



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
Facultad de Química Farmacéutica
Biológica



MANUAL DE LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA

Elaborado por:

Dra. Yolanda Cocotle Ronzón

Dra. Minerva Hernández Lozano

M.C. Marcos Fernando Ocaña Sánchez

Dr. Alberto Sánchez Medina

M.C. Gabriel Arturo Soto Ojeda

Dra. Alma Vázquez Luna

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	2
Objetivos Particulares.....	2
AGUA.....	4
PRÁCTICA No. 1.....	7
DETERMINACIÓN DE pH y pKA EN SOLUCIONES.....	7
PRÁCTICA No. 2.....	11
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.....	11
CARBOHIDRATOS.....	15
PRÁCTICA No. 4.....	18
IDENTIFICACION GENERAL DE LOS CARBOHIDRATOS.....	18
REACCIONES CARACTERÍSTICAS.....	18
PRÁCTICA No. 5.....	24
IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	24
PRÁCTICA No. 6.....	27
CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	27
AMINOÁCIDOS.....	31
Y 31	
PÉPTIDOS.....	31
AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS.....	32
PRÁCTICA No. 7.....	34
IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	34
PROTEÍNAS.....	41
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.....	44
PRÁCTICA No. 8.....	44
IDENTIFICACIÓN GENERAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.....	44
PRÁCTICA No. 9.....	50
CRISTALIZACIÓN DE LA ALBÚMINA DE HUEVO.....	50
PRÁCTICA No. 10.....	53
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	53
ENZIMAS.....	57
PRÁCTICA No. 11.....	61

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMÁTICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA.	61
PRÁCTICA No. 12.	67
EFFECTO DEL SUSTRATO, ENZIMA Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	67
PRÁCTICA No. 13.	70
EFFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN DE LA UREASA.	70
LÍPIDOS	76
PRÁCTICA No. 14.	78
IDENTIFICACIÓN GENERAL DE LOS LÍPIDOS.	78
PRÁCTICA No. 15.	74
EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL COLESTEROL	74
ÁCIDOS NUCLÉICOS	79
PRÁCTICA No. 16.	82
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL ADN	82
VITAMINAS	86
PRÁCTICA No. 17	87
DETERMINACION DE CAROTENOS y DETERMINACION DE VITAMINA C EN ALIMENTOS.	87
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	91
2. REGLAMENTO INTERNO DE LA FACULTAD DE QFB.	92
BIBLIOGRAFÍA	98

EVALUACIÓN:

Técnicas	Porcentaje
<ul style="list-style-type: none">• Evaluación de conocimientos y habilidades del pensamiento:	60 %
a) Examen parcial.	
b) Reportes de prácticas.	
<ul style="list-style-type: none">• Evaluación de habilidades de ejecución y actitudes:	
a) Pruebas de ejecución, escala, guías de observación, asistencia.	40 %
Corresponde al 40 % del curso teórico	100 %

INVESTIGACIÓN POR PRÁCTICA:

Incluirá una investigación documental para el marco teórico acompañada del diagrama de trabajo. Incluirán fundamentos o conceptos manejados en la sesión, así como una justificación del uso de los reactivos y métodos empleados en la práctica acompañados de sus respectivas citas bibliográficas.

PRÁCTICA:

Deberá incluir parte de la investigación realizada previamente. Si existen dos o más trabajos individuales iguales no tendrán valor en la evaluación. La práctica completa para ser válida deberá incluir los siguientes apartados:

- 1) Título
- 2) Objetivo
- 3) Resumen
- 4) Introducción
- 5) Marco teórico
- 6) Material y método
- 7) Resultados

- 8) Discusión
- 9) Conclusión
- 10) Cuestionario
- 11) Bibliografía

ACTIVIDADES DURANTE LA PRÁCTICA:

Comprende la realización de la práctica de acuerdo con el diagrama de trabajo propuesto. Se considerará tanto la forma de trabajar, como la disposición de trabajo en equipo, el cumplimiento en el horario establecido. Material, puntualidad, y limpieza durante la realización de las prácticas. No se permitirá abandonar el laboratorio a los integrantes del equipo hasta que recojan su material y limpien la mesa.

CUESTIONARIO:

Se entregarán como parte de la práctica. La bibliografía utilizada para obtener las respuestas también se incluirá en la práctica.

INTRODUCCIÓN

La Bioquímica es una ciencia joven que hasta hace unas décadas no se le consideraba por derecho propio una ciencia sino una rama de alguna otra como la Fisiología o la Química. Hoy el progreso que esta ciencia ha alcanzado ha enriquecido de manera notable el entendimiento de las bases de la vida y ha abierto nuevas áreas de interés como son la diferenciación celular, la evaluación, el comportamiento y la memoria.

No obstante que los organismos vivos e incluso las células individuales que los constituyen tienen una gran complejidad, comparten ciertas características unificadas como es el hecho de que se usan los mismos tipos de biomoléculas y todos consumen energía. Por ello los seres vivos pueden estudiarse con los métodos de la Química, Física y las disciplinas aparentemente sin relación con la Bioquímica pueden contestar importantes preguntas en esta área de la ciencia.

La experiencia educativa denominada Laboratorio de Bioquímica que se imparte en la Facultad de la Universidad Veracruzana tiene, al igual que todas las experiencias educativas que integran el plan de estudios de esta licenciatura, como uno de los principales objetivos que los alumnos desarrollen conocimientos, habilidades, destrezas, actitudes y valores necesarios para adquirir un pensamiento lógico, crítico y creativo, este manual tiene el fin de contribuir a ello.

El contenido hace énfasis en la estructura y dinámica de importantes componentes de la célula y se encuentra dividido por temas acorde al programa de estudios de la parte teórica cada uno contempla una serie de prácticas que además de proporcionar el fundamento de la parte experimental incluye un breve cuestionario para reforzar los conocimientos y cada practica a realizar ha sido adaptada para resaltar conceptos, principios y pruebas concretas representativas de la notable unidad bioquímica que exhiben todas las formas de vida.

En la parte final de este trabajo se incluye un anexo en donde se encuentran las metodologías para la preparación de reactivos y soluciones a utilizar en cada práctica, además de las consideraciones necesarias sobre el control de calidad de equipos y material del laboratorio.

Objetivo General

Que el alumno adquiera conocimientos y desarrolle habilidades, destrezas, actitudes y valores necesarios para favorecer el trabajo responsable individual y en equipo, adquiriendo un pensamiento lógico, crítico y creativo y adquieran las competencias y habilidades propias de su formación en el área de la Bioquímica.

Objetivos Particulares

Que el alumno:

- Realice una serie de prácticas que le permitan identificar las características fisicoquímicas y bioquímicas de las biomoléculas.
- Desarrolle habilidades para aprender a utilizar el método científico como una herramienta en la identificación, análisis y la solución de problemas.
- Fortalezca actitudes de compromiso y apertura mediante el trabajo en equipo.

Agua

AGUA

A causa de su ubicuidad el agua es considerada con frecuencia un líquido inerte y meramente destinada a llenar los espacios en los organismos vivos. Pero, en realidad el agua es una sustancia de gran reaccionabilidad con propiedades poco frecuentes, que la diferencia tanto física como químicamente de los líquidos corrientes.

El agua es la biomolécula más abundante en el ser humano. Constituye un 65- 70% del peso total del cuerpo, este contenido debe mantenerse próximo a esos valores pues de lo contrario al fallar la homeostasis, el organismo se ve abocado a situaciones patológicas. La importancia del estudio de esta biomolécula radica en el hecho de que prácticamente la totalidad de las reacciones bioquímicas del organismo tiene lugar en el seno del agua.

La estructura de la molécula del agua (H_2O) tiene carácter tetraédrico, con el átomo de oxígeno en el centro y los dos átomos de hidrógeno dispuestos en dos de los vértices de dicho tetraedro, quedando los otros dos restantes ocupados por los electrones *no compartidos*. El ángulo formado entre los dos átomos de hidrógeno es de 104.5° mientras que la distancia de enlace entre el oxígeno e hidrógeno es de 0.096nm .

La mayor electronegatividad del oxígeno con respecto al hidrógeno determina una distribución asimétrica de la carga eléctrica en torno al átomo de oxígeno y por lo tanto un déficit electrónico en torno a la de hidrógeno. Todo ello hace que la molécula de agua sea un dipolo eléctrico.

Una importante consecuencia de la polaridad de la molécula de agua es la atracción de las moléculas de agua por otras. La atracción entre una carga parcialmente positiva del átomo de hidrógeno y una molécula de agua, una parcialmente negativa del átomo de oxígeno y otra, produce un puente de hidrógeno.

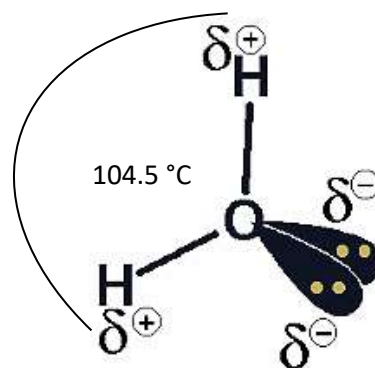


Figura 1.1

Ángulos entre los enlaces covalentes de la molécula de agua.

La estructura del agua, con la consiguiente capacidad de formar puentes de hidrogeno va a reconstituir el fundamento de las propiedades físicas y químicas del agua. Estas son:

- Elevada temperatura de ebullición: 100 °C.
- Densidad máxima de 4 °C: basada en la presencia de puentes de hidrógeno. Se debe al aumento del volumen de agua sólida con respecto a la líquida.
- Elevado calor específico: (1 cal/g x °C) calor necesario para elevar la temperatura de 1 g de líquido en 1 °C.
- Elevado calor de evaporización: (536 cal/g) calor necesario para vaporizar 1 g de líquido.
- Elevada conductividad calorífica: permite una conducción de calor adecuada en el interior corporal (termorregulación)
- Elevada constante dieléctrica: (K= 80 a 20 °C), implica que es un buen disolvente de compuestos iónicos.
- Capacidad de hidratación y solvatación de iones: debido al carácter bipolar sus moléculas pueden rodear distintos iones aislándolos del resto:

- Disolvente de moléculas anfipáticas: se lleva a cabo por la formación de micelas.
- Disolvente de compuestos polares de naturaleza no iónica: gracias a la capacidad para establecer puentes de hidrógeno.
- Elevada tensión superficial: determinada por una elevada cohesión entre las moléculas de su superficie tendiendo a que la superficie libre de agua sea mínima.
- Transparencia: no afecta directamente al ser humano, pero es importante para que se pueda producir el proceso de la fotosíntesis a la masa oceánica y fondos marinos.

Ionización del agua

Debido a la ionización de algunas moléculas de agua, el agua pura no solo consiste en H₂O, también tiene una concentración baja de iones hidronio, otra concentración igual de iones hidróxido. El ion hidronio algunas veces escrito como H₃O⁺ realmente tiene varias moléculas de agua asociadas a él. Es más conveniente referirnos al ion hidronio como protones representando así: H⁺.

De acuerdo con el concepto de Bronsted-Lowry un ácido es un donador de protones y una base un aceptador.

La ionización del agua puede ser analizada cuantitativamente. La constante de equilibrio para ionización del agua está dada por:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{H_2O}$$

Porque la masa de 1 L de agua es 1000 g y la masa de 1 mol de agua es de 18 g, el agua tiene una concentración de aproximadamente 55.5 M. por lo que:

$$K_{eq}(55.5 M) = [H^+][OH^-]$$

La constante de equilibrio para la ionización del agua es de 1.8×10^{-16} a 25 °C debido a que la constante de equilibrio es tan pequeña, la concentración de agua permanece casi inalterada por ionización. Sustituyendo la K_{eq} queda:

$$1.0 \times 10^{-14} M^2 = [H^+][OH^-]$$

A 25 °C tiene un valor de $1 \times 10^{-14} M^2$, constante designada como K_w .

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14} M^2$$

Tomando la raíz cuadrada de los términos:

$$[H^+] = 1.0 \times 10^{-7} M$$

La ionización del agua pura produce $10^{-7} M H^+$ y $10^{-7} M OH^-$.

Ácido- base

Los valores de $[H^+]$ de la mayor parte de las disoluciones son muy pequeñas, como para compararse. Una magnitud más práctica es la conocida como pH.

$$pH = -\log [H^+]$$

La relación entre el pH de una disolución y las concentraciones de un ácido y de su base conjugada pueden deducirse con la ecuación de Henderson- Hasselbach:

$$pH = pK + \frac{\log [A^-]}{[HA]}$$

Tampones:

Los tampones estabilizan el pH de una solución.

La capacidad de un tampón para resistir las variaciones de pH cuando se añade ácido o base es directamente proporcional a la concentración del par conjugado ácido- base $[HA] + [A^-]$. Es máxima cuando $pH=pK$ y decrece al variar el pH desde dicho punto.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

PRÁCTICA No. 1
DETERMINACIÓN DE pH y pKA EN SOLUCIONES.

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas (dependiendo del número de potenciómetros disponibles).
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Que el alumno realice una curva de titulación de aminoácidos y a partir de ella determine el pK y el pH en el que se encuentra su poder amortiguador.

Fundamento:

Los ácidos difieren en el grado en que se disocian en agua. Los ácidos fuertes se disocian por completo; los ácidos débiles no. La probabilidad de que un ácido se disocie se define por su constante de disociación, K_d :

$$K_d = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Debido a que las formas protonadas y no protonadas de un ácido tienen propiedades

biológicas diferentes, es importante poder predecir el grado de disociación de un ácido a cualquier pH. Es conveniente modificar la expresión de K_d en una forma análoga al pH, el pK.

$$pK = -\log K_d$$

Ahora es posible usar la ecuación de Henderson- Hasselbalch para predecir el grado de disociación del medio:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Los aminoácidos tienen un grupo amino que les permite actuar como base y combinarse con ácidos; y un grupo carboxilo les permite combinarse con bases. Los aminoácidos y

las proteínas sirven de amortiguadores y pueden resistir a cambios de acidez y de alcalinidad.

Materiales y reactivos

Material de laboratorio

2 vasos de precipitado de 100 mL

2 vasos de precipitados de 150 mL

1 pipeta graduada de 1 mL

1 bureta

1 agitador magnético

Piceta

Reactivos

20 ml por equipo de los siguientes aminoácidos:

Glicina 0.025 M pH 2.0

Lisina 0.025 M pH 2.0

Ácido aspártico 0.025 M pH 2.0

NaOH 1M

Equipo

Potenciómetro

Procedimiento

Determinación de pKa:

1. Ponga 20 mL de la solución de glicina en un vaso de precipitado de 100 mL.
2. Proceda a la medición del pH.
3. Añada 0.1 mL de NaOH 1.0 M. agitar el vaso y volver a medir el pH anotando los resultados. Determinación de la capacidad Buffer.

4. Repita el paso 3 hasta llegar a un pH de 12 aproximadamente.
5. Haga lo mismo (pasos del 1 a 4) para los otros aminoácidos.
6. Haga una gráfica de pH contra volumen en mL de NaOH gastados luego de tomar en cuenta que cada 0.1 mL de NaOH diluido en 20 mL aumenta la concentración de OH^- en 50 mmoles.
7. Localiza en la gráfica los diferentes pK de los aminoácidos.
8. Identifica a que pH tienen poder amortiguador.

Determinación de la capacidad buffer

La capacidad buffer es la cantidad de base fuerte requerida para alterar el pH de la disolución reguladora, en una unidad de pH:

$$C. B = \frac{d_b}{dpH}$$

Siendo dpH el incremento de pH resultante de la adición de un volumen d_b de base.

1. Ponga su disolución en un vaso, introduzca los electrodos del potenciómetro y disponga una bureta con disolución de NaOH 1N y un agitador magnético, dentro del vaso. Determine el pH inicial.
2. Ponga el agitador en marcha sin que este golpee los electrodos, y agregue un volumen de NaOH 1N medido

exactamente en la bureta (1 mL).
Anote el pH resultante. Repita las
adiciones de base, en volúmenes

iguales (1 mL) y anote los valores de
pH correspondientes, hasta obtener
por lo menos cinco lecturas.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

1. Determinación de pKa:

mL de NaOH agregados	pH obtenido		
	Gly	Lys	Asp
0			
0.1			
0.2			
0.3			
0.4			
0.5			
1.0			

2. Realice una gráfica de los resultados (pH contra mL de NaOH gastados).
3. Calcule el pK y el pH en el cual se encuentra la máxima capacidad amortiguadora.
4. Determine la capacidad buffer.

Discusión de resultados:

Conclusión:

Cuestionario:

1. Indique el pKa de los siguientes ácidos:
 - a) Ácido pirúvico
 - b) Ácido láctico
 - c) Ácido benzoico
 - d) Ácido oxálico

- e) Ácido succínico
 - f) Ácido carbónico
2. Indique el nombre completo, pKa y peso molecular (o fórmula) de los siguientes compuestos usados como reguladores de pH en bioquímica: TRIS, CAPS, MES, TES y tricitá.
 3. ¿Para qué valores de concentración de los componentes de un buffer, tiene este la máxima capacidad amortiguadora?
 4. ¿Por qué los aminoácidos actúan como reguladores del pH?
 5. Defina ¿Qué es la capacidad buffer?

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 2
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas (dependiendo del número de potenciómetros disponibles).
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Que el alumno aprenda a utilizar la ecuación de Henderson- Hasselbalch y por medio de esta prepare una solución amortiguadora.

una solución que será resistente a los cambios bruscos de pH.

Fundamento:

Las soluciones amortiguadoras son soluciones que conservan su pH con tenacidad a pesar de que se les añadan cantidades importantes de ácidos o álcalis. Están formadas por una mezcla de ácidos débiles y su base conjugada. Al hacer la mezcla entre un ácido débil y su sal en las proporciones adecuadas, (estas proporciones se calculan con la ecuación de Henderson-Hasselbach) logramos obtener

Cuando el pH de la solución se aproxima al valor del pK del Ácido este comienza a disociarse. Los protones liberados en el proceso reemplazan a muchos de los titulados por la base. Así una solución que contiene un ácido débil resiste cambios en el pH mejor que un volumen igual de agua debido a que el efecto amortiguador depende de los cambios en la disociación de un ácido débil, un amortiguador es más eficaz dentro de los límites del pH, donde estos cambios son más grandes, esto es, cerca del pK del ácido.

Procedimiento:

Preparación de solución amortiguadora.

