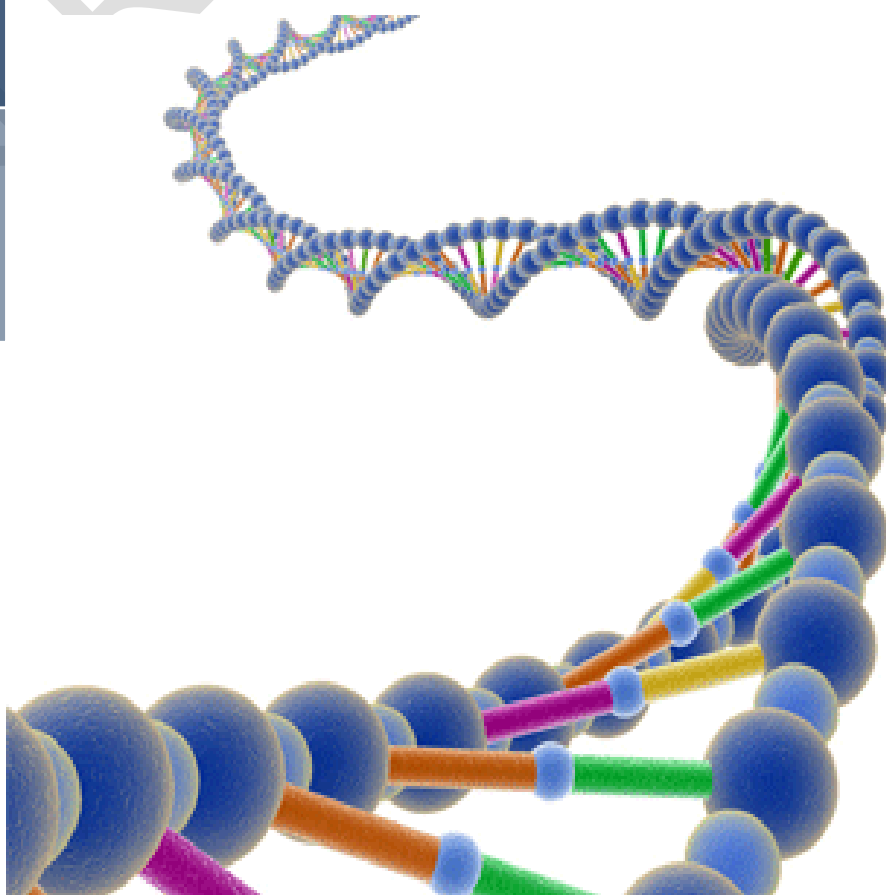





MANUAL PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

**HERMINSUL DE JESÚS CANO CALLE
STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ
JENNIFFER CRUZ LAITÓN**

**ESCUELA DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**



Escuela de Química	Facultad de Ciencias		Universidad Industrial de Santander	MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA	Código: MFOQ-BQ.01 Versión: 00 Página 2 de 91
-----------------------	-------------------------	---	---	---	---

MANUAL PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

**HERMINSUL DE JESÚS CANO CALLE
STELIA CAROLINA MENDEZ SANCHEZ
JENNIFFER CRUZ LAITÓN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
2013**

Introducción

Este curso intenta introducir al estudiante a algunos de los procedimientos experimentales más ampliamente usados en bioquímica. Incluye análisis de macromoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; purificación y caracterización de proteínas, ensayos de enzimas y cinética enzimática, aislamiento y manipulación de ADN y otros. El estudiante también se familiarizará con algunos de los equipos más frecuentemente usados en las prácticas de bioquímica.

Pocos artículos en la literatura están escritos por un solo autor; la mayoría tienen al menos dos autores y algunos hasta más de diez. Es así, que las prácticas serán llevadas a cabo en grupos de dos o tres estudiantes. Usted puede escoger compañeros, o puede preguntar para que lo asignen a un grupo.

Antes de cada periodo de laboratorio, el estudiante necesita gastar algún tiempo leyendo la práctica, esta lectura proveerá información y entendimiento sobre los procedimientos a ser desarrollados. Si esto no se hace, usted desperdiciará mucho tiempo de clase, y perjudicará a los demás estudiantes y al profesor. También encontrará difícil responder las preguntas de la práctica que deben ser entregadas cada día.

ASPECTOS FILOSOFICOS: La investigación científica involucra una exploración de lo desconocido. En algunos casos, una pregunta tiene una “respuesta correcta”, la cual es conocida por el profesor e impartida a los estudiantes. En investigación, por otro lado, la respuesta correcta es raramente conocida de antemano y debe siempre ser deducida de los resultados experimentales. Los investigadores deben por lo tanto acostumbrarse a algún nivel de incertidumbre sobre la “respuesta correcta” a una pregunta experimental, y debe siempre permanecer abierto a la evidencia experimental que contradice una hipótesis que ha surgido de experimentos previos. Su trabajo como científico será considerar sus datos, y tratar de interpretarlos. En este contexto, “respuestas equivocadas” son respuestas que son contradichas por sus datos o que no producen una conclusión lógica de los datos que usted ha recolectado. Así, usted debe ser muy cuidadoso cuando reporte datos o resultados de lo que usted hizo u observó, especialmente si usted observa algo inesperado. Fraude científico, en la cual personas intencionalmente reportan datos falsos, es considerado muy en serio porque esto resulta en una creencia difícil de sobreponer ya que es un estamento que entra en conflicto con la verdad. En algunas ocasiones vemos en la literatura “retractaciones”, en la cual un científico publica un estamento de una información dada en un artículo previo como el resultado de un artefacto y no como una reflexión de la respuesta correcta. Evitando así la pena de publicar una “retractación” y ser visto como una persona que no es cuidadosa en el desarrollo de experimentos y en la interpretación de resultados.

