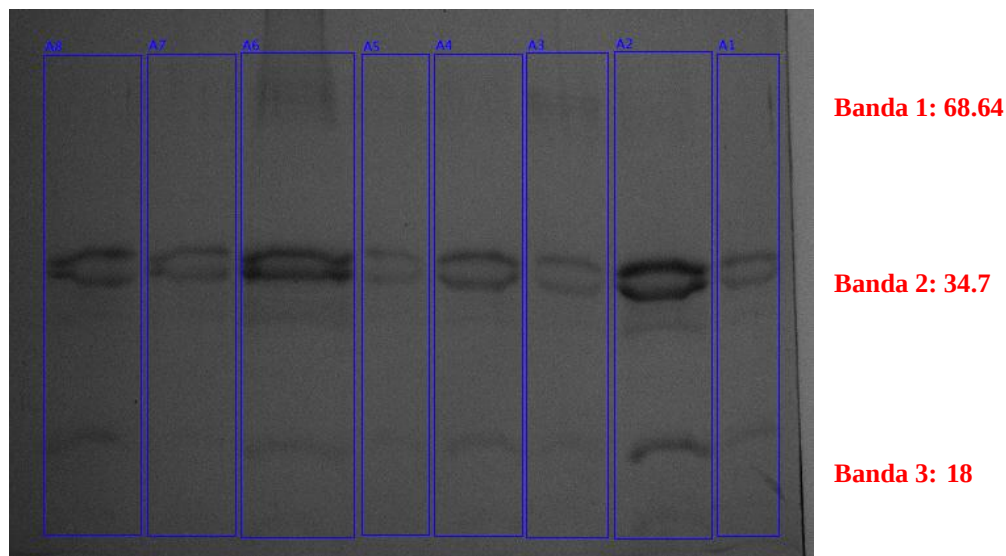


Figura 11. Electroforesis 4, de caseína con concentraciones de formaldehído y acetaldehído.

Discusión

En primer lugar, el análisis por cambio de intensidad de las bandas de la electroforesis 2 formaldehído/caseína permitió comprobar el daño que ocasionaba el formaldehído en una proteína. Se demostró que al aumentar el exceso molar formaldehído/caseína (la concentración de formaldehído agregada a la proteína) aumentaba el entrecruzamiento en las moléculas de la proteína caseína. La intensidad de las bandas inferiores disminuía y la de la banda superior aumentaba porque la proteína se estancaba en la parte superior al entrecruzarse sus moléculas y aumentar su peso molecular. Cuando las moléculas de la proteína se entrecruzaban, ya no les era posible atravesar el gel de poliacrilamida.

Tras haber analizado las masas moleculares de cada una de las bandas de la electroforesis 2 (Anexo 2), se comprobó que las bandas 2 y 3 presentaban menor masa molecular que la banda 1. Se pudo comprobar que al incrementar la intensidad de la banda 1, se acumulaba una mayor cantidad de moléculas con masa de 68.84 KDa; mientras que al disminuir las bandas 2 y 3, los componentes de masas de 34.7 y 18 KDa disminuían, entrecruzándose para formar los componentes de la banda 1.

El análisis del cambio de intensidad de las bandas en las muestras de los geles de electroforesis 3 y 4 no pudo ser cuantificado porque cada carril tenía una diferente intensidad; además, la resolución de la imagen era muy mala. Esto pudo haber ocurrido por diversas causas: un error de pipeteo (se inyectaron diferentes cantidades de solución en cada muestra), se diluyó mal la caseína al momento de realizar las soluciones, o también la caseína pudo haberse degradado.

Sin embargo, la electroforesis 3 y la electroforesis 4 pueden resultar, en cierta manera, más confiables que la electroforesis 2 al momento de comprobar cualitativamente si ocurría entrecruzamiento en las moléculas de la proteína. La proteína está distribuida y separada de la misma manera en la electroforesis 1 de caseína pura que en las electroforesis 3 y 4. Se observa definida, mientras que en la electroforesis 2 las separaciones están difusas.

A partir del análisis cualitativo de la electroforesis 3, pudo concluir que aún con un exceso molar formaldehído/caseína de 0.0023 M, en una solución de caseína con formaldehído, ocurre entrecruzamiento en las moléculas de la proteína caseína.