1. Al recibir su problema, estudie las condiciones que se piden y buscar un buffer cuyo pKa sea adecuado y aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbach, calcule las cantidades de ácido y base conjugada que debe usar para preparar 100 mL de disolución.
2. Pesar las cantidades que calculó o mida los volúmenes adecuados y disuelva. Afore aproximadamente a 75 mL.
3. Transferir esta disolución a un vaso de precipitados de 150 mL y verifique el pH en un potenciómetro previamente calibrado y ajustar la temperatura a las condiciones de trabajo. Si el pH no es exactamente el pedido, ajústelo agregando el componente (ácido o base), que sea necesario para subir o bajar el pH hasta el valor requerido. Para valores de

pH mayores a 6 usar la sal di básica de fosfatos.

4. Aforar a 100 mL con agua destilada y verifique nuevamente el pH.

Determinación de la capacidad Buffer.

La capacidad buffer es la cantidad de base fuerte requerida para alterar el pH de la disolución reguladora, en una unidad de pH:

$$C. B. = \frac{d_b}{dpH}$$

Siendo dpH el incremento de pH resultante de la adición de un volumen de d_b de base.

5. Ponga su disolución en un vaso, introduzca los electrodos del potenciómetro y disponga una bureta con disolución de NaOH 1 N medido exactamente en la bureta (1ml). Anote el pH resultante. Repita las adiciones de base, en los volúmenes iguales (1 ml) y anote los valores de pH correspondientes, hasta obtener por lo menos cinco lecturas.

Disposición de residuos

Las soluciones amortiguadas pueden ser vertidas en la tarja; los sobrantes de NaOH deben recuperarse en frascos ámbar con tapa para ser reutilizados.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

a) Preparación de soluciones amortiguadoras:

1. Problema # _____ pH requerido _____ concentración molar _____ volumen final _____ ml.
2. Cálculos efectuados.
3. Cantidades por pesar o medir de A⁻ y HA
4. ¿Cuál es el pH de la solución inicial y cuál el valor final de pH?
5. ¿Porqué para valores de pH cercanos a 5 se usan acetatos y para valores cercanos a 7 fosfatos?

Discusión.

Conclusiones.

Referencias Bibliográficas.

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Carbohidratos

CARBOHIDRATOS

La palabra se refiere a compuestos con la fórmula general $C_n(H_2O)_n$, sin embargo, solo el azúcar simple o monosacárido presenta esta fórmula. Los otros tipos de carbohidratos, oligosacáridos y polisacáridos están basados en las unidades de monosacáridos y tienen fórmulas generales ligeramente diferentes. Los oligosacáridos están formados por pocos monosacáridos unidos, los polisacáridos están formados por muchos monosacáridos unidos. La reacción de adición de monosacáridos para hacer crecer la molécula del carbohidrato lleva a la pérdida de agua por cada nueva unión, dando razón a la diferencia en la fórmula general.

Están íntimamente relacionados en los procesos vitales, primero desempeñan un papel clave en las relaciones energéticas de todos los organismos. Por una parte son productos principales que se originan de la captura de energía solar durante el proceso de fotosíntesis, esto es que la luz solar es utilizada para convertir la poca energía de las ligaduras del CO_2 y del agua hasta ligaduras de más energía de los carbohidratos. Por otra parte todas las células son capaces de obtener energía para sus actividades características, a partir de la degradación de estos carbohidratos durante el proceso de la

respiración. Segundo, dentro de la célula viva ciertos carbohidratos son unidades integrantes de nucleótidos y de ácidos nucleicos.

El término carbohidrato literalmente quiere decir hidrato de carbono. Químicamente, los azúcares son aldehídos y cetonas polihidroxilados y sus derivados por reducción, oxidación, sustitución o polimerización.

Los azúcares sencillos abundan en las frutas (glucosa, fructosa y sacarosa) y en la leche (lactosa), en cambio sus polímeros abundan en los cereales, tubérculos y legumbres (almidón), hígado y carnes (glucógeno).

Las principales funciones biológicas pueden ser:

- Constituyen el material energético de uso inmediato: la glucosa es el principal carbohidrato usado como fuente de energía.
- Pueden constituir un material energético de reserva: el almidón en vegetales y el glucógeno en animales, se acumulan en determinadas células para su utilización en el momento oportuno.
- Cumplen funciones estructurales: la celulosa y otros azúcares

fibrosos constituyen la pared externa de las células vegetales.

Clasificación de los carbohidratos

De acuerdo con su naturaleza química: monosacáridos simples, monosacáridos derivados, oligosacáridos, polisacáridos simples, polisacáridos derivados.

Monosacáridos simples: son aldehídos o cetonas polihidroxilados. Los monosacáridos que tienen un grupo aldehído se denominan aldosas y los que tienen un grupo cetona que se denominan cetosas. Son sólidos blancos, cristalinos, solubles en agua y con sabor dulce. Suelen desviar el plano de la luz polarizada, reducen el ión cúprico (azul) a cuproso (rojo).

Monosacáridos derivados: se forman por modificación química de los monosacáridos simples por reducción (se forman desoxiazúcares: desoxirribosa y los alditoles: glicerol), oxidación (se forman azúcares ácidos: ácido glucorónico) o sustitución (se forman aminoazúcares: glucosamina).

Oligosacáridos: se forman por condensación de 2 o más monosacáridos simples. En general reacciona el grupo aldehído de un monosacárido con un grupo alcohol de otro originando un disacárido.

Por sus propiedades químicas se clasifican en reductores, que es cuando conservan un grupo aldehído o cetona libre (maltosa, lactosa) y no reductores, cuando no tienen un grupo cetona o aldehído libre (sacarosa).

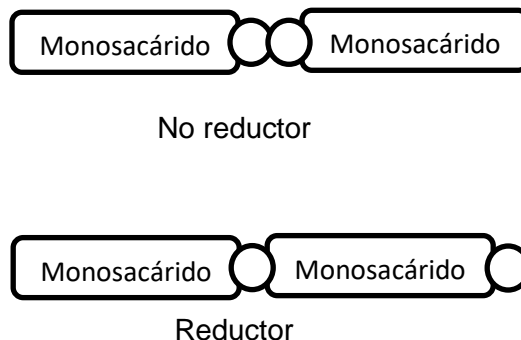


Figura 2.1 Representación de los azúcares reductores y no reductores. El círculo representa su grupo cetona o aldehído.

Polisacáridos simples: son polímeros lineales o ramificados de monosacáridos simples. Según sus funciones biológicas se agrupan en polisacáridos de reserva (amilosa o almidón, amilopectina, glucógeno) y polisacáridos estructurales (celulosa).

Polisacáridos derivados: son polímeros de monosacáridos derivados. Pueden estar constituidos por un solo monómero, por dos monómeros repetidos en secuencia alternadamente o por más componentes. Los polisacáridos más complejos son los constituyentes de las paredes bacterianas (ácido teicocico y peptidoglicano).

Todos los monosacáridos simples tienen estructura química semejante. Los átomos de carbono suelen formar una cadena

lineal: el primero o el segundo tiene la función, aldehído o cetona y los demás están hidroxilados.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 4
IDENTIFICACION GENERAL DE LOS CARBOHIDRATOS.
REACCIONES CARACTERÍSTICAS

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Determinar la presencia de carbohidratos mediante reacciones de identificación específicas.

Fundamento:

La identificación y separación de carbohidratos es un problema analítico frecuente en bioquímica. Existen reactivos de carácter general, como el de Molisch, el cual permite identificar carbohidratos en general e incluso glucoproteínas. Otros reactivos dan prueba positiva únicamente con carbohidratos reductores; casi todos ellos se basan en la reducción del ión Cu^{2+} con formación de ácido cuproso (Benedict,

Fehling) o en la reducción de Ag^{1+} , Bi^{2+} u otros iones.

El tiempo que tarda en realizarse la reducción a una temperatura controlada, da idea del tipo de carbohidrato reductor, pero su identificación precisa, requiere la formación de derivados cuya forma cristalina y punto de fusión son determinables. Otros reactivos como el de Seliwanoff, son relativamente específicos para identificar cetonas. Los reactivos de Bial y de la bencidina, son bastante específicos para identificar pentosas.

Prueba de Fehling: El grupo aldehído (grupos reducidos) es oxidado por un número de

reactivos. Una reacción usada para distinguir azúcares reductores de esta manera es la prueba de Fehling. El tartrato de cobre para prevenir la formación del hidróxido cúprico insoluble que ocurre cuando el cobre libre está presente en la solución alcalina. La formación del óxido cuproso insoluble rojo es el criterio de una reacción positiva. La prueba de Fehling de ninguna manera específica. Los aldehídos, en general, deben reducir este reactivo.

Otras sustancias que reaccionan en esta prueba son: fenoles, aminofenoles, benzoina, ácido úrico, catecol, ácido fórmico, hidrazobenceno, fenilhidrazina, pirogalol y resorcinol.

Prueba de Molisch: En la prueba de Molisch el ácido sulfúrico concentrado hidroliza enlaces glucosídicos para dar monosacáridos que pueden ser luego deshidratados dando furfural y sus derivados. Estos productos se combinan luego con α -naftol sulfonato originando un complejo púrpura.

Esta reacción es general para los hidratos de carbono; pero algunos otros compuestos orgánicos dan también furfural con ácido sulfúrico concentrado.

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

Prueba de Seliwanoff para cetosas: Las cetosas se deshidratan más rápidamente que las aldosas

dando derivados de furfural, que se condensan con resorcinol para formar un complejo rojo; por lo tanto, se debe evitar un calentamiento prolongado de la muestra que se está estudiando.

Prueba de Bial para pentosas: Cuando se calientan pentosas con HCl concentrado se forma furfural, que se condensa con orcinol en presencia de iones férricos para dar un color verde-azuloso. La reacción no es absolutamente específica para las pentosas, ya que el calentamiento prolongado de algunas hexosas produce hidroximetil furfural que también reacciona con orcinol dando complejos coloreados.

Prueba de Barfoed: El reactivo de Barfoed es débilmente ácido y sólo puede ser reducido por monosacáridos. Si se deja hervir por largo tiempo existe la posibilidad de que hidrolice disacáridos dando así reacciones falsamente positivas. El precipitado de óxido cuproso es menos denso que en los métodos previos y se recomienda dejar el tubo hasta que el precipitado sedimente. El color del óxido cuproso es también diferente, tendiendo más al rojo ladrillo que al pardo naranja obtenido en la prueba de Benedict.

Prueba de Yodo: El yodo forma complejos coloreados de absorción con los polisacáridos; el almidón da un color azul con yodo, mientras que el glucógeno y el almidón parcialmente hidrolizado reaccionan dando una coloración pardo-rojiza.

Material y reactivos:

Material de laboratorio

20 Tubos de ensaye 13 x 100
4 Pipetas graduada de 10 ml
4 Pipetas graduadas de 5 ml
1 Piceta
1 Gradilla

Perlas de vidrio

Algodón

Hielo

Vidrios de reloj (diámetro de 9-12 cm).

Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado

HNO₃ concentrado

NaOH diluido

Clorhidrato de fenilhidrazina

Solución de yodo

Soluciones de carbohidratos 0.1M:

Glucosa, Maltosa, Sacarosa, Galactosa, Lactosa,
Fructosa, Manosa, Xilosa, Dextrosa, Arabinosa,
Celulosa, Almidón

Reactivo de Benedict

Reactivo de Seliwanoff

Reactivo de Bial

Reactivo de Fehling

Reactivo de Molisch

Prueba de Fehling

MÉTODO:

1. A 1 mL de la muestra (cada uno de los carbohidratos, incluido el problema), agregar 1 mL de reactivo de Fehling.
2. Hervir en baño maría durante 5 min.
3. Comparar las cantidades de Cu₂O (precipitado rojo) formado en cada una de las muestras.

Prueba de Molisch:

MÉTODO:

1. En una serie de tubos de ensaye poner 1 mL de las soluciones de los diferentes carbohidratos.
2. Añadir 2 gotas de reactivo de Molisch y mezclar.
3. Verter con cuidado 0.6 ml de H₂SO₄ concentrado. Por las paredes del tubo hasta que forme una capa bajo el agua.
4. La aparición de un color violeta-rojizo en la superficie de separación de los líquidos significa una prueba positiva.

Prueba de Benedict:

MÉTODO:

1. En un tubo de ensaye poner 1 ml del reactivo de Benedict y 0.2 mL de las soluciones de carbohidratos y el problema.
2. Calentar en baño maría a ebullición durante 5 minutos.
3. La aparición de un precipitado color amarillo, verde o rojo indica una prueba positiva.

Prueba de Seliwanoff para cetosas.

MÉTODO:

1. A 0.2 mL de las soluciones de carbohidratos 0.1 M añadir 1 mL del reactivo de Seliwanoff.
2. Poner los tubos en baño María hirviendo y observar cada 5 min. Durante 15 min.
3. Anotar el momento en el cual aparece color en cada tubo, un color rojo indica la presencia de cetosas. El reactivo da un color verde con las pentosas.

Prueba de Bial para pentosas:

MÉTODO:

1. A 0.2 mL de las soluciones de carbohidratos 0.1 M, añadir 1 mL del reactivo de Bial.
2. Calentar en baño maría hirviendo durante 15 min.
3. Un resultado positivo da un color azul-verdoso. Las hexosas producen un color amarillo pardo.

Prueba de yodo

MÉTODO:

1. Acidifique la muestra con HCl diluido, agregue luego dos gotas de yodo y compare los colores obtenidos con los de yodo en agua.

Prueba de Barfoed

MÉTODO:

1. En un tubo de ensaye poner 0.3 mL del reactivo de Barfoed y añadir 0.16 mL de la solución de cada azúcar; hierva por un minuto, deje reposar y observar.

HOJA DE RESULTADOS

NOMBRE: _____ **GRUPO:** _____ **FECHA:** _____

1.- Completa la siguiente tabla comparativa de resultados obtenidos en cada prueba.

Prueba/ Solución	Fehling	Molish	Benedict	Seliwanoff	Bial	Yodo	Barfoed
Fructosa							
Glucosa							
Galactosa							
Manosa							
Almidón							
Sacarosa							
Xilosa							
Dextrosa							
Maltosa							
Lactosa							
Problema							

Discusión.

Conclusión.

Cuestionario:

1. ¿Qué errores pueden ser introducidos por aumento de la concentración de los reactivos? ¿Cómo podrían ser corregidos?
2. Glucosa, manosa y fructosa forman la misma osazona. ¿Son los mismos tiempos de formación?
3. Celulosa, el compuesto orgánico más abundante en la biosfera es un homopolisacárido lineal de D-glucosa. Sin embargo, los humanos no pueden digerirla. Explica por qué.

Referencias Bibliográficas.

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMA CÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA**

**PRÁCTICA No. 5
IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	2 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Que el alumno aplique la técnica de cromatografía en capa fina para la separación e identificación de carbohidratos.

Los azúcares son retenidos o la fase acuosa adherido a la placa y arrastrado por la fase orgánica móvil.

Fundamento:

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar sustancias de estructura química muy similar, como lo es en el caso de los carbohidratos. Se basa en la distinta capacidad que tienen las sustancias para: arrastradas por una fase móvil y ser retenidas por un soporte fijo, o fase estacionaria.

Cada azúcar avanza desde su origen en una longitud proporcional al desplazamiento de la fase orgánica, esta longitud se reseña mediante el parámetro R_f (relación de frentes):

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el azúcar}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

Antes de que el disolvente alcance el extremo de la placa, esta se extrae de la

cámara de cromatografía, se evapora y se revelan los azúcares.

Para identificar un azúcar desconocido, se debe correr en la placa cromatográfica junto con patrones conocidos y se comparan los valores de Rf utilizando diferentes mezclas líquidas. El azúcar problema corresponde al patrón cuyos valores de Rf sean idénticos en todos los casos.

Material y reactivos:

Material de laboratorio

Cromatofolios cortados en tiras de 4.5 x 11 cm.

Tubos capilares.

Vaso de precipitado de 250 ml.

Vidrio de reloj

Parrilla de calentamiento

Material biológico

Jugo de frutas

Reactivos

Soluciones 0.1 M de azúcares: sacarosa, glucosa, fructosa y lactosa (100 ml de c/u).

Mezcla de disolventes: a) isopropanol-ácido acético-agua (3:1:1); b) butanol-ácido acético-agua (4:1:2); c) agua-n-butanol-ácido acético glacial (5:4:1); metanol- agua (9.5:0.5).

Solución reveladora

a) 1.23 g de p-anisidina + 1.66 g de ácido ftálico en 100 ml de metanol; b) NaOH al 1% en etanol al 60% calentar dos minutos.

Ver preparación de reactivos en la sección correspondiente.

Procedimiento:

1. Cortar los cromatofolios en tiras de 4.5 x 6 cm. Marcar en ellos una línea paralela al borde inferior del rectángulo a una distancia de 1 cm del borde.
2. Colocar las muestras con ayuda de tubos capilares. Las gotas deben ser pequeñas para evitar que se mezclen. Se aconseja colocarlas con una distancia de 1 cm entre cada mancha. Se deben poner los cuatro estándares y el problema.
3. Poner solventes al vaso hasta una altura aproximada de 0.5 cm. Tapar inmediatamente con un vidrio de reloj o papel aluminio.
4. Revisar que las placas están secas, una vez así se pueden colocar hasta dos cromatofolios en un vaso de 400 mL.
5. Para colocarlas debes destapar el vaso, colocarlas dentro de él y tapar nuevamente.
6. Sacar los cromatofolios cuando el solvente alcanza una altura de 4.5 cm.
7. Nebulizar con la solución reveladora y calentar hasta la aparición de manchas alargadas de

color morado que permitirán la identificación de azúcares.

8. Determinar el Rf de cada estándar y del problema, comparar los Rf para saber que carbohidrato contenía su problema.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

1. Realizar un esquema de los resultados observados:
2. Calcular los Rf y determinar que carbohidrato contiene su muestra:

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. ¿Cuáles son las ventajas de la cromatografía en capa fina con respecto a otros métodos de separación e identificación de carbohidratos?
2. ¿Qué otros métodos analíticos pueden ser utilizados para identificación de carbohidratos? Mencione ventajas y desventajas.
3. Buscar en la bibliografía los Rf y comparar con los resultados, discutir sobre ello.

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 6
CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS.

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

El alumno aprenderá dos técnicas para cuantificación de carbohidratos, por espectrofotometría y lactosa por titulación.

Fundamento:

Método volumétrico de Lane- Eynon

La propiedad reductora de la lactosa nos permite cuantificarla utilizando soluciones de cobre como lo es la solución de Fehling.