Otro asunto crítico es la apropiada citación de las fuentes de información que usted usa para escritos científicos. Se debe siempre referenciar apropiadamente los autores de artículos y libros que usted consulta. Si usted no lo hace, estará reclamando crédito por trabajo desarrollado por otros.

EN REVISIÓN

I. ESPECTROSCOPIA Y DILUCIONES

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No presenta indicadores de peligro

I.1. Objetivos

- ❖ Adquirir habilidades y competencias básicas en el desempeño dentro de un laboratorio de bioquímica.
- ❖ Determinación cuantitativa de la concentración de CuSO_4 en una muestra problema mediante espectroscopía de absorción molecular UV-VIS.
- ❖ Comprender y aplicar los conceptos de molaridad, normalidad, porcentajes de peso a peso y dilución.

I.2. Conceptos relacionados

Absorbancia, ley de Lambert-Beer, dilución, espectrofotometría.

I.3. Fundamento teórico

I.3.1. Espectroscopía

Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la absorbancia de una solución. La absorbancia es una medida cuantitativa útil y está relacionada con la concentración a través de la ley de Beer-Lambert, la cual establece lo siguiente:

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

Donde **A** es la absorbancia de la muestra a una longitud de onda dada, ϵ es el coeficiente de extinción del compuesto a esa longitud de onda y sus unidades son $(\text{M} \cdot \text{cm})^{-1}$, c es la concentración molar de la especie que absorbe, y l es la longitud de paso de la celda que contiene la solución donde se realiza la medición y está dada en cm. Así, si el coeficiente de extinción es conocido, la absorbancia de la solución puede ser usada para calcular la concentración de la especie en solución (asumiendo que la única especie que absorbe es el compuesto de interés).

La explicación anterior de por qué medimos la absorbancia no explica lo que significa la absorbancia en sí. Otra definición más precisa está dada por la expresión (2):

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (2)$$

Donde I_0 es la cantidad de luz que entra a la muestra, e I es la cantidad de luz que sale de la muestra. La absorbancia es por lo tanto una medida de la porción de luz que llega al detector. De lo cual se deduce que cuando la absorbancia vale 1, solo el 10% de la luz alcanza el detector, y cuando es 2, solo el 1% de la luz alcanza el detector.

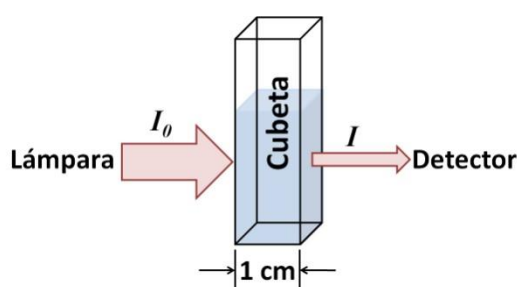


Figura 1. Arreglo interno típico de una cubeta de en el espectrofotómetro.

Valores de absorbancia mayores de 2 no son confiables porque muy poca luz está alcanzando el detector para permitir mediciones acertadas. Cuando se realizan las mediciones, si el valor de absorbancia es mayor de 2, se debe diluir la muestra y realizar las mediciones nuevamente.

Un espectrofotómetro interpretará huellas presentes en las caras ópticas de la cubeta, como también burbujas de aire o presencia de sólidos en la solución, afectando los valores reales de la medición. Antes de colocar la cubeta se deben tener en cuenta estos aspectos.

Algunas cubetas están diseñadas para luz visible únicamente. Cuando el espectrofotómetro está en modo de ultravioleta (340 nm o menos) asegúrese que su cubeta no tiene gran absorbancia cuando solamente contiene agua.

El término “espectroscopia” proviene de la palabra “espectro” que originalmente se refería a los múltiples colores de luz que aparecían al analizar luz blanca a través de un prisma. Implica por lo tanto, el uso de múltiples longitudes de onda de luz.

Los espectrofotómetros tienen entonces la habilidad de medir absorbancia a valores específicos de longitud de onda. El método usado más comúnmente involucra un monocromador que permite descomponer la luz incidente en sus componentes con diferentes longitudes de onda y de esta forma escoger una longitud de onda a la cual una muestra dada absorbe con mayor intensidad. La habilidad para medir la absorbancia a diferentes longitudes de onda es muy útil porque el coeficiente de extinción varía al variar la longitud de onda. Además, el

espectro de absorbancia puede variar dependiendo de la composición química del compuesto y el ambiente (solvente) alrededor de este.

La figura 2 muestra el espectro de absorbancia de una proteína. Esta tiene un valor muy alto de absorbancia de alrededor de 280 nm, y muy bajo a mayores longitudes de onda. Para esta proteína, los únicos cromóforos que absorben a esta longitud de onda son los anillos aromáticos de los aminoácidos tirosina y triptófano. Como estas proteínas absorben en el ultravioleta, son incoloras. Sin embargo, hay otras proteínas que absorban en la región visible como lo son la Hemoglobina que posee un grupo (Hemo) que absorbe fuertemente en esta región.

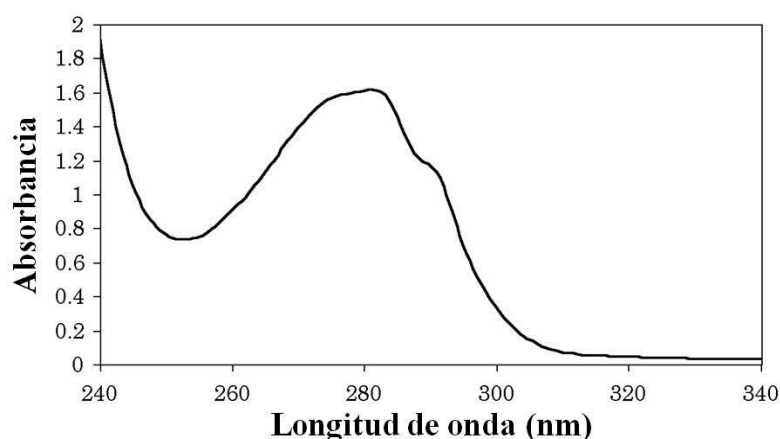


Figura 2. Espectro absorción ultravioleta de una proteína.