A partir del análisis cualitativo de la electroforesis 4, se llegó a la conclusión de que se debe tener una relación formaldehído/acetaldehído menor a 0.016 moles de formaldehído por cada mol de acetaldehído para que no ocurra entrecruzamiento en la proteína. Para encontrar una relación formaldehído/acetaldehído exacta a partir de la cual ya no ocurra entrecruzamiento en la proteína, sería necesario realizar más electroforesis con concentraciones más bajas de formaldehído. Sin embargo, para este proyecto el tiempo representa una limitante. Se sugiere a proyectos futuros relacionados a modelos de bebidas adulteradas que se parta de un modelo fijo de bebida (a concentraciones conocidas de

metanol/etanol) y que en base a éste se considere la porción de metanol transformada en formaldehído y la inocua. Se propone analizar los entrecruzamientos provocados solamente por el formaldehído producido en ese modelo de bebida adulterada preestablecido.

Conclusiones

Se comprobó que el daño ocasionado en una proteína por la presencia de formaldehído puede observarse en la medida en que las concentraciones de este compuesto ocasionan entrecruzamiento en las moléculas de una proteína.

Se llegó a la conclusión de que para que no ocurra entrecruzamiento en la proteína caseína se debe tener una relación formaldehído/acetaldehído menor a 0.016, es decir, 0.016 moles de formaldehído por cada mol de acetaldehído.

Agradecimientos

Agradecemos a nuestra asesora la Dra. María Brenda Valderrama y a su equipo de trabajo. Agradecemos también a nuestro profesor Enrique Galindo por sus sugerencias y tiempo.

Bibliografía

- Gutiérrez, M. (2003). *Intoxicación por metanol*. En: Guías para Manejo de Urgencias, Tomo II. Capítulo XII. pp. 606-610. Editores: Ministerio de Protección Social. Federación Panamericana de Facultades de Medicina. Academia Nacional de Medicina. Bogotá, Colombia. ISBN 958-97263-48. (Recuperado el 27 de febrero de 2011 de http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:FSYf-P2mpe8J:www.bio-nica.info/Biblioteca/Gutierrez-Intoxicacion-Metanol.pdf+metanol&hl=es-419&gl=mx&pid=bl&srcid=ADGEESgcKZQpU_N0WGUfmb0rWaAPoqcMxfeokRnbYddMRDMY29PKyHfoDBRLUc-RTu_jB5demK-nAtOWkcfzMutmuKbUqVf3CvnKyBBEoGkLZrgNmmzkDUxum3JBETzpJG0uOoGhrZvV&sig=AHIEtbQMBsGVnsB5F-Hr8MdyDDh2hoeGJ_A).
- Korabathina, K., Benbadis, S.R., Kikosky, D. (2009). *Methanol*. (Recuperado el 27 de febrero de 2011 de <http://emedicine.medscape.com/article/1174890-overview>)
- Lemke, L.T., Williams, D.A. (2007). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pg. 281, ISBN-10: 0781768799
(Recuperado el 27 de febrero de 2011 de <http://books.google.com.mx/books?id=NHQQBMM-qMEC&lpg=PA281&ots=ZTTwQ1lx4B&dq=methanol%20formaldehyde%20enzyme%20chemistry&hl=en&pg=PA281#v=onepage&q&f=false>)
- Martini, M. (2006). *¿Cómo estudiar la expresión de diversos genes?* Página en línea de la Alianza para la educación Educar. (Recuperado el 01 de mayo de 2011 de http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/influencia-de-las-tic/tecnologia-del-adn-recombinante/como_estudiar_la_expresion_de.php)
- Nelson, D. L. (2001) *Principios de Bioquímica Lehninger*, Editorial Omega 5ta. Edición, Barcelona, España, págs. 88 y 89.
- Stoker, S. (2008). *General, Organic, and Biological Chemistry*. Brooks Cole, USA, pg. 710, ISBN-10: 0547152817.
(Recuperado el 27 de febrero de 2011 de http://books.google.com.mx/books?id=Yig6eLv_O4MC&pg=PA710&dq=methanol+formaldehyde+enzyme+chemistry&hl=es&ei=6GFqTaHIKli6sAO6qb3hCg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6&ved=0CEgQ6AEwBQ#v=onepage&q&f=false)

Anexo 1.