La solución de Fehling es una solución alcalina del ión cobre (cúprico) la fuente de este ión es el sulfato de cobre. A causa de que el ión cúprico forma un hidróxido soluble en solución básica, debe añadirse otro reactivo a la solución a fin de evitar la precipitación del ión cobre como

hidróxido, en la solución de Fehling se emplea el tartrato de sodio y potasio, el cual forma con el ión, tartrato cúprico soluble en agua. El color azul de las soluciones se debe a la presencia de complejos del ión cúprico.

El cambio del color azul a un precipitado rojo ladrillo es una prueba positiva para el grupo aldehído.

Método espectrofotométrico por DNS

El carbohidrato más común es la glucosa (C₆H₁₂O₆), un monosacárido que se comporta como azúcar reductor debido a que posee un grupo aldehído o puede formar uno en solución. Este grupo funcional, le permite actuar como un agente reductor, y es justamente esta

propiedad, lo que nos permite cuantificar este tipo de azúcares mediante el uso de ácido dinitrosalicílico (DNS), un componente aromático que reacciona con los azúcares reductores formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que absorbe la luz a 540 nm.

Estas reacciones se realizan en condiciones ligeramente alcalinas. Es una prueba sumamente sensible para detectar la presencia de carbohidratos.

Material y reactivos:

Material de laboratorio

Matraz volumétrico de 100 mL.

Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL.

Bureta.

Embudo de filtración.

Parrilla.

Matraces Erlenmeyer de 150 mL

Pipetas graduadas de 10 mL

Pinzas para bureta.

Soporte universal

Material biológico

Leche no deslactosada

Leche deslactosada

Reactivos

Ácido acético glacial.

Solución saturada de acetato de plomo

Solución saturada de sulfato de sodio

Solución acuosa de benzoato de sodio al 2%

Solución estándar de lactosa (2mg/mL).

Nota: medir el pH de esta solución, en caso de no ser alcalino, alcalinizar con NaOH.

Solución A de Fehling

Solución B de Fehling

Procedimiento:

a) método de Fehling

Titulación de las soluciones A y B de Fehling.

1. Medir con una pipeta volumétrica 0.5 mL de solución B y 0.5 mL de solución A y pasar a un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de agua destilada y unas perlas de vidrio.
3. Calentar en parrilla a ebullición y agregar poco a poco, con una bureta la solución patrón de lactosa hasta la casi reducción del cobre.
4. Añadir una gota de solución acuosa de azul de metileno al 0.2% y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul.
5. Calcular el factor de Fehling para lactosa de la siguiente forma:

$$F = V_1 \times 2 \text{ mg}$$

$$V_1 = \text{mL gastados de lactosa}$$

Preparación de la muestra

1. Colocar 20 mL de muestra en un matraz volumétrico de 100 mL con 25 mL de agua.

- Añadir 6 mL de solución saturada de acetato de plomo, 10 mL de solución acuosa saturada de sulfato de sodio y 2 mL de ácido acético glacial y mezclar.

Deje reposar 30 min.

- Aforar con agua a 100 mL, filtrar y este filtrado colocarlo en una bureta y titular como en las soluciones de Fehling.
- Calcular la concentración de lactosa con la siguiente fórmula:

$$\text{mg lactosa}/100 \text{ mL muestra} = \frac{F \times 100}{V}$$

F= factor de Fehling

V= mL del filtrado gastados

b) Determinación de azúcares reductores por el método de DNS

- Preparar 100 mL de una solución patrón de glucosa con una concentración de 1g/L.
- Con la solución anterior preparar por duplicado la siguiente curva patrón:

Tubo	Solución patrón (mL)	Agua (mL)	A ₅₄₀
1	0	1	0
2	0.1	0.9	
3	0.2	0.8	
4	0.3	0.7	
5	0.4	0.6	
6	0.5	0.5	
7	0.6	0.4	

8	0.7	0.3	
9	0.8	0.2	
10	0.9	0.1	
11	1	0	
12 p	0.2	0.8	
13p	0.2	0.8	

- Agregar 1 mL de reactivo de DNS a cada tubo y agitar
- calentar en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos.
- Enfriar en agua corriente y luego en baño de hielo.
- Agregar 8mL de agua destilada a cada tubo y agitar.
- Leer densidad óptica en cada tubo a 540 nm en el espectrofotómetro previamente calibrado con el blanco (tubo1).

La muestra problema a analizar (1ml y una dilución 1:100) se somete al mismo tratamiento que la curva patrón (tubos 12 y 13).

- Trazar una curva con las lecturas obtenidas de la curva estándar graficando la absorbancia en el eje de las ordenadas y la concentración de glucosa (calcularla para cada tubo) en el eje de las abscisas.
- Interpolan las lecturas obtenidas de los tubos problema.
- Expresar los resultados en mg de glucosa/L

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

Gráfica:

Cálculos:

Método volumétrico de Lane- Eynon

Cantidad calculada:

Método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Cantidad calculada:

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. ¿Por qué algunos azúcares son designados “reductores”? Da ejemplos con estructuras.
2. ¿Qué métodos se utilizan para la determinación de azúcares reductores además del método empleado en la práctica?
3. De acuerdo con la naturaleza química de los carbohidratos a que clasificación pertenecen la sacarosa y la lactosa.

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

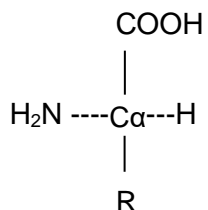
Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS

AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que, como indica su nombre contiene al menos un grupo amino (-NH₂) y otro ácido (-COOH). La existencia de un grupo básico y otro ácido les confiere dos características muy importantes para su función:

- Son sustancias anfóteras, es decir, que pueden comportarse como ácidos y bases.
- Pueden reaccionar entre ellos, para dar lugar a polímeros de cualquier longitud al existir siempre un grupo reactivo libre.
- La fórmula general de un aminoácido es:



El carbono α es asimétrico, tiene cuatro sustituyentes distintos, salvo que el radical R sea un hidrógeno: en el caso del aminoácido glicina. Lo que caracteriza a un aminoácido es el radical R, de acuerdo a este radical los aminoácidos se pueden clasificar en cuatro grupos: apolares, polares con carga neutra, catiónicos y aniónicos, explicados más adelante.

Todos los aminoácidos proteicos tienen el mismo diseño estructural. Los grupos amino y carboxílico están unidos a un mismo carbono, denominado carbono α que a su vez completa cuatro sustituyentes con un átomo de hidrógeno y un radical orgánico que constituye la cadena lateral específica de cada uno, por lo tanto, de los cuatro sustituyentes sobre ese carbono α , tres son comunes a todos los aminoácidos y solo la cadena lateral es lo que determina la individualidad de cada uno. De acuerdo con la naturaleza de esta cadena, los aminoácidos se suelen dividir en cuatro grupos:

Grupo I: aminoácidos apolares.

Los aminoácidos tienen cadenas laterales de naturaleza hidrocarbonada, con algún otro elemento que no afecta la polaridad. En este grupo de menor a mayor complejidad, se pueden considerar: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano y metionina. El aminoácido es más hidrófobo cuanto más voluminosa es la cadena lateral.

Grupo II: aminoácidos polares con carga neutra.

Poseen en sus cadenas laterales grupos hidrofílicos que aumentan su solubilidad. Pertenecen a este grupo los

hidroxilados: serina, treonina, tirosina, cisteína y los amidados: aspargina y glutamina.

Grupo III: aminoácidos aniónicos o ácidos.

Los aniónicos tienen en la cadena lateral un grupo carboxílico que puede disociarse, lo que les confiere una carga, negativa y características ácidas. Son los ácidos aspártico y glutámico.

Grupo IV: aminoácidos catiónicos o básicos.

Los catiónicos, por el contrario, tienen en la cadena lateral un grupo nitrogenado que les confiere una carga positiva y características básicas. Son la histidina, la lisina y La arginina.

Los polímeros de los aminoácidos son llamados péptidos. Los péptidos que se encuentran en la naturaleza varían en tamaño, desde pequeñas moléculas que solo contiene 2 ó 3 aminoácidos y macro moléculas que contienen miles de ellos.

Dos moléculas de aminoácidos pueden unirse de forma covalente a través de un enlace amida sustituido, en un denominado enlace peptídico, formando un dipéptido.

La unión peptídica es la unión covalente que existe entre los

aminoácidos que integran una proteína. Se sabe además, que las proteínas poseen una secuencia precisa de aminoácidos y una conformación espacial perfectamente definida para que pueda ejercer su función. La conformación es condicionada, en principio, por la secuencia de aminoácidos, en la distribución espacial que adoptan los aminoácidos secuenciales.

Los péptidos se nombran leyendo secuencialmente los radicales de los aminoácidos que los integran comenzando por el que tiene el grupo amino libre, al que se añade la terminación "il" y dejando al último el que tiene el carboxilo libre con su nombre propio.

Las propiedades físicas y químicas de los péptidos suelen reflejar la de los aminoácidos integrantes.

Aunque la mayor parte de los péptidos se hayan integrados en las proteínas existen algunos que se encuentran libres en la naturaleza y tienen funciones especializadas. Como ejemplo tenemos las hormonas peptídicas (insulina y oxitocina), otros péptidos tienen poder antibiótico (gramicidina) o son cofactores en reacciones bioquímicas (glutatión).

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FAC. DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

PRÁCTICA No. 7

IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	2 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Que el alumno aprenda el método analítico de cromatografía en capa fina identificando un aminoácido en una solución problema.

Fundamento:

El estudio y caracterización de las distintas biomoléculas (azúcares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) requiere en numerosos casos su aislamiento y purificación a partir de mezclas complejas como son los preparados de cualquier material biológico. Una de las técnicas bioquímicas más clásicas y utilizadas para dicho fin es la cromatografía. La

cromatografía incluye una amplia gama de técnicas, que se pueden clasificar atendiendo al fundamento fisicoquímico en el que se basa la separación (cromatografía de adsorción, de reparto, de cambio iónico, de filtración molecular, hidrofóbica y de afinidad), o al material sobre el que se lleva a cabo (cromatografía en papel, capa fina, en columna y de gases).

Todas las técnicas intentan explotar las diferencias físicas, químicas y biológicas de las distintas biomoléculas para llevar a cabo su separación y aislamiento.

Entre dichas propiedades podríamos citar:

- a) Diferencias en solubilidad en distintos solventes, tanto orgánicos como acuosos.
- b) Diferencias en tamaño y forma.
- c) Diferencias en carga.
- d) Diferencias en afinidad por otras biomoléculas.

Todas estas propiedades y, por tanto, la separación de diferentes compuestos está influenciadas por las condiciones del medio de separación, pH, temperatura, fuerza iónica e hidrofobicidad.

De forma general, en las técnicas cromatográficas existe una distribución de las moléculas entre dos fases, la fase estacionaria o parte del sistema separador que permanece fija en el espacio, y la fase móvil que circula sobre la fase estacionaria en íntimo contacto con ésta.

En la cromatografía en capa fina (CCF), se puede utilizar como soporte cualquier sustancia que puede dividirse en partículas finas y distribuirse uniformemente en forma de láminas. Esto incluye sustancias inorgánicas (gel de sílice, óxido de aluminio, tierra de diatomeas, silicato de magnesio, etc.) y orgánicas (celulosa, poliamida, polietileno, etc.). La utilización de

soportes hidrófobos facilita la separación de compuestos no polares (lípidos, por ejemplo). En la CCF, la fase estacionaria es una lámina de 0.25-0.50 mm de espesor, extendida de forma uniforme sobre la superficie de una placa de vidrio o plástico. El volumen de muestra a aplicar es crítico, ya que va a afectar a la resolución (separación de los componentes de una mezcla compleja), y depende de la concentración del compuesto o compuestos de interés en la muestra. Para soluciones concentradas bastará una cantidad muy pequeña (rango de μl) para aplicar suficiente cantidad de los solutos a separar sin llegar a saturar la capacidad de resolución de la placa cromatográfica. Para soluciones muy diluidas, deberá aplicarse un volumen suficiente (de hasta varios ml) para asegurar una cantidad detectable de soluto o solutos de interés. El solvente se desplaza a través del soporte por capilaridad provocando un reparto de los solutos entre él y la fase estacionaria de acuerdo con sus solubilidades relativas (coeficientes de reparto). Las manchas correspondientes a cada compuesto, si no son visibles, se pueden revelar mediante técnicas analíticas concretas. Se determina la posición de cada mancha relativa al frente alcanzado por el solvente, calculándose el correspondiente valor de R_f . La identificación de tales

compuestos se suele realizar comparando sus R_f con los de compuestos de referencia (patrones) de naturaleza química conocida.

La CCF presenta una serie de ventajas respecto a cromatografías alternativas, como es la de papel, tales como las siguientes:

- I. Una mayor resolución, obteniéndose por lo general manchas más pequeñas.
- II. Una mayor velocidad de separación.
- III. Pueden utilizarse un gran número de materiales como soportes y disolventes.
- IV. Los compuestos pueden ser detectados con facilidad y su recuperación es muy simple.

La mayor resolución obtenida por CCF se debe a que pueden formarse partículas muy finas del soporte, por lo que la relación superficie/volumen es muy elevada, proporcionando una gran área superficial por unidad de longitud. Esto se traduce en que la cantidad de muestra que se puede aplicar es mayor y la difusión es mucho menor. La ventaja respecto a la cromatografía en papel es que éste tiene una estructura fibrosa y la capilaridad asociada a las fibras tiende a aumentar la difusión de las moléculas.

Reacciones coloreadas de los aminoácidos

Los métodos colorimétricos de determinación de aminoácidos se basan en la reacción específica de éstos con determinados compuestos, dando derivados coloreados. La formación de color se toma como resultado positivo e indica su presencia, mientras que el no desarrollo de color es indicativo de que no está presente. Para cada prueba se utilizará un control negativo, también denominado blanco de la reacción, en el que el reactivo se añadirá a agua destilada (o solvente adecuado). Aunque en la presente práctica se llevará a cabo la determinación cualitativa de aminoácidos (ausencia o presencia de dichos compuestos), las reacciones coloreadas pueden también ser utilizadas para la determinación cuantitativa de dichas biomoléculas.

Hay una amplia gama de métodos colorimétricos que permiten la determinación cuali-cuantitativa de aminoácidos, entre ellos el más general y utilizado es el de la reacción con ninhidrina. La ninhidrina (hidrato de tricetohidrendeno) reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico, con reducción del reactivo (ninhidrina) a

hidrindantina. La hidrindantina reacciona a su vez con el amoníaco y otra molécula de ninhidrina para dar un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, con la excepción de la prolina que da una coloración amarillenta (recordar que en la prolina el grupo amino está sustituido). El derivado coloreado presenta máximo de absorción en torno a 570 nm. La reacción se lleva a cabo en caliente y a valores de pH comprendidos entre 4 y 8.

Las aminas primarias ($R-CH_2-NH_2$) dan también positiva la prueba de la ninhidrina, aunque en este caso no se libera CO_2 . La técnica es muy sensible, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, utilizándose para revelar su presencia en cromatogramas y fracciones procedentes de otras técnicas de separación. La presencia de aldehídos resultantes de la degradación de la ninhidrina por reacción con los aminoácidos modifica, bajo ciertas condiciones, el color formado, lo que sirve para identificar el tipo de aminoácido.

Material y reactivos:

Material de laboratorio

Placa de sílica gel para cromatografía en capa fina.

Agitador de tubos.

Tanque cromatográfico.

Gradillas con tubos de ensayo.

Juego de pipetas (0.5, 1, 2, 5, 10, y 25 mL).

Micropipetas

Probetas (100 y 250 mL).

Vasos de precipitado (100 y 500 mL).

Frasco lavador con agua destilada.

Recipientes de muestras biológicas de 50 mL.

Papel de filtro.

Capilares para aplicar muestras.

Papel de parafilm.

Rotulador de vidrio.

Pipetas Pasteur de plástico.

Guantes de látex.

Frascos pulverizadores.

Tijeras.

Reactivos

Glutamato.

Glicina.

Lisina.

Prolina.

Leucina.

Solución problema de aminoácidos.

Etanol.

Hidróxido amónico.

Ninhidrina.

Procedimiento:

Usar guantes para manejar la placa.

1. Sobre una placa de sílica gel de 20 x 20cm se traza con un lápiz una recta paralela a uno de los bordes y a una distancia de éste de 2 cm. Sobre esta

- línea se pone 6 puntos equidistantes entre si y sobre los bordes.
2. En cada punto (identificado con el nombre de cada uno de los aminoácidos) se aplicarán tres gotas de la solución de aminoácidos y solución problema (un aminoácido en cada punto y en el último la solución problema). Se utiliza un capilar para aplicar la muestra gota a gota (hacerlo con mucho cuidado).
 3. Se seca después de haber aplicado cada gota. Se marca con lápiz, y en el extremo opuesto de la placa, algún indicativo del grupo que realiza la cromatografía.
 4. Se añade al tanque cromatográfico eluyente hasta una altura aproximada de 1 cm y sin que éste alcance la zona de aplicación de las muestras. Se mete la placa en el tanque, se tapa y se deja desarrollar la cromatografía hasta que el eluyente alcance el borde superior, sin llegar a sobrepasarlo (2-3h aproximadamente).
 5. Terminada la cromatografía se saca la placa, se marca la distancia recorrida por el eluyente, se seca dentro de la campana de gases con la ayuda de un secador de aire y se rocía con un pulverizador que contiene la solución reveladora (en la campana de gases). La placa se secará haciéndole llegar aire caliente con el secador.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

¿Qué aminoácidos hay en la mezcla problema?

En la siguiente tabla anote las distancias recorridas por cada uno de los aminoácidos y Calcule el Rf.

Aminoácido	Distancia recorrida (cm)	Rf
Glutamato		
Glicina		
Lisina		
Prolina		
Leucina		

$$Rf = \frac{\text{distancia desde el punto de aplicación al centro de la mancha}}{\text{Distancia desde el punto de aplicación al frente del eluyente}}$$

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. Consulte, en diversos textos, los tipos de cromatografías que existen y sus aplicaciones.
2. ¿Qué propiedades ácido- base poseen los aminoácidos?
3. ¿Qué son los péptidos?
4. ¿Por qué hay algunos aminoácidos llamados esenciales y cuáles no?
5. ¿Cuáles son los elementos de la cromatografía en capa fina?

Referencias Bibliográficas.

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Proteínas

PROTEÍNAS

Las proteínas son moléculas cuyas propiedades químicas originan a la mayoría de las funciones biológicas. Son polímeros de aminoácidos, cada aminoácido de los que componen las proteínas contiene un grupo amino y un carboxilo, que sirven para la unión de las moléculas formando largas cadenas. El enlace se produce entre el nitrógeno amínico de un aminoácido y el carboxilo del siguiente y es de tipo amida. Este enlace se forma por la eliminación de los elementos de agua del grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del otro.