El coeficiente de extinción de una molécula a una longitud de onda dada puede ser calculado utilizando la ley de Beer-Lambert para medidas de absorbancia de soluciones de concentración conocida.

1.3.2. Diluciones

Muchas soluciones usadas en bioquímica son preparadas por dilución de una solución estándar. Para esto se necesita considerar la concentración final deseada y el volumen requerido del material diluido, esto se puede hacer utilizando la ecuación (3).

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (3)$$

Donde C_1 es la concentración inicial, V_1 es el volumen inicial, V_2 es el volumen del material diluido y C_2 es la concentración final del material diluido.

Consideremos un ejemplo. Se necesita preparar unas diluciones para una curva de calibración. Se tiene una solución estándar de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de un compuesto y se necesita preparar 200 μL de una solución 20 $\mu\text{g/mL}$. El cálculo entonces es:

$$V_1 = ?$$

$$C_1 = 1000 \mu\text{g/mL}$$

$$V_2 = 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 20 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = V_2 \left(\frac{C_2}{C_1} \right) \Rightarrow V_2 = 200 \mu\text{L} \left(\frac{20 \mu\text{g/mL}}{1000 \mu\text{g/mL}} \right) = 4 \mu\text{L}$$

Esto quiere decir que se toman 4 μL de la solución inicial, se le adiciona 196 μL de disolvente para obtener la solución final de concentración conocida.

Otro factor importante es la nomenclatura para las diluciones la cual se muestra como una relación. Por ejemplo: Una relación 1:2 quiere decir que a un volumen inicial se le agrega otro volumen de solvente para lograr el volumen final. Una relación 1:5 quiere decir que a un volumen inicial se le agregan 4 volúmenes de solvente. Otras veces la nomenclatura está dada en valores de X, por ejemplo una solución 10X. Si se quiere preparar de esta una dilución 1X se necesitara una relación 1:10 para prepararla. De la misma forma se pueden preparar otras diluciones para realizar una curva de calibración. En este experimento, se aprenderá cómo preparar diluciones, cómo usar el espectrofotómetro y cómo interpretar los datos.

I.4. Materiales

- ✓ Pipetas
- ✓ Puntas para pipetas
- ✓ Papel parafinado

I.5. Equipos

- ✓ Espectrofotómetro UV-Vis

I.6. Sustancias

- ✓ Sulfato de cobre (CuSO_4) 0,1 M
- ✓ Solución problema de CuSO_4

I.7. Procedimiento

I.7.1. Dilución simple I

- Colocar la longitud de onda a un valor de 700 nm y calibrar un blanco a cero con agua.
- Preparar 3 mL de las siguientes diluciones de CuSO_4 usando agua destilada: 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, y 1:100.
- Leer y registrar la absorbancia a la longitud de onda dada para cada dilución.

I.7.2. Dilución simple 2

- Asumiendo que la solución estándar de CuSO_4 es 5X, preparar las siguientes diluciones: 0,5X, 1X, 2X.
- Leer y registrar la absorbancia a la longitud de onda dada para cada dilución.

I.7.3. Diluciones en serie

- Preparar las siguientes diluciones de CuSO_4 usando dilución en serie: 1:5, 1:25, 1:125, y 1:625.
- Leer y registrar la absorbancia a la longitud de onda dada para cada dilución.

I.7.4. Aplicación experimental

- Leer y registrar la absorbancia a la longitud de onda dada para las soluciones o diluciones de concentración desconocida.

I.8. Disposición de los residuos

Tabla. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

Sustancia o Mezcla	Recipiente rotulado
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos acuosos

I.9. Consultar antes de la práctica

- a) Una disolución que contiene 4.48 ppm de KMnO_4 presenta una transmitancia de 0.309 en un cubeta de 1.00 cm a 520 nm. Calcular la absorptividad molar del KMnO_4 .
- b) El complejo FeSCN^{+2} , cuya longitud de onda de máxima absorción es 580 nm, tiene una absorptividad molar de $7.00 \times 10^3 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Calcular:

1. La absorbancia a 580 nm de una disolución del complejo $2.50 \times 10^{-5} \text{M}$, si se mide en una cubeta de 1.00 cm
 2. La absorbancia de una disolución del complejo cuya concentración es el doble de la del apartado anterior.
 3. La transmitancia de las disoluciones descritas en los apartados 1 y 2.
 4. La absorbancia de una solución cuya transmitancia es la mitad de la descrita en el apartado 1.
- c) La constante de equilibrio del par ácido/base conjugado:



Es 8.00×10^{-5} . A partir de la siguiente información

Especie	Máximo de absorción, nm	Absortividad Molar	
		430 nm	600nm
HIn	430	8.04×10^3	1.23×10^3
In⁻	600	0.775×10^3	6.96×10^3

1. Calcular la absorbancia a 430 nm y a 600 nm de las disoluciones de indicador con las siguientes concentraciones: $3,00 \times 10^{-4} \text{M}$; $2,00 \times 10^{-4}$; $1,00 \times 10^{-4} \text{M}$; $0,500 \times 10^{-4} \text{M}$ y $0,250 \times 10^{-4} \text{M}$.
2. Representar gráficamente la absorbancia como función de la concentración de indicador.

Referencias bibliográficas

- 1) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica: aulas prácticas. 6. ed. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2001. 178 p.
- 2) Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
- 3) Skoog D. A., West D. M. y Holler F.J., "Fundamentos de Química Analítica". Ed. Reverte. Barcelona. 1997.