Purificación de la caseína a partir de la leche

1. Calentar en un vaso de precipitado 150ml de agua destilada a 38°C.
2. Añadir 50ml de leche Lala Silhouette.
3. Gota a gota y con agitación, adicionar ácido acético 1M hasta que se observe que se forma un precipitado (la leche se corta).
4. Monitorear PH cada 2 min. durante 20 min. (Cambio de 7 a 4).
5. Dejar sedimentar.
6. Filtrar utilizando bomba de vacío. Al desechar el líquido, queda un precipitado blanco que es la caseína.

Anexo 2.

Cálculo de masa molecular y migración relativa de bandas en electroforesis formaldehído/caseína

Se analizaron las concentraciones moleculares de cada uno de los marcadores de peso molecular (Tabla A2) utilizando gráficas asociadas a la migración relativa de la proteína que están vinculadas con los marcadores que se utilizaron, con el objetivo de definir la masa molecular de cada una de las bandas analizadas en la electroforesis. (Figura A1 y figura A2).

Se introdujeron los valores de las migraciones relativas de las bandas detectadas durante la electroforesis en las ecuaciones planteadas a partir de los marcadores y se estableció una masa molecular para cada una de las bandas (en KDa). Esto puede observarse en la Tabla A1.

Tabla A1

Banda	Migración relativa(en mm)	Masa molecular (en KDa)	Ecuación utilizada
Banda 1	27.5	68.64	$y = -0.0381x + 5.2767$
Banda 2	60.2b	34.7	$y = -0.0164x + 4.5307$
Banda 3	100	18	$y = -0.0164x + 4.5307$

Tabla A2

masa molecular	migración relativa	log en base 10 de masa mol
170	6	5.135798437
130	10	4.86753445
95	17	4.553876892
72	25	4.276666119
55	35	4.007333185
43	46	3.761200116
34	60	3.526360525
26	75	3.258096538
17	106	2.833213344

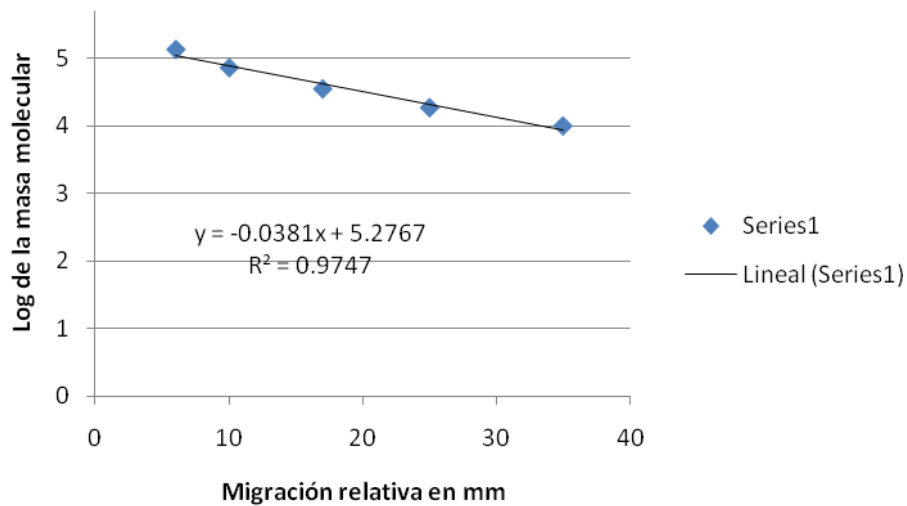


Figura A1. Cálculo de las masas moleculares de los marcadores que van de 6mm a 35mm