Los polímeros lineales producidos se denominan cadenas peptídicas, estando las proteínas formadas de una o algunas veces de más cadenas peptídicas. Las diferentes proteínas se forman de 20 aminoácidos que contienen grupos sustituyentes distintos o cadenas laterales que no participan en la polimerización de las cadenas peptídicas. Una cadena peptídica tendrá en consecuencia una disposición de grupos químicos a lo largo de su estructura que dependerá de los diferentes grupos de aminoácidos que la integran y del orden en que se encuentran unidos. Un cambio de esta secuencia o estructura primaria del péptido creará

nuevas posiciones de los grupos químicos y cambio en las propiedades del péptido.

Plegado de las cadenas peptídicas.

Estructura primaria: es la secuencia lineal de residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. En esta estructura está implícito el enlace peptídico que se forma entre cada uno de los aminoácidos, pero no incluye ninguna otra fuerza o enlace.

Estructura secundaria: se refiere a los patrones de plegamiento regulares de porciones contiguas de la cadena polipeptídica. La α -hélice y la lámina β -plegada constituyen ejemplos:

α -hélice: la hélice α de una proteína es una hélice con giro a la derecha, lo que indica que la cadena gira en el sentido de las manecillas del reloj conforme se observa hacia abajo a lo largo de la hélice el avance de la cadena polipeptídica.

Lámina β -plegada: los átomos se sitúan en un plano plegado y las cadenas laterales de residuos sucesivos a lo largo de la cadena polipeptídica sobresalen alternadamente por arriba y por debajo del plano general de la estructura.

Estructura terciaria: se refiere a la estructura tridimensional en particular los enlaces que se forman entre residuos de aminoácidos que están distantes entre sí

en la cadena polipeptídica y el arreglo de los elementos de la estructura secundaria con respecto uno del otro. El término de estructura terciaria se aplica a proteínas globulares.

Estructura cuaternaria: define la estructura que resulta de las interacciones entre las unidades polipeptídicas individuales de una proteína que contiene más de una subunidad. De este modo, la enzima fosforilasa contiene 2 subunidades idénticas que solas son catalíticamente inactivas pero cuando se unen en un dímero forman la enzima activa. Cuando la estructura se forman de 2 subunidades se denomina estructura cuaternaria homogénea, si son distintas las dos subunidades se denomina estructura cuaternaria heterogénea.

Desnaturalización de las proteínas

Se llama desnaturalización de las proteínas a la pérdida de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estadístico sin ninguna estructura tridimensional fija.

Una proteína desnaturalizada cuenta únicamente con su estructura primaria. Por este motivo, en muchos casos, la desnaturalización es reversible. El proceso mediante el cual la proteína

desnaturalizada recupera su estructura nativa se llama re naturalización.

Todos los niveles estructurales de una proteína globular, desde el secundario al cuaternario dependen de un conjunto de interacciones químicas. La conformación fina refleja un equilibrio de estas fuerzas: interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrogeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y los entrecruzamientos covalentes (uniones disulfuro). Los productos de desnaturalización en solución se agregan físicamente y según las condiciones de pH y fuerza iónica, precipitan.

Tres métodos se suelen usar: temperatura, pH y solventes orgánicos. Si bien el fundamento de cada uno de ellos es distinto, no son independientes entre sí. La desnaturalización por temperatura depende fuertemente del pH y viceversa. En el fraccionamiento por solventes orgánicos, pH y fuerza iónica deben estar claramente definidos.

Temperatura: muchas proteínas se desnaturalizan por calor, que afecta las interacciones débiles como enlaces hidrógeno. El cambio es abrupto, la pérdida de la estructura en una parte de la proteína desestabiliza el resto.

pH: los pH's extremos causan desnaturalización porque áreas de la molécula proteica adquieren cargas, causando repulsión, otras áreas pierden

cargas que estaban involucradas en mantener la estructura.

Solventes orgánicos: los solventes orgánicos miscibles con el agua producen una variedad de efectos que, combinados, permiten la precipitación de proteínas.

La desnaturalización por solventes se debe a que las moléculas de los solventes interfieren con las interacciones hidrofóbicas en el interior de las proteínas. Este proceso se ve favorecido a temperaturas mayores de 0°C.

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA**

PRÁCTICA No. 8

IDENTIFICACIÓN GENERAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Determinar la presencia de péptidos y proteínas mediante reacciones de identificación específicas.

Fundamento:

En esta práctica se verificarán reacciones de desnaturalización y precipitación de proteínas, que tienen importancia en métodos de separación de algunas proteínas o explican los efectos del calor o los metales pesados y ácidos sobre la actividad de las mismas.

a) Precipitación de Proteínas con Etanol y Acetona. La adición de disolventes orgánicos neutros miscibles con el agua, particularmente etanol o acetona disminuye la solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares en el agua de tal manera que precipitan de su

disolución incrementando la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos R de la proteína.

b) Precipitación de las Proteínas por Metales. Las proteínas forman sales insolubles con algunos iones metálicos. Esta reacción es útil para eliminar las proteínas, de una solución. En presencia de cationes de metales pesados se forman sales de proteinato metálico que pueden ser solubles o insolubles según la naturaleza del metal. En general, las sales proteínicas de Na, K y Mg son solubles, pero las de Hg, Pb, Cu y Zn son insolubles.

c) Precipitación Salina. Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares de tal manera que a medida que la fuerza iónica

aumenta la solubilidad de una proteína comienza a disminuir.

d) Precipitación de las Proteínas por los Ácidos. Cuando las soluciones de proteínas se acidifican, adquieren una carga negativa positiva. Las proteínas actúan como base y pueden formar sales con los ácidos o los aniones que se le añadan. Algunas de estas sales resultan insolubles. Se utilizan ácidos como el túngstico tanto para aislar proteínas como para quitarlas de soluciones.

e) Prueba de Biuret para Enlaces Peptídicos. En la prueba de Biuret el sulfato alcalino de cobre reacciona con compuestos que contienen dos o más enlaces peptídicos dando un complejo de coloración violeta. La intensidad del color obtenido es una medida del número de enlaces peptídicos presentes en la proteína. La reacción no es absolutamente específica para los enlaces peptídicos, ya que cualquier compuesto que contenga dos grupos carbonilos unidos por un átomo de nitrógeno o de carbono da un resultado positivo.

La reacción de Biuret debe su nombre a que también es positiva con la biurea, por poseer un enlace peptídico. El color se debe a la formación de un complejo de coordinación del cobre con cuatro átomos de N peptídico. El método de Biuret es muy útil por ser mucho más sencillo que el clásico método de Kjeldahl.

f) Desnaturalización por Calor y pH Extremos. La desnaturalización de las proteínas implica modificaciones, en grado

variable, de su estructura original o nativa, con la consiguiente alteración o desaparición de sus funciones. El fenómeno puede producirse por una diversidad de agentes físicos: Calor, radiaciones ultravioleta, altas presiones, o químicos, como los ácidos, los álcalis, la urea y la sustancias con actividad de detergente. Las uniones disulfuro también son sensibles a los agentes desnaturizantes; en ocasiones esta alteración es reversible cuando se elimina el agente agresivo.

La ruptura de los puentes de hidrógeno puede causar la desnaturalización y un menor plegamiento de la cadena peptídica. En las proteínas desnaturizadas están disminuidas la solubilidad, la viscosidad, la velocidad de difusión y la facilidad con que se cristalizan.

Los cambios físicos coinciden con modificaciones químicas: cuando se rompen los puentes disulfuro se ponen en libertad grupos $-SH$ con sus propiedades características; al desplegarse las cadenas pueden aparecer otros grupos activos o funcionales. Siendo la conformación de la molécula proteínica la base principal de su actividad fisiológica, al desnaturizarse se pueden desarreglar los grupos que determinan su actividad funcional y de esta manera, se alteran sus características fisiológicas. Por ejemplo, las globulinas del suero humano desnaturizadas pierden sus funciones de anticuerpos.

Material y procedimiento experimental:

Material de laboratorio:

Papel filtro

1 Pipeta graduada de 10 mL

3 pipetas graduadas de 5 mL

1 Gradilla

12 Tubos de ensaye 13 x 100

Baño de agua hirviendo

Embudo de filtración

Vaso de precipitado de 250 mL

Material biológico:

Clara de huevo diluida 1:5 con agua destilada.

Reactivos:

- Etanol al 95%

- HgCl₂ al 5%

- AgNO₃ al 5%

- Disolución saturada de sulfato de amonio.

- Ninhidrina.

- Disolución de sulfato de amonio al 50%

- Disolución de sulfato de amonio al 10%

- Albúmina, caseína, gelatina y peptona al 0.5%

- Solución de tungstato de sodio

- Solución de albúmina 1%

- Ácido pícrico

- Ácido tricloroacético

- Ácido acético diluido

- Ácido sulfosalicílico

- Ácido clorhídrico 0.1 N

- Ácido clorhídrico (1 mol/L)

- Ácido nítrico concentrado.

- Hidróxido de sodio 0.1 N

-Hidróxido de sodio al 40 %

- Hidróxido de sodio (1 mol/L)

- Sulfato de cobre al 1 %

a) Precipitación de Proteínas con Etanol y Acetona.

1. A 2 mL de la clara de huevo diluida agregar 2 mL de alcohol al 95%.

2. Anotar el resultado observado.

b) Precipitación de las Proteínas por Metales.

1. Preparar dos tubos con 1 mL de clara de huevo diluida cada uno.

2. Agregar a uno de ellos 5 gotas de AgNO₃ al 5% y al otro 5 gotas de HgCl₂ al 5%.

3. Mezclar bien y anotar el resultado.

c) Precipitación Salina.

1. Pesar exactamente 3 papeles filtro y anote los pesos.

2. Tomar 2 mL de clara de huevo diluida, dilúyalos en 2 mL de agua.

3. Agregar agitando 2 mL de disolución saturada de sulfato de amonio.

4. Filtrar a través de uno de los papeles filtros previamente pesados.

5. En el filtrado determine la presencia de proteínas con ninhidrina.

6. Repetir el procedimiento con otros 2 mL de clara de huevo diluida utilizando disolución

al 50% de sulfato de amonio, y con otros 2 ml utilizando disolución de sulfato de amonio al 10%.

7. Dejar secar perfectamente los papeles, y péselos.
8. Anotar los pesos de los 3 precipitados obtenidos, que han quedado retenidos en los papeles filtro.

d) Precipitación de las Proteínas por los Ácidos.

1. Añadir algunas gotas de solución de tungstato de sodio a 3 mL de solución de albúmina al 1%.
2. Acidificar ésta solución con ácido acético diluido.
3. Sin emplear tungstato repita el experimento con ácido pícrico, tricloroacético o sulfosalicílico y se someter algunas de las

proteínas disponibles a estos reactivos. No es necesario añadir ácido después. Volver a disolver alguno de los precipitados proteínicos.

e) Prueba de Biuret para Enlaces Peptídicos.

1. A 2 mL de la muestra agregar 5 gotas de sulfato de cobre.
2. Añadir 2 ml de NaOH al 40 %.
3. Mezclar vigorosamente y observar los colores formados.

f) Desnaturalización por Calor y pH Extremos.

1. En 4 tubos de ensaye colocar 5 mL de cada una de las proteínas y agregar 0.5 mL de HCl 0.5 de NaOH y 0.5 mL de agua.
2. Colocar los tubos en el baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriar a temperatura ambiente.
3. Ajustar los tubos ácidos y alcalinos hasta la neutralidad agregando álcali o ácido según sea necesario.
4. A 2 mL de la solución de proteína, agregar lentamente por las paredes del tubo 2 mL de HNO₃ concentrado hasta que se formen dos capas.
5. Mezclar cuidadosamente los 2 líquidos y observe.

HOJA DE RESULTADOS:

Nombre:

Fecha:

Grupo:

1.- Anotar tus observaciones en el siguiente cuadro:

Reacción		Observaciones
a) Precipitación con etanol y acetona.		
b) Precipitación de las proteínas por metales.		
c) Precipitación salina.		
d) Precipitación de las proteínas por los ácidos.		
e) Prueba de Biuret para enlaces peptídicos.		
f) Desnaturalización	por calor	
	pH extremos	

Discusión de resultados:

Conclusiones:

Cuestionario:

- 1.-Escriba la reacción de formación de biurea por calentamiento de la urea.
- 2.-Escriba la fórmula del complejo de coordinación de la biurea con los iones Cu^{+2} .
- 3.-Describe el método calorimétrico para evaluar proteínas basándose en la formación de complejos tipo Biuret.
- 4.-Las proteínas pueden clasificarse según sus funciones biológicas en:
- 5.- ¿Cuál de las siguientes proteínas tiene una estructura cuaternaria? Explica tu respuesta.
 - a) α -quimotripsina
 - b) hemoglobina
 - c) insulina

- d) mioglobina
- e) tripsina

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA
PRÁCTICA No. 9
CRISTALIZACIÓN DE LA ALBÚMINA DE HUEVO

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

El alumno separará por medio de cristalización una proteína, a partir de huevo.

Fundamento:

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares, esta capacidad para influir en la solubilidad de las proteínas está en función de su fuerza iónica, que constituye una medida, tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas existentes en los cationes y los aniones aportados por la sal.

A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Las sales de iones divalentes tales como el $MgCl_2$ y el $(NH_4)_2SO_4$ son más eficaces para la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el $NaCl$, NH_4Cl y el KCl .

La adición de disolventes orgánicos miscibles en agua, particularmente etanol y acetona, disminuye la solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares en el agua, de tal manera que producen su precipitación.

Material y reactivos:

Material de laboratorio

Probeta de 200 mL

Embudo de filtración

Varilla de vidrio

Gasa

Reactivos

Ácido acético 1N

Solución de sulfato de amonio al 50%

Material biológico

1 huevo

Procedimiento:

1. Medir 10 mL de clara de huevo
2. Agitar las claras y añadir 0.1 mL de ácido acético 1N, se filtra para romper las membranas agitando fuertemente con una varilla para acelerar el paso por la gasa.
3. Se miden 8 mL de filtrado y se añaden 8 mL de la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%, y se deja precipitar por 30 min., se separa por centrifugación el precipitado de globulina de huevo a velocidad de 3500 rpm.

4. Se juntan los SN que son de color amarillo transparente, se mide el volumen y se añade un volumen igual de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% (la cantidad añadida dependerá de la formación del precipitado). El sobrenadante amarillo al ponerse en contacto con él $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se torna de color blanco lechoso, se observa precipitación.
5. Se agita esporádicamente.
6. Se deja la mezcla en el refrigerador durante 2 a 5 días.
7. Se separan los cristales de albúmina por centrifugación.
8. Suspender en acetona (5 mL) y recuperar filtrando en embudo Buchner.
9. Secar al aire.
10. Guardar en un vial etiquetado.

Los residuos generados no se consideran tóxicos y se pueden verter en la tarja.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

Observar los cristales obtenidos, anotar sus características y esquematizarlos.

Comparar los resultados obtenidos con datos bibliográficos y determinar si la estructura es parecida.

Discusión.

Conclusión.

Cuestionario:

1. Sugieran métodos de identificación de los cristales obtenidos con base en el peso molecular.
2. ¿Qué es la albúmina?
3. ¿Por qué se utiliza sulfato de amonio al 50%?

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 10
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Que el alumno cuantifique una proteína utilizando dos métodos diferentes, compare los métodos y establezca su eficiencia.

Método basado en la unión directa del colorante azul de Coomasie a la estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos. El colorante cambia de color de marrón a azul al unirse a las proteínas.

Fundamento:

Existen diferentes métodos que permiten la cuantificación de proteínas en muestras biológicas, tres de los más usados, que se basan en las diferentes propiedades de las proteínas, son:

Método de Coomasie (Bradford)

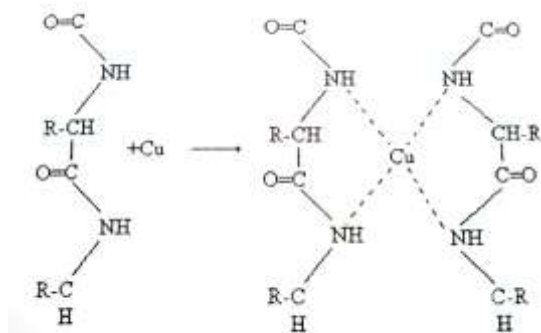
Método de Biuret

Método de Coomasie (Bradford)

Método de Biuret

Basado en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{++} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos.

Se requiere al menos dos enlaces peptídicos para dar positiva esta reacción el máximo de absorción del complejo proteína- Biuret se produce a 545nm, cuando se lee la absorbancia frente a un blanco constituido por el reactivo de Biuret.



Sol. std	0	0.25	0.5	0.75	1
Sol. pb	-	-	-	-	-
agua	1	0.75	0.5	0.25	0
Reactivo A	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Reactivo B	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Material y reactivos:

Material de laboratorio

Vaso de precipitado de 250 mL

10 tubos de ensaye

2 pipetas graduadas de 5 mL

2 pipetas graduadas de 1 mL

Gradilla

Reactivos

Solución estándar de albúmina 20mg/100mL

Reactivo de Biuret A

Reactivo de Biuret B

Reactivo de Bradford

Procedimiento

Nota: para cada determinación se debe respetar el orden de adición de los reactivos y los tiempos de incubación.

Determinación cuantitativa por Método de Biuret.

1. Preparar una serie de tubos de acuerdo al siguiente cuadro:

Tubos	1	2	3	4	5
-------	---	---	---	---	---

2. Después de 10 min, leer la absorbancia a 540nm.

Determinación cuantitativa de proteínas por el método de Bradford.

1. Prepare una serie de tubos como se indica en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Sol. std	1	0.75	0.5	0.25	0	-	-
Sol. pb	-	-	-	-	-	0.5	0.5
Buffer de fosfatos pH 7.0	0	0.25	0.5	0.75	1	0.5	0.5
Reactivo Bradford	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

2. Agitar en vórtex y leer absorbancia a 595nm.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

1. Anota los resultados en la siguiente tabla:

Tubo	Concentración (mg)	Absorbancia (595nm) Método de Bradford	Absorbancia (540nm) Método de Biuret
1	0		
2	0.05		
3	0.10		
4	0.15		
5	0.20		

- Grafica la curva patrón para cada método colocando en las abscisas mg de albúmina y en las ordenadas la absorbancia.
- Interpola en la curva las lecturas de los problemas y calcula la concentración de los mismos en mg de proteína/ mL.
- Determina la concentración de proteína del problema para cada método.
Ajustar por regresión lineal.