EN REVISIÓN

2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL pH Y SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No presenta indicadores de peligro

2.1. Objetivos

- ❖ Determinar el pH de una solución utilizando métodos colorimétricos o potenciométricos.
- ❖ Reconocer la capacidad tampón de aminoácidos y proteínas
- ❖ Relacionar los conocimientos adquiridos del funcionamiento de las soluciones tampón de importancia biológica.

2.2. Conceptos relacionados

Concepto de ácido-base, ionización del agua, definición de pH y pKa, ecuación de Henderson-Hasselbalch, capacidad tampón, valores de pKa de aminoácidos.

2.3. Fundamento teórico

El pH de una solución acuosa se define como el logaritmo negativo de la concentración molar de hidrogeniones (H_3O^+). La determinación de pH es muy importante, ya que influencia de manera directa en la carga de la molécula y en su actividad biológica. El producto iónico del agua es la base de la escala del pH propuesta por Sørensen ($K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$, $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$).

La escala de pH permite expresar la concentración de iones hidronio (protón hidratado) comprendida entre 1M y 1×10^{-14} M, extremos que corresponden a pH 0 y 14, la neutralidad es igual a pH 7.0.

La manera mas conveniente y exacta de determinar el pH es usando un electrodo de vidrio. Este electrodo depende del intercambio de iones en las capas hidratadas formadas sobre la superficie del electrodo de vidrio.

Generalmente se utiliza vidrio compuesto de aproximadamente 22% de Na_2O , 6% de CaO y 72% de SiO_2 . Este vidrio muestra una especificidad hacia los iones hidrógeno hasta un pH de cerca de 9; a valores mayores de pH, la membrana se vuelve sensible a iones sodio y otros iones alcalinos. Esto se evita empleando membranas construidas con vidrio en que el sodio se reemplaza por litio. El electrodo de vidrio debe mantenerse en agua destilada o en solución de KCl saturada para evitar el crecimiento de microorganismos. En el electrodo de vidrio está presente un electrodo de referencia interno de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) rodeado por un electrolito de HCl 0.1M. Este electrodo de referencia interno produce un potencial estacionario.

El electrodo de vidrio actúa como una batería cuyo voltaje depende la actividad del H^+ de la solución en que está sumergida. En el pHmetro, el electrodo de vidrio y el electrodo de referencia de calomel, están diseñados para que a pH 7 dé un potencial cero. Antes de medirse el pH de una solución desconocida el pHmetro se estandariza con soluciones amortiguadoras de pH conocidos.

El voltaje depende de la temperatura, por lo que los potenciómetros tienen un control de ajuste para la temperatura de la solución. Los electrodos de vidrio son frágiles y caros, por lo tanto deben manejarse con cuidado. Si se mide el pH de soluciones de proteínas, se puede formar una capa delgada en el electrodo la cual puede removerse sumergiendo en HCl 0.1N, y después limpiando con detergente diluido y enjuagando con agua.

Por otro lado, las soluciones amortiguadoras (“buffers” o soluciones tampón), son aquellas capaces de mantener el pH dentro de un rango de variación mínima. Están formadas generalmente por un ácido débil y su base conjugada cuando se trabaja a pHs por debajo de 7. En el caso de pHs alcalinos se usa una base débil con su ácido conjugado respectivo. La eficiencia de una solución reguladora está regida por dos factores: (a) La concentración total del regulador (suma de las concentraciones del ácido débil y de la sal). Cuanto más concentrado sea un regulador, más tolerante será a la adición de ácidos o bases fuerte. (b) Por la relación existente entre la base conjugada y el ácido. Cuando esta relación es igual a 1, la solución reguladora tiene su máxima eficiencia.

Este valor se alcanza cuando el pH del regulador es igual al pKa de ácido. La E=ecuación de Henderson y Hasselbalch, es muy útil para la preparación de las soluciones amortiguadoras. ($\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{sal}]/[\text{Ácido}]$). El pH mas adecuado para que una solución amortiguadora funcione eficientemente, es cuando se encuentra en un rango de pH igual a su $\text{pKa} \pm 1$.

2.4. Materiales

- ✓ 8 tubos de ensayo
- ✓ Pipetas (5-10 mL)
- ✓ Varillas de agitación
- ✓ 3 vasos de precipitados (50 o 100 mL)

2.5. Equipos

- ✓ PHmetro

2.6. Sustancias

- ✓ Soluciones tampón de pH 3,5,7,9 y 10
- ✓ Indicador universal
- ✓ Ácido bórico
- ✓ Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)
- ✓ NaOH 0.1 M
- ✓ Ácido ortofosfórico
- ✓ HCl 0.1 M
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

2.7. Procedimiento

I. Determinación del pH mediante el método potenciométrico.

1) Preparación de soluciones en un rango de pH de 3-10:

Pesar 0.5 g de ácido bórico y disolver en un 100mL de agua destilada, adicionar 560 μL de ácido ortofosfórico y 480 μL de ácido acético glacial, completar hasta 200 mL de agua destilada. El pH de la solución da alrededor de 1.9.

A partir de esta solución, a 25 mL de la solución anterior adicionar NaOH 0.2 M, con ayuda de una bureta, para obtener diferentes pHs. Realizar los cálculos teóricos del volumen de NaOH para obtener soluciones a pH 3,5, 7,9 y 10. Comparar estos datos con los obtenidos experimentalmente.

2) Preparación de una solución tampón de fosfato 0.1M a pH 7.0

- A) Pesar 2.78 g de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) y disolver en agua en un balón volumétrico de 100 mL, para obtener una solución de 0.2M.
- B) Pesar 5.365 g de fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) o 7.17g ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y disolver en agua en un balón volumétrico de 100 mL, para obtener una solución de 0.2M.

Mezclar 9,75 mL de la solución A con 15,25 mL de la solución B y diluir hasta 50 mL para obtener una solución tampón de fosfato 0.1M a pH=7.0.