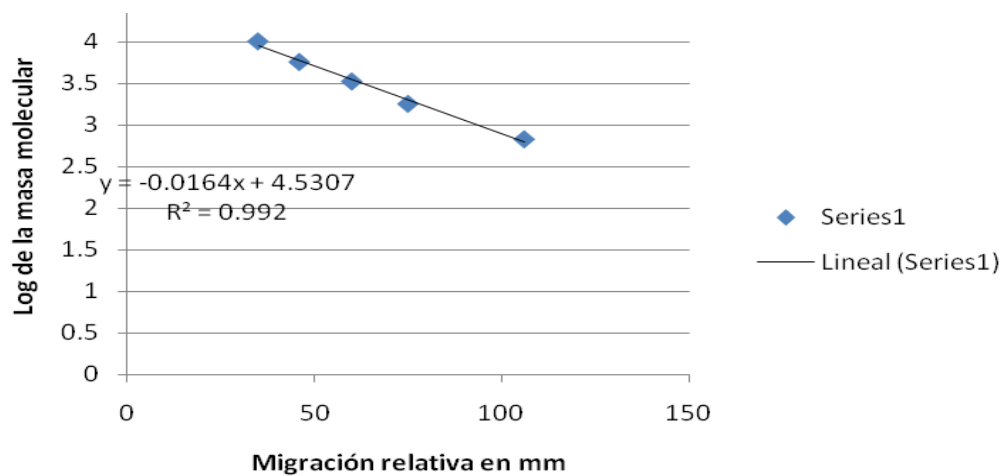


Figura A2. Cálculo de las masas moleculares de los marcadores que van de 35mm a 106mm

Anexo 3.

Póster presentado en el XXII Congreso de Investigación CUAM-ACMor, 2011

María Luisa Navarro, Raquel Martínez, Michelle Cortés, Jesús Morán y Anabel Escalada. Colegio Marymount. --- Dr. Enrique Galindo y Dra. Brenda Valderrama.

¿Cuánto etanol evitará el daño ocasionado a un proteína por el metanol presente en un modelo de bebida adulterada?

Resultados



Conclusiones

Se comprobó que el daño que ocasiona en el organismo la ingesta de metanol puede seguirse emediante el entrecruzamiento que ocasiona en una proteína el formaldehído.

Perspectivas

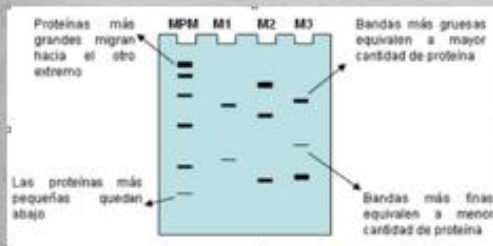
Durante la segunda parte de este proyecto, se espera encontrar la relación acetaldehído/formaldehído que no ocasionará entrecruzamiento en la proteína caseína.

Objetivo

Comprobar que el formaldehído ocasiona entrecruzamiento en la proteína caseína y determinar la proporción acetaldehído/formaldehído que ya no causará entrecruzamiento.

Marco Teórico

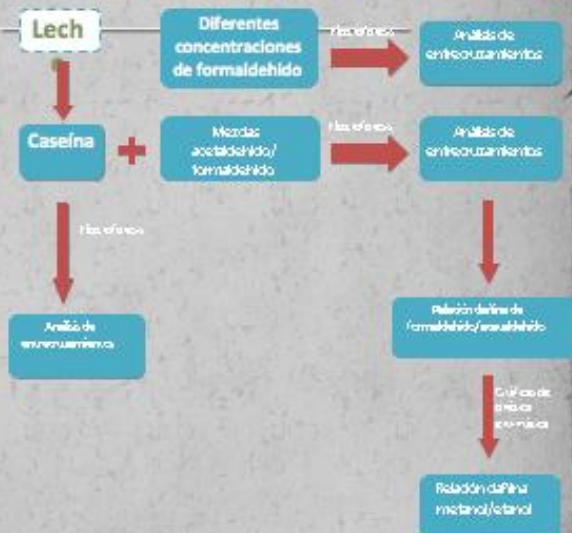
Electroforesis:



Antecedentes

Las bebidas alcohólicas pueden contaminarse con metanol. La ingesta de metanol por humanos suele resultar en acidosis metabólica, secuencias neurológicas o la muerte; la dosis tóxica mínima es de 100 mg/kg. Al ser ingerido metanol, el cuerpo lo metaboliza en formaldehído.

Metodología



Bibliografía

Navarro, M. L., Martínez, R., Cortés, M., Morán, J., Escalada, A. (2011). ¿Cuánto etanol evitará el daño ocasionado a una proteína por el metanol presente en un modelo de bebida adulterada? Póster presentado en el XXII Congreso de Investigación CUAM-ACMor, 2011.

Galindo, E., Valderrama, B. (2011). ¿Cuánto etanol evitará el daño ocasionado a una proteína por el metanol presente en un modelo de bebida adulterada? Póster presentado en el XXII Congreso de Investigación CUAM-ACMor, 2011.