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

- Mencione y describa brevemente tres métodos para el aislamiento y purificación de proteínas.
- ¿Por qué se utilizó diferente longitud de onda?
- Plantee las diferencias de cada método y elija el que de acuerdo a los cálculos realizados le reporte más eficiente.

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Enzimas

ENZIMAS

La enorme variedad de reacciones bioquímicas que comprenden la vida es mediada, casi todas ellas por una serie de catalizadores biológicos notables conocidos como “enzimas”. Aunque las enzimas se hallan sometidas a las mismas leyes naturales que gobiernan el comportamiento de otras sustancias, se diferencian de los catalizadores químicos ordinarios en varios aspectos:

- Velocidades de reacción más elevadas.
- Condiciones de reacción más suaves.
- Especificidad de reacción mayor.
- Capacidad para la regulación.

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas. Generalmente existen en muy bajas concentraciones en las células, donde aumentan la velocidad de una reacción sin alterar su equilibrio; es decir, las velocidades de reacción directa e inversa aumentan en un mismo factor, que generalmente es de alrededor de 10^3 – 10^{12} . La existencia y capacidad de las enzimas se conoció por primera vez durante el siglo XIX cuando se encontró que las reacciones que se habían considerado que ocurrían sólo en presencia de células también eran mediadas por extractos libres de éstas.⁸

Aunque Luis Pasteur reconoció que la fermentación es catalizada por enzimas

postuló en 1860 que estos se hallaban ligados de modo inseparable con la estructura y la vida de las células de la levadura. En 1897 E. Buchner consiguió extraer las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica de las células de levadura. En 1926 J.B. Sumner cristalizó por primera vez la enzima ureasa y entre 1930 y 1936 Northrop aisló pepsina cristalizada, la tripsina y la quimiotripsina. En la actualidad se han identificado cerca de 2000 enzimas diferentes.¹⁷

Muchas enzimas se identifican por la adición del sufijo- asa al nombre de la sustancia o sustrato que hidrolizaban, de este modo, las lipasas hidrolizan grasas (lipos en griego). Aunque hasta hoy persisten numerosos vestigios de esta terminología, demostró ser inadecuada cuando se descubrieron varias enzimas que catalizan reacciones diferentes del mismo sustrato. Aunque el sufijo – asa sigue en uso, en la actualidad los nombres de las enzimas enfatizan el tipo de reacción catalizada, ejemplo, las deshidrogenasas catalizan la eliminación de hidrogeno; aun así surgieron ambigüedades inevitables. Para remediar esta deficiencia, la Unión Internacional de la Bioquímica IUB (International Union of Biochemistry) adoptó un sistema complejo pero inequívoco basado en el mecanismo de reacción.²¹

Especificidad del sustrato

Las fuerzas no covalentes mediante las que los sustratos y otras moléculas se unen a las enzimas son de carácter idéntico a las fuerzas que dictan las conformaciones de las proteínas, en ambas intervienen interacciones Vander Wasls, electrostáticas, enlaces de hidrógeno e hidrofóbicas. En general el sitio de unión del sustrato está constituido por una entalladura o grieta sobre la superficie de la molécula de una enzima que es de forma complementaria con la del sustrato. Además, los restos de un aminoácido que forman el sitio de unión se hallan dispuestos para interactuar específicamente con el sustrato de una manera atractiva (Fig. 3.1).

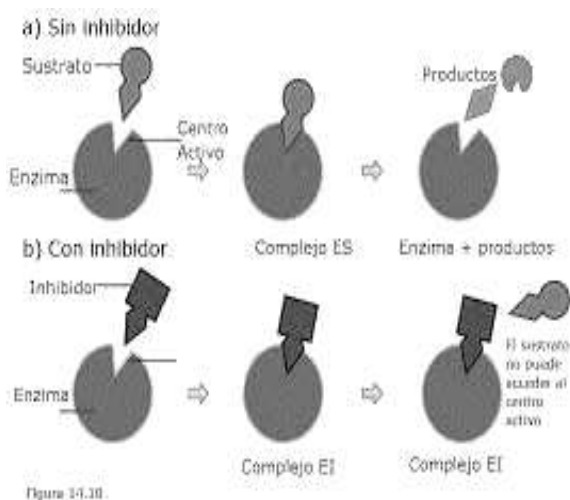


Figura 3.1

Complejo enzima-sustrato que ilustra las complementariedades geométrica y física entre las enzimas y su sustrato en presencia y en ausencia de un inhibidor.

Las moléculas que se diferencian en la forma o distribución del grupo funcional

respecto al sustrato no pueden unirse de modo productivo a la enzima, es decir, no pueden formar complejos enzima- sustrato que conduzca a la formación de producto.

Además, muchas enzimas tienen pequeñas moléculas no proteínicas asociadas con o cerca del sitio activo que determina la especificidad del sustrato. Estas moléculas se denominan **cofactores** si no están unidas covalentemente a la proteína y **grupo prostético** si están unidas covalentemente.

Inhibición enzimática

Con frecuencia las velocidades de reacción enzimática son afectadas por sustancias que no son sustratos; cuando un compuesto reduce la velocidad de una reacción se dice que es inhibidor. En el manejo de inhibidores, es importante distinguir entre los efectos que se observan experimentalmente y los mecanismos propuestos para explicarlos.

Existen tres tipos básicos de inhibición. Estos se definen en términos del grado de inhibición i , el cual se define como:

$$i = \frac{V_0 - V_1}{V_0}$$

Donde V_0 y V_1 son las velocidades iniciales de reacción no inhibida e inhibida respectivamente.

1. Existe una inhibición no competitivamente pura si i no es afectada por la concentración del sustrato.
2. Existe inhibición competitiva si i disminuye a medida que aumenta la concentración del sustrato.
3. Existe inhibición incompetitiva o incompetitiva si i aumenta a medida que se incrementa la concentración del sustrato.

Cinética enzimática

La cinética enzimática comprende el estudio de los factores que participan y regulan las reacciones químicas catalizadas por enzimas. Las leyes generales de la catálisis y de las interacciones químicas son aplicables a las reacciones enzimáticas, excepto por un factor específico de las enzimas que es su estabilidad, con el peligro de su desnaturalización y la pérdida de su capacidad catalítica, por ejemplo, debido a los cambios extremos de pH o de temperatura.

La única manera de caracterizar funcionalmente una enzima es por medio del análisis integral de su cinética que comprende diversos factores como el tiempo de reacción, la concentración de la enzima y del sustrato, etc.¹⁵

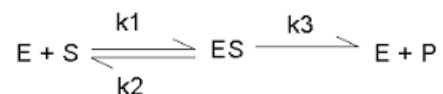
Esencialmente es una materia experimental relacionada con dos aspectos principales. El primero implica el diseño de los experimentos, incluyendo métodos para determinar el progreso de la reacción. El

segundo se refiere a la interpretación de los datos.¹⁴

Ecuación de Michaelis y Menten

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v) y la concentración inicial del sustrato ($[S]_0$) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas:

- Formación del complejo Enzima-sustrato
- Formación del producto



K_1 , K_2 y K_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso, según esto podemos afirmar que:

$$V_1 = K_1[E][S]$$

$$V_2 = K_2[ES]$$

$$V_3 = K_3[ES]$$

Donde:

E = enzima libre

ES = enzima unido al sustrato

E_T = concentración total de enzima

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

Como $[E] = [E_T] - [ES]$, resulta que

$$V_1 = K_1[E_T][S] - K_1[ES][S]$$

Este modelo cinético adopta la hipótesis del estado estacionario. Por lo tanto, la velocidad de formación del complejo E-S (V_1) es igual a la de su disociación ($V_2 + V_3$).

Además como $[ES]$ es constante, la velocidad de formación de los productos es constante:
 $V = V_3 = K_3[ES] = \text{constante}$.

Como ($V_1 = V_2 + V_3$) podemos decir que:

$$K_1[E_T][S] - K_1[ES][S] = K_2[ES] + K_3[ES]$$

Despejando $[ES]$:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]}, \text{ siendo } K_M = \frac{K_2 + K_3}{K_1}$$

Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto es

$$V = V_3 = K_3[ES] = \frac{K_3[E_T][S]}{K_M + [S]}$$

K_3 y $[E_T]$ son constantes y nos permiten introducir un nuevo parámetro, la velocidad máxima de la reacción (V_{max}). $V_{\text{max}} = K_3[E_T]$, que es la velocidad que se alcanza cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato.

Si introducimos este parámetro en la ecuación general de la velocidad de reacción obtendremos la expresión más conocida Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]}$$

PRÁCTICA No. 11

EFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMÁTICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA.

Evaluación	Realización de la práctica Vitacura Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

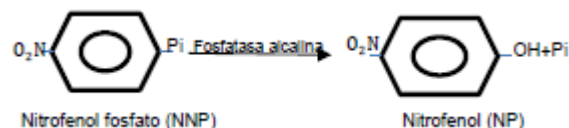
Determinar los cambios en la velocidad con respecto a la concentración del sustrato, de la enzima y el incremento de la temperatura.

Fundamento:

La cinética enzimática se ve afectada por varios factores de entre los que destacan la concentración del sustrato, la concentración de la enzima y la temperatura. En esta práctica se analizará el efecto de estos factores sobre la fosfatasa alcalina, la función fisiológica de esta es hidrolizar el enlace fosfoéster de compuestos orgánicos fosforilados, liberando el grupo fosfato terminal.

Como sustrato de esta enzima utilizaremos un compuesto artificial, el p- nitrofenil- fosfato (NPP), que puede ser reconocido por la enzima

puesto que posee una estructura a la que se encuentra unido un grupo fosfato:



El p- nitrofenol absorbe la luz a 410nm, en esta longitud de onda su coeficiente de extinción es de $16\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Esta propiedad nos permite seguir cuantitativamente su aparición en el transcurso de la reacción enzimática en el transcurso de la reacción enzimática.

El efecto de la concentración del sustrato lo observaremos añadiendo concentraciones de p- nitrofenil- fosfato en forma creciente,

realizaremos lecturas a 410nm y L= paso de luz (cm)
 determinaremos la concentración de p-

nitrofenol. En el caso del efecto de la concentración de la enzima se realizará el mismo procedimiento solo que en este caso la concentración del sustrato permanecerá constante y la de la enzima será creciente.

Para el efecto de la temperatura se utilizará un tubo en el cual tendremos una cantidad de enzima y de sustrato constante, la reacción se iniciará a 25 °C y se irá aumentando hasta 60 °C, en cada cambio de temperatura se tomará una muestra y se leerá a 410nm, la actividad enzimática se determinará de la misma manera que para los otros factores.

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina la calcularemos a partir de los micromoles (μMoles) de nitrofenol aparecidos, en un determinado tiempo de reacción (minutos) y en un determinado volumen de ensayo (mL).

Los micromoles de nitrofenol se calculan a partir de la concentración correspondiente al incremento de absorbancia a 410nm, según la ley de Lambert- Beer:

$$A = \epsilon \times C \times L$$

Siendo:

A= lecturas de absorbancia

ε= coeficiente de extinción (16mM-1*cm-1)

Despejando C de esta ecuación tenemos:

$$C(\text{mM}) = \frac{A_{410}}{\epsilon}$$

Puesto que L= 1 cm para calcular los μmoles NP

$$\mu\text{moles NP (n)} = C (\text{mM}) \times V_{\text{ensayo}}(\text{mL})$$

$$= \frac{A_{410}}{\epsilon} \times V_{\text{ensayo}}(\text{mL})$$

A partir de los valores obtenidos se pueden calcular la actividad de la preparación enzimática en:

$$AE \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{\mu\text{moles NP}}{V_{\text{enzima}} (\text{mL}) \times t (\text{min})}$$

AE= actividad enzimática

Sustituyendo el valor de n en la ecuación anterior tenemos:

$$AE (U/\text{mL}) = \frac{A_{410}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{ensayo}} (\text{mL})}{V_{\text{enzima}} (\text{mL})} \times \frac{1}{t (\text{min})}$$

Para calcular la concentración de NPP (sustrato) se utiliza la siguiente formula:

$$\text{Conc. NPP (mg/ mL)} = \text{NPP}_0 \times \frac{V_{\text{NPP}_0}}{V_{\text{total}}}$$

Material y procedimiento experimental:

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye
- Pipetas graduadas de 1 y 2 mL

2. Centrifugar 5 minutos a 2500 rpm
3. Separar el suero con una pipeta pasteur y colocarlo en un tubo limpio y seco.

Reactivos

- Tris – HCL 0.1M (pH 8)
- Fosfato de potasio 1 M
- Fosfatasa alcalina
- p-nitrofenilfosfato (0.5 mg/ mL)

Efecto de la concentración del sustrato.

1. Tomar 7 tubos de ensayo, rotularlos y seguir el procedimiento según la tabla:

Nota: todas las adiciones se hacen en mL.

Reactivos	B	1	2	3	4	5	6
NPP (0.5mg/mL)							
Tris- HCL 0.1M pH= 8							
Fosfatasa alcalina							
Incubar 15 minutos a 30 °C y leer.							

Material biológico

- Sangre humana

Procedimiento:

Nota: se recomienda dividir la práctica en tres sesiones para dar tiempo a los alumnos a entregar el reporte.

Para obtener la enzima fosfatasa alcalina se deben seguir los siguientes pasos:

1. Obtener una muestra se sangre humana (5 mL) y colocarla en un tubo sin anticoagulante.

HOJA DE RESULTADOS

1. Calcular los parámetros pedidos en la siguiente tabla:

Tu bo	Efecto sobre la concentración del sustrato		Efecto sobre la concentración de la enzima	
	Actividad enzimática (U/ mL)	Conc. NPP (mg/ mL)	Actividad enzimática (U/ mL)	Conc. NPP (mg/ mL)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

2. Representar en papel milimétrico la concentración de NPP (mg/ mL) frente a los valores de actividad enzimática (U/mL) obtenidos.
3. Llenar la siguiente tabla, que será útil para calcular K_M y V_{max} :

p- nitrofenil fosfato [S]	Cantidad de sustrato hidrolizada (V)

- a. Hacer una gráfica $1/V$ contra $1/[S]$
- b. Calcular K_M y V_{max} para esta enzima

Temperatura	Actividad enzimática (U/ mL)
25 °C	
30 °C	
40 °C	
50 °C	
60 °C	

- c. Graficar la temperatura contra actividad enzimática y observar el comportamiento.
 d. Observaciones:

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. ¿Qué es la velocidad de una reacción enzimática?
2. ¿Cómo se define las constantes de Michaelis (K_M) de una reacción enzimática?
3. ¿Cómo se define la velocidad máxima (V_{max}) de una reacción?
4. ¿Qué parámetros fundamentales influyen en la constante de velocidad de una reacción enzimática?
5. ¿Cuáles son las enzimas cuya determinación tiene valor diagnóstico?

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga:

<http://www.>

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

PRÁCTICA No. 12

EFFECTO DEL SUSTRATO, ENZIMA Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Objetivo:

Obtener un extracto enzimático crudo de catalasa a partir de una serie de sustratos animales y vegetales.

Fundamento:

La catalasa, como otras enzimas, es alterable por la presencia de activadores o de inhibidores y por todos los factores que afectan la estructura y conformación proteica, como son principalmente el pH y la temperatura.

Procedimiento experimental:

Material de laboratorio:

.Mortero con pistilo

- Gasa
- Baño maría
- 3 Pipetas graduadas de 10 ml
- 3 Pipetas graduadas de 5 ml
- 6 Tubos de ensaye
- 1 Tubo de ensaye de boca ancha
- Frasco de vidrio grande
- Termómetro
- 1 Embudo de filtración
- Agitador mecánico

- 2 Vasos de precipitados de 250 ml

- Gradilla
- Parrilla
- Navaja o exacto
- Arena lavada y seca
- Placa de toque

Material biológico:

Hígado de pollo o de res, gusanos, triturados, papa, manzana, frijol macerados en seco, 5 a 10 g de cada uno.

Reactivos:

- Agua oxigenada al 3%
- Solución de almidón al 2%
- Solución indicadora de lugol
- Reactivo de Benedict
- NaCN y $Pb(NO_3)_2$ al 5%

Determinación de catalasa:

1. Corte en trozos delgados cada uno de los tejidos disponibles y póngalos sobre papel absorbente, rotulando cuidadosamente su nombre. No deben

tocarse los tejidos con los dedos, sino manipularlos con pinzas.

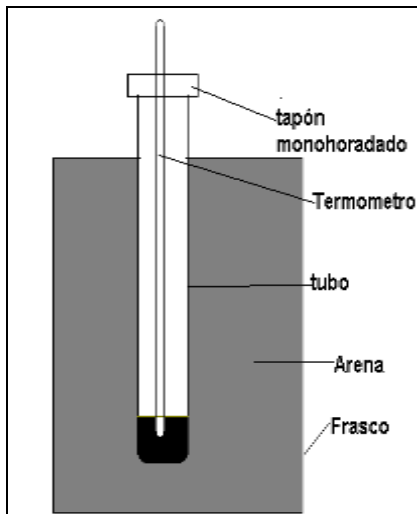
2. De cada tipo de tejido separe una porción, póngala en un tubo cubriéndola
3. con agua destilada e introdúzcalo en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, para que hierva el contenido del tubo. Coloque estas porciones hervidas sobre papel absorbente, anotando el nombre y la indicación de que se ha hervido.
4. Prepare una serie de tubos, 4 por cada tejido, marcados según una clave que permita distinguirlos. Agregue lo que se indica en el cuadro. Mezcle bien y póngalos a incubar en un baño a 37°C. Observe y anote lo que sucede en cada tubo. Cuando haya terminado con un tipo de tejido, lave bien los 4 tubos con agua destilada y empiece con otra serie. Marque con 1 a 5 cruces, según aprecie en cada caso la intensidad del burbujeo en cada tubo de cada serie.

(1 A 5+)				
----------	--	--	--	--

5. Prepare un calorímetro sencillo en la siguiente forma: Introduzca 1 tubo de

ensaye de boca ancha, con tapón monohoradado, de corcho (u oasis), en un frasco de vidrio suficientemente grande para contenerlo rodeado de material aislante térmico (lana de vidrio, arena o aceite). Separe una ventana en el material aislante, que permita observar el interior del tubo sin sacarlo; para ello puede usar 2 placas de vidrio, madera o nieve seca, del tamaño adecuado (ver figura 4.1). Introduzca un termómetro a través del tapón monohoradado, de manera que el bulbo quede sumergido al poner 10 ml de solución. Ponga 10 ml de H₂O₂ al 3%, tape y anote la temperatura inicial. Introduzca dos trozos pequeños de hígado o 10 gotas de sangre, en el tubo, tapándolo de nuevo rápidamente pero sin ajustar demasiado el tapón. Anote la temperatura cada 30 seg., durante 5 min.