La tabla I contiene los volúmenes de las soluciones A y B necesarios para obtener soluciones tampón de fosfato a diferentes pHs. Determinar el pH teórico y experimental.

Tabla I. Relación entre los volúmenes de las soluciones A y B para obtener diferentes pHs.

A (mL)	B(mL)	pH		A(mL)	B(mL)	pH
23.5	1.5			16	9	
23	2			15	10	
22,5	2,5			14	11	
22	3			13	12	
21.5	3.5			12	13	
21	4			11	14	
20.5	4.5			10	15	
20	5			9	14	

19	6			7	18	
18	7			5	20	
17	8			3	22	

2. Determinación del pH mediante el método colorimétrico.

1) Preparación de las soluciones con papel universal:

Pesar 0.05g de naranja de metilo, 0,15g de rojo de metilo, 0.30g de azul de bromotimol, 0.35g de fenolftaleína y el 66% de alcohol etílico a un litro.

Escala estándar

Preparar una batería de 8 tubos de ensayo y colocar en cada tubo de ensayo 1 mL de las soluciones preparadas en un rango de pH de 3-10. Adicionar 5 gotas de indicador universal y 9 mL de agua destilada.

Experimentación

Experimento I: Determinación del pH.

Tubo 1: 5 gotas de indicador + 10 mL de agua

Tubo 2: 5 gotas de indicador + 1 mL de solución tampón pH 7.0 + 9 mL de agua.

Tubo 3: 5 gotas de indicador + 10 mL de agua

Tubo 4: 5 gotas de indicador + 1 mL de solución tampón pH 7.0 + 9 mL de agua.

Determinar el pH de cada solución y anotar los resultados en una tabla

Experimento II: Capacidad amortiguadora

Tubo 1: Adicionar una gota de NaOH 0.1M + 9 mL de agua destilada

Tubo 2: 9 mL de solución amortiguadora a pH = 7.0 + una gota de NaOH 0.1M

*Observar, determinar el pH y anotar en una tabla.

Soplar por 15 segundo el tubo 1 y por un minuto el tubo 2. Observar el cambio de color, determinar el pH (pHmetro) y anotar en una tabla.

Tubo 3: 9 mL de agua destilada+ 2 gotas de HCl 0.1M +

Tubo 4: 9 mL de solución amortiguadora a pH= 7.0+ 2 gotas de HCl 0.1M

Observar, determinar el pH y anotar en una tabla.

Continuar adicionando gota a gota HCl 0.1M al tubo 4 hasta obtener el mismo color del tubo 3. Determinar el número de gotas. ¿Qué pueden concluir?.

2.8. Disposición de los residuos

Tabla 2. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos acuosos

2.9. Consultar antes de la práctica



- 1) Colocar en orden decreciente de acidez las siguientes soluciones: CH_3COOH 1M, agua, NaOH 1M y HCl 1M.
- 2) Calcular la $[\text{H}^+]$ y $[\text{OH}^-]$ que están presentes en una solución de HCl 1 mM.
- 3) Calcular la concentración de protones, en mol/L, de una solución de ácido acético 1M, sabiendo que la K_a del ácido acético a 25°C es de 1.86×10^{-5} .
- 4) Calcular el punto isoeléctrico de la Glicina sabiendo sus valores de $\text{pK}_{a1}=2.4$ y $\text{pK}_{a2}=9.7$.
- 5) Calcular el valor del pH de una solución de a) 1mM de H_2SO_4 , b) 1mM de NaOH, asumiendo que en ambos los solutos están completamente ionizados. Cuál sería el

valor del pH de la solución resultante de la mezcla de 25 mL de H_2SO_4 con 20 mL de solución de NaOH?

Referencias bibliográficas

1. Wilson, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica: aulas prácticas. 6. ed. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2001. 178 p.
3. Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
4. Observaciones Oveimar

3. DISEÑO DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS II

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	 

3.1. Objetivos

- ❖ Explorar las características de los sistemas amortiguadores y la forma como mantienen valores constantes de pH.
- ❖ Determinar la K_a para un ácido débil o K_b para una base débil.
- ❖ Preparar una solución amortiguadora de un pH determinado.
- ❖ Predecir la magnitud del cambio de pH cuando se adiciona ácido o base a una solución amortiguadora.

3.2. Conceptos relacionados

Soluciones tampón, equivalentes ácido-base, equilibrio iónico, producto iónico del agua, constante de disociación del agua, capacidad amortiguadora.

3.3. Fundamento teórico

Las soluciones amortiguadoras son críticas en los procesos biológicos y en general los seres vivos utilizan diferentes tipos de soluciones amortiguadoras para controlar el pH a la cual se llevan a cabo las reacciones.

Una solución amortiguadora es una sustancia que mantiene constante el pH después de la adición de pequeñas cantidades de ácido o base. Un sistema de este tipo, consiste de un ácido o base débil y su respectiva sal, por ejemplo el ácido carbónico y el bicarbonato de sodio son un sistema amortiguador.

El pH de una mezcla amortiguadora se puede conocer mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \text{Log} \frac{[sal]}{[ácido]}$$

A partir de esta fórmula se pueden deducir fácilmente las propiedades de los amortiguadores:

1.- El pH de una disolución amortiguadora depende de la naturaleza del ácido débil que lo integra (de su pKa), de modo que para cantidades equimoleculares de sal y de ácido, el pH es justamente el pKa de este ácido. Dicho de otra forma, se puede definir el pKa de un ácido débil como el pH del sistema amortiguador que se obtiene cuando $[sal] = [ácido]$ (Figura de la derecha).