CONTENIDO	1	2	3	4
H ₂ O ₂ al 3%	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
NaCN al 5%			5 gotas	
Pb(NO ₃) ₂ al 5%				5 gotas
Tejido	Porción sin hervir	Porción hervida	Porción sin hervir	Porción sin hervir
Resultado				



Calorímetro

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Fecha:

Grupo:

1. Realice una tabla donde indique la intensidad del burbujeo que apreció en cada tubo de cada serie.
- 2.- Anote la temperatura observada en el calorímetro para cada 30 segundos.

Discusión:

Conclusiones:

Referencias bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga:

<http://www.>

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

PRÁCTICA No. 13
EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN DE LA UREASA.

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	6 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Determinar, en forma práctica, la manera en que el pH y la temperatura afectan la actividad enzimática.

Fundamento:

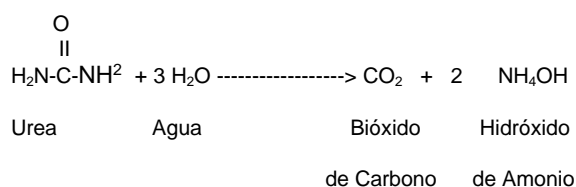
Uno de los factores que más pueden influir sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas, en condiciones biológicas, es el pH. Cada enzima tiene un pH óptimo de acción, que no siempre es cercano a la neutralidad, aunque este es el caso más frecuente. El efecto del pH sobre la velocidad de reacción depende o puede explicarse por:

- Una alteración de la carga eléctrica neta de la proteína, repercutiendo esto en su solubilidad.
- Una alteración de la estructura terciaria cuaternaria que determina el cambio a una conformación más activa o inactiva.
- Un efecto del cambio del pH sobre el sustrato.
- Los efectos anteriores combinados.

En procesos microbiológicos industriales, es importante determinar los efectos del pH sobre la velocidad de reacción, a fin de encontrar el pH óptimo para el rendimiento deseado. En estudios teóricos

sobre mecanismos de acción, determinación del sitio activo de una enzima y similares, también es muy útil establecer la curva de pH contra la actividad enzimática.

En la práctica se empleará HgCl₂, como envenenador de la enzima a fin de detener su actividad en el momento exacto que se desee y en el blanco, para eliminar toda traza de actividad atribuible a la enzima. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Material y procedimiento experimental

Material de laboratorio:

Gradilla
 Baño maría
 Parrilla
 8 Tubos de ensayo
 8 Matraces Erlenmeyer de 125 ml
 Bureta
 Termómetro

Material biológico:

Harina de haba o de soya 100 g.

Reactivos:

- Disolución de urea 0.25 M, 500 mL
 - Disolución de rojo de metilo al 0.04%, 50 mL
 Disolución de ureasa 50 mL

- Soluciones buffer de los siguientes pHs: 5, 6, 6.3, 7.2 y 8.5.
 - HCl 0.1 N, 1 litro.
 - HgCl₂ al 1%, 50 mL
 - Etanol
 - Acetona
 - Indicador de Shiro-Tashiro

a) Extracción de Ureasa

1. Para obtener harina de haba o de soya triturar perfectamente en un mortero las semillas desengrasadas, dejar secar perfectamente en un horno a 60° C durante la noche y pulverizar más el polvo seco.
2. Agitar la harina en un matraz con una mezcla de acetona-agua (3:1), en cantidad suficiente para cubrir perfectamente el polvo.
3. Filtrar la mezcla, lavando con pequeñas porciones de acetona.
4. El filtrado se deja en el refrigerador hasta que cristalice. Los cristales se pueden volver a cristalizar disolviéndolos en agua caliente y adicionando gota a gota acetona fría hasta conseguir un ligero enturbiamiento.
5. El extracto se debe conservar a pH 6.3, adicionándole la cantidad adecuada de buffer de fosfatos para lograr este pH. Puede emplearse alcohol en lugar de acetona, en especial si la harina es de soya.
6. En caso de emplear una ureasa comercial prepara la disolución para la prueba en

buffer de fosfatos a pH 6.3 a una concentración de 0.1%.

b) Determinación de la Actividad a diferente pH y temperatura.

1. Prepara dos series de tubos, 5 que sirvan como blanco y 5 que contendrán el problema, rotulando claramente, agregue lo que indica los cuadros e incubándolos como se indica,
2. Terminando el proceso de incubación, titule el contenido de cada tubo, en un matraz diferente, agregando 4 gotas del indicador Shiro-Tashiro o de rojo de metilo y para titular utilice HCl 0.1N.¹

I. Efecto pH:

1ra Serie	Tubos Blanco				
	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M (ml)	5	5	5	5	5
Buffer (ml)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
De pHs	5	6	7.2	8	10
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Incubar a 50° C durante 5 minutos, agitando					
Extracto de ureasa (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50° C durante 25 minutos, titular con HCl 0.1N					
Resultados (ml de HCl 0.1N)					

2da Serie	Tubos Problema				
	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M (ml)	5	5	5	5	5
Buffer (ml)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
De pHs	5	6	7.2	8	10
Extracto de ureasa (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50° C durante 30 minutos					
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Titular con HCl 0.1N					
Resultados (ml de HCl 0.1N)					

Diferencia entre titulaciones x 50 = micromoles de urea hidrolizados.

II. Efecto Temperatura:

1ra Serie	Tubos Blanco				
	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M (ml)	5	5	5	5	5
Buffer(ml) pH 6.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Temperatura de incubación (° C)	20	30	40	50	60
Tiempo de incubación 5 minutos.					
Extracto de ureasa (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar 25 minutos más y titular con HCl 0.1N					
Resultados (ml de HCl 0.1N)					

2da Serie	Tubos Problema				
	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M (ml)	5	5	5	5	5
Buffer (ml) pH 6.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Extracto de ureasa (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Temperatura de incubación (° C)	20	30	40	50	60
Tiempo de incubación 30 minutos					
HgCl ₂ al 1% (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Titular con HCl 0.1N					
Resultados (ml de HCl 0.1N)					

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Fecha:

Grupo:

- Grafique en papel milimétrico los micromoles de urea hidrolizados (ordenadas) contra el pH o temperatura según sea el caso (abscisas) y una los puntos en línea recta. Cálculos:
El número de micromoles de urea hidrolizados en cada tubo es igual a los ml de HCl 0.1 N multiplicados por 50, que se deduce de la siguiente forma: se necesitan dos moles de HCl por cada mol de urea hidrolizada. Así, la solución de HCl 0.1 N contiene 100 micromoles/mL, por lo que a cada ml le corresponden 50 micromoles de urea hidrolizados.
- Escriba la reacción balanceada y con fórmulas desarrolladas, de la hidrólisis de la urea.
- Escriba la reacción que ocurre entre el carbonato de amonio y el HCl durante la titulación.
- De acuerdo con los resultados de tu grafica ¿cuál es el pH óptimo y la temperatura óptima para la ureasa?

Discusión de resultados:

Conclusiones:

Cuestionario:

1. Una enzima la cual tiene su actividad máxima en pH 5 exhibe una gran reducción de su actividad en pH 7 Explica brevemente ¿por qué?
2. ¿Qué parámetros fundamentales influyen en la constante de velocidad de una reacción enzimática? ¿Qué parámetros influyen en la velocidad de una reacción enzimática?
3. En las reacciones químicas orgánicas e inorgánicas la temperatura es incrementada más rápidamente. Esta misma dirección es observada cuando una reacción de la enzima catalizada es llevada a cabo a 15, 25 y 40° C. Sin embargo a 45 y 50 ° C la velocidad de reacción disminuye fuertemente. Explica ¿Por qué sucede esto?
4. Indica si los siguientes enunciados son Falsos o Verdaderos, si el enunciado es falso, corrígelo.
 - a) El valor de la $V_{máx}$ es una característica fundamental para cada enzima.
 - b) Enzimas las cuales se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten no están directamente involucradas en cualquier regulación de realimentación.
 - c) El HCl puede actuar como un ácido general de la catálisis.

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Lípidos

LÍPIDOS

Los lípidos se definen como compuestos insolubles en agua extraídos de los organismos vivos por solventes no polares o débilmente polares. Esta definición se basa en una propiedad física.

Se consideró que el papel de los lípidos como formas de almacenamiento de energía y como componentes estructurales de las membranas carecía de interés debido a que no tenían diversos papeles metabólicos de otras biomoléculas. Actualmente con ayuda de nuevas técnicas tales como la cromatografía en capa fina y la cromatografía gas- líquido, la investigación sobre los lípidos ha alcanzado un papel clave en la investigación bioquímica.

Los lípidos se pueden clasificar en saponificables (lo que significa que son hidrolizables mediante calor y un álcali rindiendo sales y ácidos grasos entre otros componentes moleculares) e insaponificables. La primera clase incluye grasas neutras de animales, plantas y varios tipos de lípidos presentes en las membranas de los sistemas biológicos. La segunda incluye terpenos, esteroides y vitaminas liposolubles.

El término lípido (del griego lipos) abarca a un grupo de compuestos con una estructura muy diversa, por lo que no existe un

esquema aceptado universalmente para clasificarlos.

Se han clasificado de diferentes maneras, siendo la más satisfactoria la que se basa en la estructura de sus esqueletos.

Tabla 1.1 clasificación de los lípidos.

Complejos (saponificables): ésteres de ácidos grasos que contienen otro grupo químico además de un alcohol y un ácido graso.

Fosfolípidos (contienen nitrógeno y fosfato)

Lecitinas (fosfatidil colina)

Cefalinas (fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina)

Fosfatidil inosítidos

Plasmalógenos

Esfingomielinas

Glucolípidos (contienen nitrógeno, pero no fosfato)

Cerebrósidos

Gangliosidos

Sulfolípidos

Lipoproteínas

Simples (insaponificables): ésteres de ácidos grasos con diversos alcoholes.

Triacilglicéridos o grasas neutras.+ Ésteres de ácidos grasos con glicerol).

Ceras: esteres de ácidos grasos con alcoholes distintos al glicerol + alcoholes alifáticos, colesterol, etc.)

Lípidos derivados: obtenidos por hidrólisis de los grupos anteriores.

Ácidos grasos

Glicerol, etc.

Sustancias asociadas a los lípidos:

Serie de terpeno: carotenos, vitamina A.

Serie de las naftoquinonas: vitamina K y tocoferoles (vitamina E).

Serie esteroide: esteroides, ácidos biliares, hormonas corticales y sexuales, etc.

Propiedades de los lípidos.

Algunas de las propiedades generales, físicas y químicas, de los lípidos se derivan de las características de los ácidos grasos que forman parte de ellos.

Propiedades físicas:

Solubilidad: en general, en las células hay un promedio de 70% de agua. Los lípidos son insolubles en agua, solubles en disolventes no polares.

Punto de fusión: el punto de fusión de los ácidos grasos y de los lípidos que contienen, aumentan con la longitud de la cadena y disminuye con las insaturaciones.

Peso específico: todos los lípidos tienen menor densidad que el agua.

Calor de combustión: los lípidos en especial los grandes ácidos grasos, son moléculas altamente reducidas pues casi no contienen oxígeno. Por ello, tienen el más alto calor de combustión de todas las biomoléculas, 9 Kcal por gramo.

Propiedades químicas:

Hidrólisis: puede hacerse en medio alcalino, ácido o por acción de enzimas.

Saponificación: se da por la hidrólisis en medio alcalino, el hidrógeno carboxílico del ácido es desplazado por un metal más activo (sodio).

Propiedades de las dobles ligaduras en los ácidos grasos: los puntos de insaturación en las moléculas son sitios más activos que las regiones con estructuras saturadas.

Halogenación: se emplea para cuantificar la proporción de ácidos grasos poliinsaturados en una muestra de lípidos y se expresa por el número de yodo, es decir, los gramos de yodo que se pueden unir a 100 g de grasa.

Oxidación: se lleva a cabo con el oxígeno del aire a la temperatura ambiente; da como resultado la formación de derivados oxigenados de los ácidos grasos en el sitio de insaturación.

Hidrogenación: es la introducción del hidrógeno en las dobles ligaduras.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 14
IDENTIFICACIÓN GENERAL DE LOS LÍPIDOS.

Evaluación	Realización de la práctica Vitacura Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Determinar la presencia de lípidos mediante reacciones de identificación específicas y diferenciar las clases de lípidos mediante diversos análisis físicos y químicos.

Fundamento:

Para diferenciar la gran cantidad de lípidos que se pueden encontrar en alimentos y productos biológicos, es necesario efectuar diversos análisis físicos y químicos. En esta práctica se efectuarán algunos representativos, como son:

1. El índice de refracción, determinación sencilla y rápida que en trabajos de rutina pueden identificar un compuesto o detectar adulteraciones, por comparación con el índice de refracción del aceite o ácido graso patrón, puro.
2. El índice de acidez, que se define como la cantidad de mg de KOH necesarios para neutralizar la acidez libre de 1 g de muestra. Si se conoce la fórmula del ácido graso se puede calcular fácilmente el índice de acidez teórico correspondiente al ácido graso puro. Cuando se emplea NaOH en lugar de KOH para efectuar la titulación

debe convertirse el resultado a su equivalente en KOH.

Trabajando con NaOH de normalidad N, la fórmula para calcular el índice de acidez será:

$$I.a. = \frac{40N.V. 56}{M.40 \quad M} = \frac{56NV}{M}$$

40: Es el peso molecular de NaOH.

56: Es el peso molecular de KOH.

56/40: Es el factor que permite convertir el peso de NaOH a peso de KOH.

V: Es el volumen en ml de NaOH de normalidad N requerido en la titulación (restando el volumen que se gaste en el blanco).

M: Es el peso de la muestra en gramos.

El índice de yodo sirve para determinar el grado de insaturación de un ácido graso o aceite, debido a que el yodo es absorbido únicamente en los dobles. En este caso se determinará únicamente en forma cualitativa, para saber si el compuesto tiene dobles enlaces. El índice de yodo se define como la cantidad de yodo, expresada en gramos, que absorben 100 g de muestra.

3. La formación de los complejos de ácidos grasos con urea permite la obtención de compuestos cristalinos fácilmente aislables,

cuyo punto de fusión y forma de cristalización ayudan a la identificación del ácido graso.

4. Para la identificación del colesterol y otros esteroides, se han descrito varias reacciones sencillas como la de Salkowski y la de Lieberman-Burchard. El fundamento de estas reacciones es la formación de derivados coloreados de los esteroides, cuando se tratan con ácidos. El color y su intensidad varían según el esteroide, el tipo de ácido y la concentración de éste.

Material y procedimiento experimental:

Material de laboratorio:

2 Vasos de precipitados de 250 mL

1 Probeta de 100 mL

1 Bureta

5 Tubos de ensayo de 13 x 100

1 Pipetas graduadas de 10 mL

2 Pipetas graduadas de 5 mL

Soporte universal.

Pinzas para bureta

Mechero

Parrilla

Baño maría

Gradilla

Material biológico:

- Aceites de oliva y de maíz (20 mL)

Equipo:

- Refractómetro de Abbe
- Microscopio

Reactivos:

- Ácidos oleico, esteárico y palmítico (25 g cada uno)
- Colesterol 1 g
- Solución de lugol
- Anhídrido acético, 10 ml
- Ácido sulfúrico concentrado, 10 mL
- Solución de almidón
- Disolución de urea en metanol
- Etanol neutralizado
- NaOH 0.1N
- Disolución saturada de fenolftaleína al 1% en etanol al 75%, 20 mL

Procedimiento:

a) Índice de Refracción.

1. Determine el I.R. de un aceite vegetal, en el refractómetro de Abbe, y anotar los resultados obtenidos.

b) Índice de Acidez.

1. Pesar exactamente una muestra entre 10 y 15 g de aceite de maíz, sobre un vaso de precipitados o un matraz previamente tarado.

2. Agregar 50 mL de etanol neutralizado.

3. Introducir el matraz en un baño de agua mantenido a 60° C sin dejar de calentar, agregando 10 gotas de disolución de fenolftaleína y poniendo en la bureta NaOH 0.1 N el cual se agrega hasta obtener color rosa resistente.

c) Formación de Complejos de Ácidos Grasos con Urea.

1. Disolver 1 g de un ácido graso en 5 mL de disolución de urea en metanol. (Si el ácido graso es sólido, disuélvalo en metanol, calentando suavemente).

2. Agitar intensamente y luego deje enfriar hasta cero grados en baño de hielo o en refrigerador. Filtrar, secar los cristales y obsérvelos al microscopio.

3. Determina su punto de fusión y dibuje los cristales.

d) Absorción de Yodo por Ácidos Grasos Insaturados.

1. Ponga en un tubo de ensayo 2 mL de aceite de oliva o de ácido oleico.

2. Agregar 5 gotas de lugol y agitar. Esta mezcla debe ser rojiza, como la disolución de yodo.

3. Calienta a la flama y observar que el color va cambiando cuando el color

inicial ha desaparecido totalmente, deje enfriar y agregue 10 gotas de disolución de almidón. Se observará que no hay formación del color azul lo cual indica que no hay yodo libre en la mezcla. Si se agregó lugol en exceso aparecerá el color azul, por haber sido incompleta la absorción agitar. La capa superior y la inferior tomaran colores distintos.

e) Identificación de Colesterol.

I. Reacción de Salkowski.

1. En un tubo de ensayo perfectamente seco, ponga 100 mg aproximadamente de colesterol.
2. Agregar 3 mL de cloroformo para disolverlo

3. Repartir esta disolución en 2 tubos para efectuar, con la mitad, la reacción siguiente: A uno de los tubos agregar 1mL de H_2SO_4 concentrado deslizándolo por las paredes.
4. Observar el tubo de lado, contra un fondo semi-oscuro, para apreciar la fluorescencia.
5. Anotar lo observado.

II. Reacción de Liebermann.

1. Agregar 5 gotas de anhídrido acético y dos gotas de H_2SO_4 concentrado, a la otra porción de disolución de colesterol en cloroformo.
2. Mezclar suavemente y anotar el color que adquiere inicialmente y los cambios que se van observando en el mismo.

HOJA DE RESULTADOS

1. Índice de refracción _____ Aceite empleado _____
2. Volumen de NaOH gastado _____ Normal
3. Peso de la muestra _____ Cálculos efectuados
4. Aplicando la fórmula indicada en la introducción, calcule el índice de acidez.
5. Forma de los cristales.
6. Punto de fusión _____
7. Reacción de Salkowski
8. Reacción de Liebermann _____

Discusión:

Conclusiones:

Cuestionario:

1. Sugiere una lista de características generales y sobresalientes de los ácidos grasos encontrados en los organismos.
2. ¿Qué información práctica se obtiene de la determinación del índice de yodo?
3. ¿Podría el índice de acidez incrementarse si el aceite de maíz estuviera viejo? Explica ampliamente.
4. ¿De los datos obtenidos en la práctica podrías tu predecir si el aceite de maíz que utilizaste era viejo o fresco?
5. ¿Por qué los detergentes son superiores a los jabones?
6. La propaganda comercial hace creer que el colesterol es malo para la salud
 - a) Explica por qué esto es totalmente cierto.
 - b) Explica por qué esta aseveración no es totalmente correcta
 1. Explica la naturaleza hidrofóbica de los lípidos.
¿Cuál es la diferencia entre los lípidos saponificables y los no saponificables?
¿Qué es el índice de acidez?
¿Qué es el índice de refracción?
¿Para qué sirve el índice de saponificación?

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga:
<http://www.>

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 15
EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL COLESTEROL

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Extraer colesterol a partir de la yema de huevo y hacer su identificación por el método de Liebermann- Burchard.

Fundamento:

Una característica fundamental de los lípidos es su solubilidad, estos son solubles en compuestos apolares e insolubles en compuestos polares, por lo que pueden extraerse de los materiales que los contienen mediante disolventes orgánicos más o menos apolares.

Para identificar el colesterol en esta práctica utilizaremos un método colorimétrico: el más popular es el de Liebermann-Burchard, en el que la reacción tiene lugar en

un medio ácido fuerte (ácido sulfúrico). La etapa inicial del proceso consiste en la protonación del grupo hidroxilo del colesterol, seguido de su deshidratación para formar un ión carbonilo 3,5- colestadieno. La oxidación secuencial de este ión carbonilo alílico por el sulfúrico produce un compuesto cromóforo, el colestahexano- ácido sulfónico, que absorbe energía en la zona de la luz visible, a 410nm.

Material y reactivos:

Material de laboratorio:

Varilla de vidrio

Embudo de filtración

Vasos de precipitado de 250 mL

Parrilla

Cápsula de porcelana

Pinzas para cápsula
Matraz de 250 mL
Embudo Buchner
Tubos de ensaye
mascarrilla
googles

Reactivos:

Etanol
Éter
Solución etanol- éter 2:1
Acetona
Alcohol etílico
Solución alcohólica de KOH al 10%
Ergosterol 0.02% en cloroformo
Anhídrido acético
Ácido sulfúrico concentrado

Material biológico:

Huevo

Procedimiento:

1. Separar la yema de la clara, una vez separada, agitar con 30 mL de etanol y 15 mL de éter. Reposar 10 minutos y agitar a intervalos.
2. Filtrar la mezcla a través de un papel filtro humedecido en etanol, recibir el filtrado en un vaso seco. Lavar el residuo del papel filtro con una nueva porción de etanol, éter (2:1)
3. Evaporar el filtrado a sequedad en cápsula de evaporación sobre parrilla. Disolver el residuo en 10 mL de éter.
4. Vaciar lentamente la solución de éter a 30 mL de acetona agitando. El precipitado presente es lecitina que forma generalmente un conglomerado esférico. Filtrar para separar la lecitina. Guardar el filtrado en un matraz de 250 mL para aislar el colesterol.
5. Evaporar el filtrado sobre una parrilla en una cápsula hasta formar una pasta. Enfriar.
6. Agregar 5 mL de solución alcohólica de KOH al 10% a la pasta. Agitar bien y calentar la solución en un matraz durante 6 minutos sobre la parrilla (se pueden agregar algunos mL de alcohol para mantener el volumen).
7. Después del calentamiento en KOH (saponificación) enfriar el matraz y agregar 40 mL de éter para extraer el colesterol.
8. Evaporar la solución de colesterol a sequedad en cápsula de evaporación grande sobre parrilla. Separar cualquier líquido que quede.
9. Extraer el colesterol calentando el residuo con 5 mL de etanol (en parrilla). Transferir la solución a un tubo seco. Volver a extraer el residuo con otros 3 mL de etanol y combinar los extractos alcohólicos. Centrifugar durante 3 a 4 minutos.
10. Decantar la solución alcohólica que contiene el colesterol a otro tubo seco

y agregar agua gota a gota hasta que ya no se forme más precipitado. Dejar reposar el tubo 10 minutos y centrifugar.

Guardar el precipitado y descartar el líquido.

11. Secar el colesterol inclinado el tubo sobre un lado y pasar una ligera corriente de aire en el interior del tubo.
12. Efectuar la prueba de Liebermann-Burchard al colesterol seco.

patrón) al 0.02% en cloroformo y añadir 15 gotas de anhídrido acético a cada tubo.

2. Mezclar y dejar enfriar.
3. Añadir 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
4. Mezclar y observar los cambios de color.

Prueba de Liebermann- Burchard.

1. Poner en tubos de ensaye secos 2 mL de soluciones diluidas de colesterol (problema) y ergosterol (solución

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

¿Cómo se observó el colesterol extraído de la yema de huevo?

La reacción de Liebermann- Burchard fue: Positiva_____ Negativa_____

Esquematizar los resultados.

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. ¿Qué son los lípidos?
2. ¿Cómo se clasifican los lípidos?
3. ¿Qué funciones biológicas tienen los lípidos en nuestro organismo?

Referencias Bibliográficas:

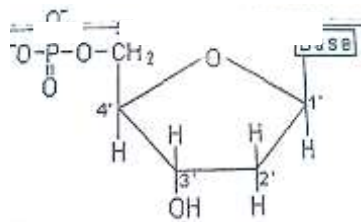
Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Ácidos nucleicos

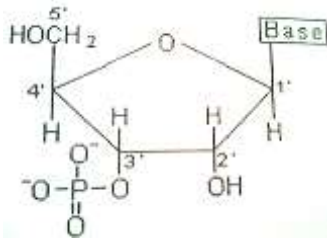
ÁCIDOS NUCLÉICOS

La información genética es almacenada y transmitida por los ácidos nucleicos DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA (ácido ribonucleico). El DNA y RNA son polímeros lineales de nucleótidos, los nucleótidos son las unidades manoméricas de los ácidos nucleicos. Los ribonucleótidos y los desoxirribonucleicos constan cada uno de tres componentes: una base aromática, un azúcar pentosa y de uno a tres grupos fosfatos. La figura 7.1 muestra la estructura química de un desoxirribonucleótido y ribonucleótido.



Desoxirribonucleosido-5'-P
ó

5'-desoxirribonucleótido



Ribonucleosido-3'-P
ó

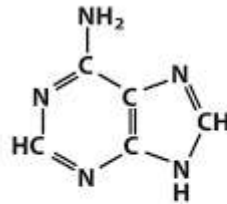
3'-ribonucleótido

Figura 4.1

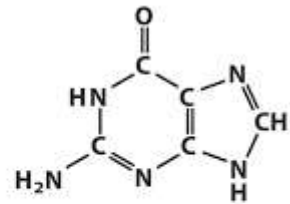
Los ribonucleótidos contienen el azúcar ribosa y una base por lo general adenina, guanina, citosina o uracilo. Los desoxirribonucleótidos contienen el azúcar 2'-desoxirribosa y una base, por lo general adenina, guanina,

citosina o timina. La fig. 4.2 muestra las estructuras químicas de las bases purínicas y pirimidínicas.

Purinas

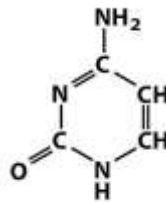


Adenina

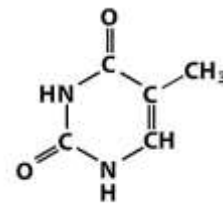


Guanina

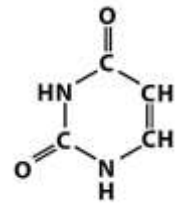
Pirimidinas



Citosina



Timina



Uracilo

Figura 4.2

Si el azúcar no está fosforilado, la estructura se denomina nucleosido. Un Nucleosido consta de una base púrica o piridínica unida a una pentosa. Los grupos fosforilos pueden estar unidos a cualquier grupo hidroxilo en el residuo de azúcar de un nucleosido para formar el correspondiente nucleótido el cual se denomina como un éster fosforilo de un nucleosido.

Los nombres de las bases principales del RNA y del DNA y sus derivados nucleosidos y nucleótidos, aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 2.1 Nomenclatura de bases, nucleosidos y nucleótidos. 25

Base	Ribonucleosido	Ribonucleótido (5'-monofosfato)
Adenina (A)	Adenosina	Adenilato (AMP)
Guanina (G)	Guanosina	Guanilato (GMP)
Uracilo (U)	Uridina	Uridilato (UMP)
Citosina (C)	Citidina	Citidilato (CMP)
Base	Desoxiribonucleosido	Desoxirribonucleótido (5'-monofosfato)
Adenina (A)	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato (dAMP)
Guanina (G)	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato (dGMP)
Uracilo (U)	Desoxiuridina	Desoxiuridilato (dUMP)
Citosina (C)	Desoxicitidina	Desoxicitidilado (dCMP)

Los mononucleótidos en el DNA y RNA están unidos entre sí por enlaces 3'-5'-fosfodiesteres. Los polinucleótidos, al igual que los polipéptidos, tienen polaridad.

El azúcar en un extremo de la cadena tiene un grupo 3'-hidroxilo o fosforilo (3'-terminal) y en el otro extremo tiene un grupo 5'-hidroxilo o fosforilo (5'-terminal).

En 1953 Watson y Francis Crick dedujeron la estructura del DNA de su patrón de difracción de rayos X, la molécula de DNA es una hélice de doble banda con dirección hacia la derecha. Las bases de las dos bandas forman pares unidos por puentes de

hidrógeno (interior), estando los azúcares fosfato en el exterior.

Solo dos pares de bases pueden ser acomodadas en la estructura helicoidal doble (dúplex), las dos bandas son complementarias.

Las moléculas de RNA son por lo general de una sola banda. Exhiben estructuras helicoidales parciales e irregulares con enlaces de hidrógeno intercambiables entre las secuencias ocasionalmente complementarias y antiparalelas.

El DNA de doble banda es el transportador de la información genética en todos los sistemas vivos, excepto en virus

que contienen genomas de RNA y algunos que contienen DNA, la cual es pequeña, circular y de una sola banda.

La información genética en el DNA se transcribe en tres clases de RNA. Las moléculas de RNA mensajero (RNAm) son las copias de las secuencias de nucleótidos de DNA que dirigen la síntesis de proteínas. Varían en la longitud de la cadena desde unos pocos cientos a unos varios miles de nucleótidos.

El RNA ribosomal (RNAr) es un componente estructural de los ribosomas. Existen tres clases de RNAr de tamaño discreto, por lo general designados por sus coeficientes de sedimentación como 5s, 16s y 23s en células procariontes y 5s, 18s y 28s en eucariotas (s= Svedberg).

Las moléculas de RNA de transferencia (RNAt) son los transportadores de los monómeros de aminoácidos, activados para la síntesis de proteínas.

Varios RNAt han sido secuenciados, todos ellos parecen tener la característica de la estructura secundaria en hoja de trébol. Todas las moléculas de RNAt finalizan en el terminal 5' con pG y tienen la secuencia terminal 3' pCpCpA. Las moléculas de RNAt contienen algunos nucleótidos raros.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 16
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL ADN

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	De acuerdo con el reglamento interno de la facultad en el anexo 1. En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Que el alumno aíse el DNA cromosómico a partir de un fruto.

Fundamento:

El NaOH 0.2 N- SDS es un detergente alcalino que nos ayuda a disolver las membranas celulares y a desnaturalizar algunas proteínas que podrían interferir en la extracción del ADN. Una vez que las membranas han sido disueltas el material genético se encuentra libre en la solución; para lograr su precipitación se le adiciona etanol el cual produce el precipitado de las cadenas de ADN porque excluye las moléculas hidrófilas.

Para verificar que verdaderamente estos filamentos obtenidos son de ADN, primero se rompe la cadena utilizando NaOH, una vez separada la cadena se hace reaccionar con di fenilamina, colocamos en baño maría y si después de unos minutos se observa un color azul, sabemos que lo obtenido sí es ADN.²⁹

Material y reactivos:

Material de laboratorio:

Tubos de ensaye
Gradilla
Pipetas de 1 y 5 mL
Varilla de vidrio
Baño maría
Mortero de porcelana con pistilo

papel filtro

Reactivos

Buffer de extracción: 2 cucharadas de jabón lavavajillas líquido y una de sal en 250 ml de agua

Etanol absoluto frío

Reactivo de Difenilamina

Solución de NaOH al 0.4%

Material biológico

Kiwi o fresas

Procedimiento:

1. Retire la cáscara del fruto, retirar las semillas y tomar 2g de tejido blando. Homogeneizar y agregar 2ml de buffer de extracción. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. Filtrar el sobrenadante.
2. Adicionar un volumen igual de zumo de piña y mezclar bien.
3. Añadir un volumen de etanol muy frío equivalente al del filtrado, cuidadosamente, haciéndolo resbalar por las paredes del vaso para que forme una capa sobre el filtrado.

4. Dejar reposar 2 o 3 minutos. Observar cómo se precipitan los filamentos del ADN (zona turbia entre las dos capas).
5. Colectar el ADN con una varilla de vidrio (girándola suavemente) y llevar el ADN a un tubo pequeño que contenga 0.2 mL de agua.
6. En caso de no poder recoger el ADN con la varilla como se indica, proceder a centrifugar 5 minutos a 3000 rpm. Descartar el sobrenadante y al sedimento agregarle 0.2 mL de agua.

Identificación:

1. Traslapa a un tubo una pequeña porción del precipitado de ADN y disuélvala en 1mL de hidróxido de sodio.
2. Añada un volumen igual de reactivo de difenilamina (hasta disolver el precipitado).
3. Ponga el tubo en baño maría a ebullición de 15 a 20 minutos y observe la coloración azul.

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

1. Anota que aspecto tenía el ADN en el tubo de ensaye cuando agregaste etanol frío.
2. En el aislamiento; menciona si hubo algún cambio de color.

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. Menciona como está organizada la cromatina en células eucariotas
2. Dónde se encuentra el ADN en una bacteria y cuantas barreras hay que romper para liberarlo
3. ¿Cómo actúa un detergente?
4. ¿Para qué se usó el zumo de piña?

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Vitaminas

VITAMINAS

Las vitaminas son necesarias en el desarrollo normal de los procesos vitales, por lo que los alimentos las deben aportar en cantidades suficientes.

Se diferencian de las enzimas en su estructura química, puesto que no son de naturaleza proteica. Son en general, moléculas pequeñas de estructura muy variada. Sin embargo, juegan un papel de coenzima, es decir, que asociadas a un apoenzima de naturaleza proteica, desarrollan una actividad biocatalítica.

En general las vitaminas se clasifican en dos grandes categorías:

Vitaminas hidrosolubles (vitaminas del grupo B, vitamina C) que se encuentran en la fase acuosa.

Vitaminas liposolubles (vitamina A, D, E) que están asociadas a la materia grasa.

Algunas vitaminas importantes son:

Vitamina A: Se les llama todavía retinoides, la carencia de esta vitamina entraña problemas visuales. Es insoluble

en agua y soluble en alcohol, éter, acetona, aceite y grasas.

Vitamina E: Son tocoferoles y se encuentran en el insaponificable, no esteróico de los aceites vegetales, es estable al calor pero sensible a la luz, tiene propiedades antioxidantes.

Vitamina B₁: Se le llama también tiamina, se disuelve fácilmente en agua y difícilmente en alcohol, es prácticamente insoluble en éter, hexano, acetona y benceno.

Vitamina C: Se le llama también ácido ascórbico, se disuelve fácilmente en agua, es poco soluble en alcohol e insoluble en éter, en ausencia de humedad es bastante estable al aire, pero las soluciones acuosas se oxidan fácilmente. Es sensible a la luz sobre todo en presencia de vitamina B₂.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
ÁREA ACADÉMICA TÉCNICA
FACULTA. DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRÁCTICA No. 17

DETERMINACION DE CAROTENOS y DETERMINACION DE VITAMINA C EN ALIMENTOS.

Evaluación	Realización de la práctica Bitácora Reporte
Duración de la práctica	3 horas
Medidas de seguridad	El alumno debe portar su equipo y material de seguridad y atender al reglamento del laboratorio.
Disposición de los residuos	En caso de tener duda preguntar al profesor responsable de la experiencia educativa.

Objetivo:

Realizar una extracción de carotenos y posteriormente realizar la identificación por espectrofotometría. Se realizará una extracción del ácido ascórbico con ácido metafosfórico y se realizará una valoración visual oxidométrica del ácido ascórbico con una solución de 2,6-Diclorofenol-Indofenol.

Fundamento:

Las vitaminas liposolubles, como la vitamina A, solo se pueden extraer con disolventes apolares, es por esto que se utiliza éter de petróleo. En la primera maceración se utiliza acetona para extraer los carotenos junto con otros compuestos que se disuelven en acetona. Después de esto separamos los

carotenos que se encuentran en el extracto acetónico utilizando el éter de petróleo disolvente apolar.³⁴

La identificación se realiza por espectrofotometría, realizando lecturas del extracto a 450nm, longitud de onda en la que los carotenos absorben la luz.³⁰

Material y reactivos:

Material de laboratorio:

Mortero
Pipetas de 10 mL y 5mL.
Vaso de precipitado de 250 mL.
Embudo de filtración rápida.
Embudo de separación.
Matraz aforado de 50 mL.

Reactivos:

Acetona

Éter de petróleo

Solución de Ácido metafosfórico al 2%

Solución de Ácido metafosfórico al 10%

Ácido acético al 10%

Solución estándar de ácido ascórbico 0.5 mg/mL

Solución de 2,6-Dicloro indofenol (D. I.) al 0.05%

Material biológico:

1 Zanahoria

1 Naranja

1 Limón

1 Papa

1 Tomate

Procedimiento:

1. Pesar 1 g de muestra y macerarlo con 10 mL de acetona, decantar a matraz con tapa; se repite esta operación hasta que la muestra quede incolora.
2. Los extractos acetónicos de cada maceración se reunirán en un vaso de precipitado.
3. Filtrar el extracto y pasarlo a un embudo de separación y agregar 5 mL de éter de petróleo por cada 10 mL de extracto y mezclar a inversión.