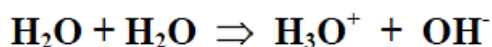
2.- El pH del sistema amortiguador depende de la proporción relativa entre la sal y el ácido, pero no de las concentraciones absolutas de estos componentes. De aquí se deduce que añadiendo agua al sistema, las concentraciones de sal y ácido disminuyen paralelamente, pero su cociente permanece constante, y el pH no cambia. Sin embargo, si la dilución llega a ser muy grande, el equilibrio de disociación del ácido se desplazaría hacia la derecha, aumentando la $[sal]$ y disminuyendo $[ácido]$, con lo cual el cociente aumenta y el pH también, de forma que se iría acercando gradualmente a la neutralidad (pH 7).

3.- Cuando se añaden ácidos o bases fuertes a la disolución amortiguadora, el equilibrio se desplaza en el sentido de eliminar el ácido añadido (hacia la izquierda) o de neutralizar la base añadida (hacia la derecha). Este desplazamiento afecta a las proporciones relativas de sal y ácido en el equilibrio. Como el pH varía con el logaritmo de este cociente, la modificación del pH resulta exigua hasta que uno de los componentes está próximo a agotarse

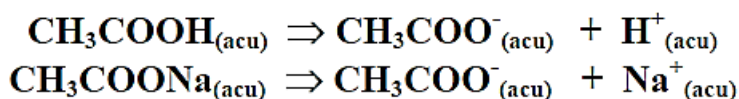
Como ejemplo de lo anterior, la adición de 10 mL de una solución 0,10 M de NaOH a 1 L de agua destilada incrementa el pH de en 4 unidades (de 7 a 11). Para una solución que contiene 0,20 mol/L de ácido etanoico (CH_3COOH) y etanoato de sodio (CH_3COONa) su pH es de 4,76.

Cuando se le agregan cantidades moderadas de un ácido o una base a esta última solución, el pH experimenta pocos cambios; así tendremos que la adición de 10 mL de una solución de NaOH 0,10 M en un litro de la solución de ácido etanoico (CH_3COOH) y etanoato de sodio (CH_3COONa), incrementa el pH en 0,01 unidades, es decir el nuevo pH de la solución es 4,77.

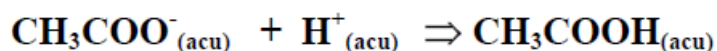
Por lo que tendremos que una solución amortiguadora es capaz de resistir cambios en el pH en comparación al agua pura, o en comparación con un ácido al cual se le agrega cierta cantidad de base, o lo contrario, una base a la cual se le agrega cierta cantidad de ácido.



Por ejemplo la solución amortiguadora preparada entre ácido etanoico (CH_3COOH) y etanoato de sodio (CH_3COONa):

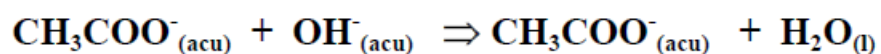


El ácido etanoico y su anión CH_3COO^- reacciona con los iones H^+ u OH^- que puedan ser agregados a la solución. Cuando un ácido se añade a esta solución, el ion etanoato reacciona formando ácido etanoico, el cual no se disocia completamente en agua (electrolito débil) de acuerdo a la siguiente reacción:



De esta forma el pH de la solución no cambia.

Cuando una base se añade a esta solución, el ácido etanoico reacciona con los iones OH^- , de acuerdo a la siguiente reacción:



Debido a que el ion etanoato no es una base lo suficientemente fuerte para aceptar iones H^+ del agua, el pH de la solución no presenta cambios significativos.

Una solución amortiguadora no puede actuar de forma eficiente si se adiciona ácido o base es adicionado al sistema. La cantidad de ácido o base que se puede agregar a una solución amortiguadora antes de cambiar de forma significativa su pH se denomina capacidad de amortiguación o capacidad buffer.

Ejemplos de soluciones amortiguadoras importantes corresponden al sistema ácido carbónico – anión bicarbonato, responsable de mantener el pH de la sangre dentro del intervalo pequeño de variaciones, indispensable en los humanos.

SISTEMA AMORTIGUADOR	ESPECIES	pH
ácido etanoico - anión etanoato	$\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COO}^-$	4,76
ácido carbónico - anión bicarbonato	$\text{H}_2\text{CO}_3 - \text{HCO}_3^-$	6,46
ion amonio - amoníaco	$\text{NH}_4^+ - \text{NH}_3$	9,25

3.4. Materiales

- ✓ Espátula
- ✓ Erlenmeyer de 250 mL
- ✓ pH metro
- ✓ Pipeta de 10 mL
- ✓ Vaso de precipitado de 250 mL

3.5. Sustancias

- ✓ Cloruro de sodio (NaCl) 0,1 M
- ✓ Hidrogenosulfato de sodio (NaHSO_4) 0,1 M
- ✓ Acetato de sodio (CH_3COONa) 0,1 M
- ✓ Ácido acético (CH_3COOH) 0,1 M
- ✓ Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0,1 M
- ✓ Hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO_3) 0,1 M
- ✓ Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M

3.6. Procedimiento

- Escribir las ecuaciones netas para soluciones de NaCl , NaHSO_4 , CH_3COONa , CH_3COOH , Na_2CO_3 , y NaHCO_3 0,1 M, y calcular los valores de pH de forma teórica.
- Usar un pH metro para medir los valores de pH de las soluciones anteriores.
- Preparar soluciones amortiguadoras 0,1 M de: CH_3COOH , CH_3COONa , Na_2CO_3 y NaHCO_3 . Realizar los cálculos teóricos de pH y compararlos con los resultados experimentales obtenidos.
- Tomar 25 mL de la solución ácida y mezclarla con 25 mL de la sal. Medir el pH de la solución amortiguadora. Escribir las reacciones respectivas y realizar los cálculos.
- Dividir la solución anterior en 2 volúmenes iguales. Adicionar 1 mL de NaOH 0,1 M a una mitad y HCl 0,1 M a la otra mitad. Registre el pH de estas soluciones después de la adición.
- Poner 25 mL de agua destilada en dos erlenmeyers y medirles el pH. Adicionar 1 mL de NaOH 0,1 M a uno y HCl 0,1 M al otro. Registrar el pH de estas soluciones después de la adición.
- Preparar una solución amortiguadora mezclando 1 mL de la solución ácida y 10 mL de la base conjugada. Medir el pH. Calcular con estos datos el pK_a y el K_a del ácido.
- Preparar una solución amortiguadora mezclando 10 mL del ácido y 1 mL de solución de la base conjugada. Medir el pH y calcular con estos datos el pK_a y el K_a . Comparar resultados con el punto anterior.