4. Después se le agregan 15 mL de agua destilada por cada 10mL de extracto, se agita, se deja reposar 5 minutos (se observa la separación de las capas).
5. La capa superior que contiene los carotenos se extrae nuevamente con 5 mL de éter de petróleo y 15 mL de agua.
6. Los extractos etéreos se lavan 3 veces con 10 mL de agua destilada, se aforan a 50 mL con éter de petróleo.
7. Se realiza la lectura a 450nm utilizando como blanco éter de petróleo.

Cálculos

Carotenos (µg/100g)

$$= \frac{L \times 3.857 \times A \times 100}{Q}$$

en donde L es el volumen total del extracto 3.857 el coeficiente de extinción molar de los carotenos, A la Absorbancia, y Q el peso de la muestra en gramos.

Determinación de vitamina C:

1. Homogeneizar de 1 a 2 g de muestra con 20 mL del ácido metafosfórico.
2. Pasar la mezcla a un matraz aforado de 100 mL y aforar con agua destilada.
3. Valorar con solución de 2,6-Diclorofenol indofenol, hasta que se obtenga una coloración rosa que persista durante 15 segundos

HOJA DE RESULTADOS

Nombre:

Grupo:

Fecha:

1. Calcular la concentración de carotenos en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ presentes en la muestra.
2. Comparar los resultados con datos bibliográficos.

Discusión:

Conclusión:

Cuestionario:

1. ¿En qué otros vegetales podemos encontrar los carotenos?
2. ¿Qué provoca la deficiencia de vitamina A?
3. ¿Cuál es el metabolismo que sigue la vitamina A en nuestro organismo?
4. ¿Qué ocurriría en caso de sobrepasar los límites de vitamina A requeridos en el cuerpo?

Cálculos:

$$\text{mg de ácido ascórbico}/100\text{mg} = \frac{a \times T \times U \times 100}{v \times m}$$

En donde:

a = mL de reactivo empleado en la titulación.

T = Título del reactivo.

U = mL de solución de la toma de ensayo (100 mL)

v = mL del filtrado empleados (10 mL)

m = Gramos de muestra.

Referencias Bibliográficas:

Libro: apellidos autor; Nombre. (Año). Título. Editorial. Edición. País. Página consultada.

Página de internet: Autor o responsable. Título. Fecha de última actualización. Liga: <http://www>.

Anexos

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación de soluciones molares y normales:

La molaridad (M) es el número de moles de soluto por litro de disolución. La fórmula para preparar soluciones molares es:

$$M = \frac{g/PM}{L}$$

La normalidad (N) es el número de equivalentes gramo de soluto por litro de disolución. La fórmula para preparar soluciones normales es:

$$N = \frac{Eq}{L}$$

Un equivalente de una sustancia se puede expresar de la siguiente forma:

$$\text{Equivalente} = \frac{(\text{moles de la sustancia})}{n}$$

n es el número de H^+ o OH^- que puede ceder.

Soluciones porcentuales:

Porcentaje en peso: son los gramos de soluto disueltos en 100 g de solutos

$$\% \text{ en peso} = \frac{g \text{ de soluto}}{g \text{ de solución}} \times 100$$

Porcentaje en volumen: se define como los mililitros de soluto disueltos en 100 mL de solución.

$$\% \text{ en volumen} = \frac{\text{mL de soluto}}{\text{mL de solución}} \times 100$$

CONTROL DE CALIDAD:

Determinación de volumen mínimo de lectura y observación del “efecto menisco”.

En las determinaciones fotométricas es de vital importancia que el volumen que se deposita en la celda de lectura sea el adecuado para asegurar que el rayo de luz atraviese completamente la solución.

El manejo de volúmenes inferiores al volumen mínimo requerido ocasiona lecturas erróneas y como consecuencia resultados incorrectos. Cuando se coloca una cantidad insuficiente de solución en la celda, el rayo de luz atraviesa por el menisco de la misma y por efecto de difracción se obtienen lecturas elevadas.

Es por esto que al realizar las lecturas deben observar que el volumen que se coloque en la celda sea el adecuado para que el espectrofotómetro pueda leer correctamente.

Verificación de espectrofotómetro.

La confiabilidad de las determinaciones analíticas en el laboratorio depende entre los otros aspectos, tanto del uso adecuado como del buen funcionamiento de los equipos fotométricos.

La adecuada calibración instrumental es uno de los factores claves para lograr exactitud en los resultados analíticos.

Tres características que permiten verificar el correcto funcionamiento de los espectrofotómetros son: la calibración, la sensibilidad y la linealidad. Las dos primeras las podemos verificar mediante la determinación del espectro de absorbancia de una solución de cloruro de cobalto que tiene una absorbancia máxima de 0.5 a 510 nm; y la última la podemos verificar a través de la medición de la absorbancia de soluciones de dicromato de potasio a diferentes concentraciones conocidas cada una.

Si el instrumento da una absorbancia menor a la esperada, con la solución de cloruro de cobalto, se puede decir que el aparato no tiene la sensibilidad adecuada.

Si la longitud de onda a la que se obtiene la absorbancia máxima de la misma solución de cloruro de cobalto es diferente a la indicada, podemos decir que el instrumento está descalibrado.

Si el instrumento no se incrementa la absorbancia en la misma magnitud en que se aumenta la concentración, podemos decir que el instrumento no tiene linealidad y no cumple con la ley de Beer.

Verificación del uso y funcionamiento adecuado de micropipetas.

Una de las fuentes de variación que más afectan la confiabilidad de los resultados analíticos y que se presenta con mayor frecuencia es el inadecuado uso y funcionamiento de las micropipetas.

Las micropipetas pueden ser verificadas por el método gravimétrico o el fotométrico; para el primero es indispensable contar con una balanza analítica y para el segundo con micropipetas previamente calibradas.

El método fotométrico es sencillo y confiable, además permite evaluar simultáneamente el uso correcto, la precisión y la exactitud de las micropipetas.

Para la verificación de precisión se utilizan 20 tubos a los cuales se le adiciona el dicromato de potasio con la pipeta que se desea analizar en una proporción de 10 μ de dicromato por cada mL de agua, se realizan las lecturas de cada tubo a 500 nm y se calcula el coeficiente de variación (CV) con la fórmula siguiente:

$$CV = \frac{S \times 100}{X}$$

Dónde: S es la desviación estándar y X es la media.

Si la CV es menor o igual al 2% la micropipeta funciona correctamente. Si es mayor del 2% puede deberse a un mal manejo o al incorrecto funcionamiento de la misma, o ambos.

Para verificar con exactitud se utiliza un estándar relativo que está compuesto de 5 mL de solución de dicromato de potasio al 8% mas 500 mL de agua destilada, se lee absorbancia del estándar relativo simultáneamente con los tubos con los que se determinó la imprecisión.

Calcular el volumen que la pipeta está midiendo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de la pipeta en } \mu\text{L} = \frac{\text{absorbancia promedio} \times \text{VNP}}{\text{absorbancia del estándar relativo}}$$

Dónde: VNP es el valor mínimo de la micropipeta.

El porcentaje de error se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de error: } \frac{(\text{Vobs} - \text{Vesp}) \times 100}{\text{Vesp}}$$

Dónde: Vosb es el volumen de la micropipeta, determinado con la primera fórmula y Vesp es el valor nominal de la micropipeta.

El porcentaje de error de la micropipeta debe ser menor al 2%. En caso de ser mayor la micropipeta debe calibrarse de acuerdo con el instructivo del fabricante.

Estudio del efecto de acarreo.

Uno de los factores que contribuyen frecuentemente a que se tengan coeficientes de variación (CV) elevados, es la interferencia de una medición con otra, es decir el reactivo

o la muestra de la prueba realizada previamente no han sido bien eliminada e interfiere con la siguiente determinación.

El efecto de acarreo puede manifestarse también en equipos semiatomizados o manuales, sino se tiene el cuidado requerido.

Mediante un procedimiento muy sencillo donde empleamos soluciones coloridas de dos diferentes concentraciones se podrá determinar si un sistema analítico o equipo presenta o no el efecto de acarreo.

2. REGLAMENTO INTERNO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA. LEGISLACIÓN UNIVERSITARIA. H. CONSEJO UNIVERSITARIO GENERAL, 2018.

Capítulo II

De los laboratorios

Artículo 115. Los laboratorios son los espacios en donde se realizan prácticas para desarrollar habilidades técnico-científicas que integren los conocimientos teóricos adquiridos en el aula. El uso de las instalaciones y de los servicios prestados por los laboratorios está reservado exclusivamente para los usuarios.

Artículo 116. Son usuarios de los laboratorios, de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica los siguientes:

- I. El personal académico;
- II. Los alumnos con inscripción vigente, de licenciatura o posgrado;
- III. El personal académico y alumnos de otras instituciones de educación superior con las que se haya acordado un convenio de colaboración; y
- IV. Las personas ajenas a la Facultad que requieran el uso de los laboratorios deberán solicitar autorización por escrito al Director de la Facultad.

Artículo 117. Los usuarios del laboratorio deberán observar lo siguiente:

- I. Utilizar bata blanca abotonada de manga larga;
- II. Utilizar el material de seguridad personal necesario como mascarilla, lentes de seguridad, guantes, cubre bocas, gorra, entre otros;
- III. En caso de que se realicen pruebas o experimentos de larga duración y cuando sea necesario dejar encendido el equipo e instrumentos como estufas u hornos durante largos periodos de tiempo, el usuario deberá comunicarlo al Técnico Académico o personal académico de tiempo completo con carga académica diversificada y asignada al laboratorio y colocar las etiquetas correspondientes a los equipos en uso;
- IV. Hacerse responsable del buen uso y manejo de los instrumentos y equipos del laboratorio y disponiendo para tal fin de los manuales correspondientes;
- V. Notificar al personal del laboratorio cualquier desperfecto observado en los equipos e instrumentos que se le otorgaron;
- VI. Devolver el equipo e instrumentos con todos los accesorios que recibió al solicitarlos;
- VII. Al término de la práctica, deben dejar limpias y libres de desechos las mesas de trabajo;

VIII. Queda estrictamente prohibido arrojar desechos sólidos a coladeras de las mesas de trabajo y áreas destinadas al lavado de material dentro del laboratorio;

IX. Se prohíbe fumar y jugar en los laboratorios;

X. Las actividades como correr e ingerir alimentos o bebidas serán permitidas única y exclusivamente si lo justifica la práctica a realizar;

XI. Para el préstamo de equipo, instrumentos o material, el usuario deberá llenar el vale correspondiente y dejar al responsable del laboratorio, su credencial vigente que lo acredita como miembro de la Facultad o una identificación oficial vigente con fotografía; para el caso de personas ajenas a la Facultad, además de los requisitos anteriores deberá tener el visto bueno del Director de la Facultad;

XII. Reparar o reponer los materiales y equipos de laboratorio concedidos en préstamo que hayan sido dañados o extraviados, de acuerdo con las características que indique el técnico académico o personal de tiempo completo con carga académica diversificada y asignada al laboratorio, quedando retenida la credencial del usuario involucrado hasta que se cubra el adeudo, observando lo siguiente:

a) El adeudo deberá cubrirse a más tardar en la última semana del periodo de clases. En tanto no se cubra este adeudo no se podrá disponer de otros préstamos; y

b) En caso de incumplimiento de la reposición del bien dañado, el adeudo correspondiente se turnará al encargado del almacén general de la Unidad de Ingeniería y Ciencias Químicas, quien informará al Director de la Facultad para la aplicación de la sanción que corresponda en términos de la legislación universitaria.

Artículo 118. El personal académico responsable de la experiencia educativa debe cumplir con lo siguiente:

I. Entregar al técnico académico del laboratorio o personal académico de tiempo completo con carga académica diversificada y asignada al laboratorio el Programa de actividades de las prácticas a realizar; e

II. Informar los reactivos, materiales, equipos e instrumentos que requerirá por sección, promedio de 30 alumnos, a fin de que éstos sean adquiridos o preparados oportunamente; esta información se entregará en un formato establecido que proporcionará el técnico académico o personal académico de tiempo completo con anticipación de por lo menos 5 días hábiles previos al desarrollo de la práctica.

Artículo 119. Además de las obligaciones establecidas en el Estatuto del Personal Académico el técnico académico en turno o personal académico de tiempo completo con carga académica diversificada y asignada al laboratorio, es el responsable del buen funcionamiento del mismo, así como del uso y conservación de los equipos, materiales y espacios físicos que le hayan sido asignados. Sus funciones serán las siguientes:

I. Gestionar ante la Coordinación de Laboratorios, la adquisición de los materiales, consumibles y equipos necesarios para la realización de las prácticas programadas en el semestre inmediato, de acuerdo con los recursos disponibles;

II. Garantizar que el académico cuente con el equipo y material necesario para realizar su práctica y deberá estar pendiente del seguimiento de la misma, fungiendo como apoyo en su realización, sobre todo en lo relacionado al manejo de los equipos. En caso de que el personal de apoyo falte, el Técnico Académico deberá comprometerse a suplir las funciones que éste realice con la finalidad de no atrasar las prácticas programadas;

III. Tener el material y reactivos listos antes de iniciada la sesión y de no contar con los insumos requeridos, deberá notificar al académico en la sesión anterior a fin de que éste pueda, en caso necesario, cambiar la práctica a realizar; y

IV. Organizar y supervisar las actividades diarias que se tienen planeadas, como es la preparación de soluciones, reactivos, equipos e instrumentos a emplear, inóculo, limpieza de las áreas de trabajo, retiro de residuos químicos peligrosos o residuos peligrosos biológico infecciosos, entre otros.

Artículo 120. El personal académico titular de la experiencia educativa es responsable en los laboratorios de lo siguiente:

I. Respetar la hora de entrada y salida, con la finalidad de optimizar los tiempos que se requieren para dar continuidad a las prácticas de otras experiencias educativas;

II. Capacitar adecuadamente a los alumnos para el uso y manejo de reactivos, equipos y materiales de laboratorio que se vayan a requerir, pero también serán apoyados por el técnico académico en cuanto al uso de los mismos;

III. Verificar al menos con 5 días hábiles de anticipación con el técnico académico o personal académico con carga académica diversificada y asignada al laboratorio, que estén disponibles los requerimientos para la realización de la práctica, siempre basados en la "Guía de Prácticas" de la experiencia educativa aprobado por la academia del programa educativo;

IV. Supervisar las prácticas de laboratorio y demás actividades que deban realizar los alumnos;

V. Estar presente en las prácticas de la experiencia educativa o en su ausencia, el Técnico Académico o personal académico de tiempo completo con carga académica diversificada y asignada al laboratorio en caso eventual de que el académico responsable de la práctica deba atender alguna comisión académica avalada por la Dirección de la Facultad, en cuyo caso deberá dejar con antelación las indicaciones necesarias para realizar la sesión experimental;

VI. Notificar en caso de que los alumnos tengan que realizar preparaciones u observaciones para iniciar, continuar o concluir una práctica, en horario diferente al establecido para la experiencia educativa, al técnico académico o personal académico con carga académica diversificada y asignada al laboratorio con al menos dos días de anticipación, y respetando los horarios de trabajo y actividades ya programadas; y

VII. Solicitar con una semana de anticipación por escrito al técnico académico del laboratorio correspondiente o personal académico con carga académica diversificada y asignada al laboratorio, en el formato que para tal efecto éste le proporcione al académico responsable de la experiencia educativa, la aprobación de la realización de prácticas de laboratorio extraclase, esta

solicitud estará supeditada a la disponibilidad de horarios y de recursos humanos y materiales.

Artículo 121. Los usuarios o encargados de los laboratorios que incurran en una falta establecida en este Reglamento se harán acreedores a la sanción correspondiente de acuerdo con lo

que establece la legislación universitaria.

Artículo 122. Para el manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) y químicos, la Facultad cuenta con un programa institucional a cargo de la coordinación de laboratorios y sustentado en las Normas Oficiales Mexicanas NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y de la NOM-052-SEMARNAT-2005.

Artículo 123. El responsable de llevar a cabo el programa para cada tipo de residuos es el técnico académico designado por el Director de la Facultad.

Artículo 124. Para el manejo de los residuos químicos peligrosos se observará lo siguiente:

I. Se depositarán en recipientes identificados por grupos funcionales, solventes, ácidos orgánicos, compuestos halogenados y no halogenados, entre otros, los cuales serán proporcionados por el Técnico Académico, el personal académico de tiempo completo con carga académica diversificada y asignada al laboratorio o el preparador, desde el inicio del semestre; y

II. Los residuos químicos deberán ser tratados por los alumnos y los académicos de la experiencia educativa de acuerdo con la normatividad en materia.

BIBLIOGRAFÍA:

1. AOAC. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 13th edition.1990.
2. Atzin García J y Ramírez Morales R. Manual de Prácticas de Bioquímica. UV. 1997.
3. BergJ.M., Tymoczko J.L., Stryer,L. 6ª. Ed., Ed. W.H. Freeman New York. 2007.
4. Boyer Rodney. 2000. Concepts in Biochemistry. Brooks/Cole Publishing Company. USA.
5. Campbell Mary K. Biochemistry. Third edition. Sauders College Publishing. USA.
6. Casados Vázquez LE. (2004). Manual de Prácticas de Bioquímica. Trabajo Práctico Educativo para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver. 2004.
7. Devlin, T.M. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ª ed. Ed. Reverté, Barcelona; 2004.
8. González Valls, J.M. Una vuelta al mundo de la bioquímica en 800 preguntas. Formación Alcalá. 2009.
9. Horton, R. Bioquímica. 4ª ed. Ed. Pearson Educación, México; 2008
10. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Lehninger principios de bioquímica. Barcelona: Omega.2009.
11. Méndez, JD. Experimentos Básicos de Bioquímica. Editorial Prado. México.2001.
12. Miller, G. L. Use of dinitrosalisyc acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, 1959, 31: 426-428.

13. Murray R.K., Botham K.M., Kennelly P.J., Rodwell VM, Weil PA. Harper, Bioquímica Ilustrada. Mc Grow Hill Lange. 2010.
14. NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
15. NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo. Disponible en:
16. Reglamento Interno de la Facultad de QFB región Xalapa. Legislación Universitaria. Universidad Veracruzana. 2018.
17. Voet,D., Voet J.G. Bioquímica. 3a ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos aires; 2006.
18. Yañez Ávila, R. Manual de Prácticas de Bioquímica. IPN. 1996.