3.7. Disposición de los residuos

Tabla. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos acuosos (Buffer)

3.8. Consultar antes de la práctica

1. ¿Porque el pH del potenciómetro se ajusta primero a pH 7 y no a 4 o 10?
2. ¿Porque el electrodo se tiene que mantener en una solución de KCl saturado? En caso de no contar en el laboratorio con KCl, ¿Que otros compuestos pueden usarse?
3. Si quisieras preparar un buffer de fosfatos de potasio pH 11, ¿Qué sales seleccionarías?
4. ¿El buffer de acetato de sodio que preparaste está a un pH que se puede considerar adecuado para servir como solución reguladora? .Explica tu respuesta.
5. En la preparación del acetato de sodio, cual es el ácido y cual la base conjugada.

Referencias bibliográficas

1. Wilson, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. Robert, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.
3. Douglas A. Skoog and Donald M. West. 1971. Principles of Instrumental Analysis. Holt, Rinehart and Winston, Inc.
4. Rodney F. Boyer. 1986. Modern Experimental Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	3 horas	Ninguna

4.1. Objetivos

- ❖ Obtener la estructura primaria de proteínas de bases de datos
- ❖ Analizar la estructura secundaria y terciaria de proteínas obtenidas en bases de datos.
- ❖ Usar visualizadores de proteínas.

4.2. Conceptos relacionados

Péptidos, estructura secundaria, proteínas, α -hélice y hoja β .

4.3. Fundamento teórico

Los péptidos (del griego $\pi\epsilon\pi\tau\acute{o}\varsigma$, peptós, digerido) son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

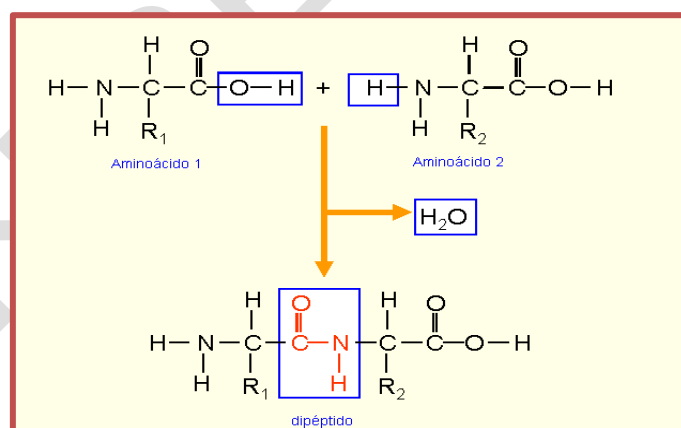


Figura 1. Reacción de formación del enlace peptídico.

El enlace peptídico es un enlace covalente entre el grupo amino ($-NH_2$) de un aminoácido y el grupo carboxilo ($-COOH$) de otro aminoácido. Los péptidos y las proteínas están formados por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos. El enlace peptídico

implica la pérdida de una molécula de agua y la formación de un enlace covalente CO-NH. Es, en realidad, un enlace amida sustituido. Podemos seguir añadiendo aminoácidos al péptido, pero siempre en el extremo -COOH terminal.

Los péptidos, al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza y son responsables por un gran número de funciones, muchas de las cuales todavía no se conocen.

La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido, y si el número es alto, a una proteína, aunque los límites entre ambos no están definidos. Orientativamente:

Oligopéptido: de 2 a 9 aminoácidos.

Polipéptido: entre 10 y 100 aminoácidos.

Proteína: más de 100 aminoácidos.

Las proteínas con una sola cadena polipeptídica se denominan proteínas monoméricas, mientras que las compuestas de más de una cadena polipeptídica se conocen como proteínas multiméricas.

La estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos de la cadena polipeptídica. Se adopta gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo (-CO-) y amino (-NH-) de los carbonos involucrados en las uniones peptídicas de aminoácidos cercanos en la cadena. Estos también se los encuentra en forma de espiral aplana.

Hélice alfa: En esta estructura la cadena polipeptídica se desarrolla en espiral sobre sí misma debido a los giros producidos en torno al carbono beta de cada aminoácido. Esta estructura se mantiene gracias a los enlaces de hidrógeno intracatenarios formados entre el grupo el grupo -C=O del aminoácido "n" y el -NH del "n+4" (cuatro aminoácidos más adelante en la cadena). Un ejemplo particular es la Hélice de colágeno: una variedad particular de la estructura secundaria, característica del colágeno, proteína presente en tendones y tejido conectivo. Existen otros tipos de hélices: Hélice 310 (puentes de hidrógeno entre los aminoácidos "n" y "n+3") y hélice Π (puentes de hidrógeno entre los aminoácidos "n" y "n+5"), pero son mucho menos usuales.

Hoja plegada beta o β -plegada: Cuando la cadena principal se estira al máximo que permiten sus enlaces covalentes se adopta una configuración espacial denominada cadena

beta. Algunas regiones de proteínas adoptan una estructura en zigzag y se asocian entre sí estableciendo uniones mediante enlaces de hidrógeno intercatenarios. Todos los enlaces peptídicos participan en estos enlaces cruzados, confiriendo así gran estabilidad a la estructura. La forma en beta es una conformación simple formada por dos o más cadenas polipeptídicas paralelas (que corren en el mismo sentido) o antiparalelas (que corren en direcciones opuestas) y se adosan estrechamente por medio de puentes de hidrógeno y diversos arreglos entre los radicales libres de los aminoácidos. Esta conformación tiene una estructura laminar y plegada, a la manera de un acordeón.

Giros beta-β: Secuencias de la cadena polipeptídica con estructura alfa o beta, a menudo están conectadas entre sí por medio de los llamados giros beta. Son secuencias cortas, con una conformación característica que impone un brusco giro de 180 grados a la cadena principal de un polipéptido.

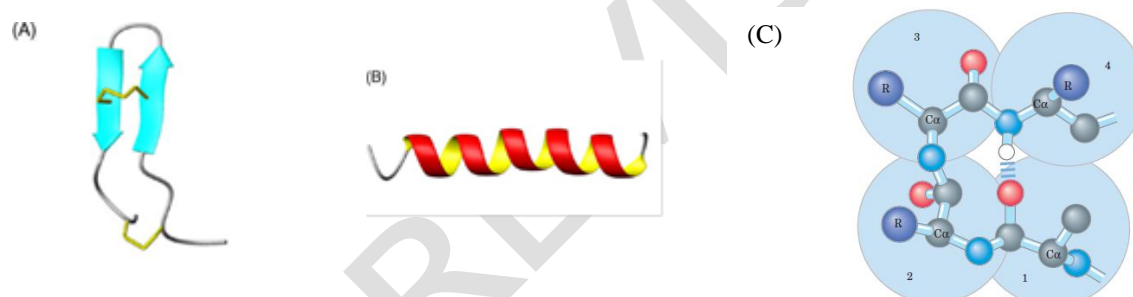


Figura 2. Principales estructuras secundarias de las proteínas: (A) β-plegada, Tachiplesina I; (B) α-hélice, Magainina 2, (C) Giros beta-β. [4-6]

4.4. Materiales

- ✓ Secuencias de proteínas obtenidas de bases de datos.

4.5. Equipos

- ✓ Computador con conexión a internet.

4.6. Sustancias

- ✓ No serán usadas sustancias en este laboratorio por tratarse de una práctica de bioinformática.

4.7. Procedimiento

Existen muchas bases de datos en donde se pueden encontrar las secuencias en aminoácidos y ácidos nucleicos de proteínas.

Para esta práctica usted hará uso de estas bases de datos y escogerá 4 secuencias problema (de 4 proteínas diferentes) a las cuales les deberá realizar los análisis descritos desde el ítem b al f.

- a. Ingrese a la página de protein data bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
En esta página puede buscar proteínas por palabras claves. Escoja 4 proteínas diferentes.
- b. Descargue la secuencia de la proteína en formato FASTA y en formato PDB.
- c. Reporte el número de residuos de aminoácidos, punto isoeléctrico, el número de hojas β y de α -hélices.
- d. Descargue un visualizador de proteínas, en internet se encuentran varios para esta práctica se recomienda uno de los más sencillos <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/index2.htm>, siga las instrucciones e instale el programa.
- e. En el visualizador RasMol abra cada una de las proteínas descargadas en el ítem a (en formato PDB), resalte las estructuras secundarias y juegue con el visualizador.

4.8 Responda las siguientes preguntas:

- a. ¿Qué información adicional es reportada en la página de la protein data bank?
- b. ¿De dónde sale la información reportada en la página?

Referencias bibliográficas

1. Lehninger A, Nelson DL, Cox M. "Principles of Biochemistry", Worth Publishers, 2º edición, 1997.
2. D.Voet, JG Voet, CW Pratt. "Fundamentos de Bioquímica". Editorial Médica Panamericana. 2ª Ed. Bioquímica, Madrid, 2007.
3. Eric Martz. University of Massachusetts, Amherst MA USA. July 12, 2008. <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/index2.htm>.
4. Lamberty M, Caille A, Landon C, Tassin-Moindrot S, Hetru C, Bulet P, Vovelle F. Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. Biochem 2001; 40(40):11995–12003.
5. Haney F, Hunter H, Matsuzaki K, Vogel H. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function?. Biochim Biophys Acta 2009; 1788(8):1639-55.
6. Koradi R, Billeter M, Wuthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. J Mol Graph 1996; 14(1):29–32.

5 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Método de Bradford, Biuret y Lowry.

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No presenta indicadores de peligro

5.1. Objetivos

- ❖ Comparar los métodos de cuantificación de proteínas.
- ❖ Determinar el rendimiento y pureza de una proteína: Caseína.
- ❖ Apreciar el uso de las técnicas espectrofotométricas para la cuantificación de material biológico.

5.2. Conceptos relacionados

Ley de Lambert-Beer, reactivo de Biuret, reactivo de Bradford, curva de calibración, caseína, reactivo de Lowry.

5.3. Fundamento teórico

Para el estudio de la estructura de una proteína, de la actividad de una enzima o el contenido proteínico de un alimento, es necesario conocer cuantitativamente la concentración de las proteínas.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) para la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de formar complejos.

Entre los métodos que se basan en la formación de complejos colorimétricos entre las proteínas y reactivos específicos se encuentran:

Tabla 1. Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad.

Método	Rango de sensibilidad (μg)	Ventajas	Aplicaciones
Bradford	1-15	<ul style="list-style-type: none"> • Limite bajo de detección • Compatible con agentes reductores • Rapidez 	<p>Resultados rápidos</p> <p>Muestras que contienen agentes reductores</p>
Lowry	25-100 a 500nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Color estable • Preciso 	<p>Mayormente usado</p> <p>Útil para cuantificar proteínas de membrana</p>
Biuret	1000-10000	<ul style="list-style-type: none"> • Muy específico para proteínas. • Muestra pocas interferencias • Es barato 	Determinación de proteínas en cereal.

• **Método de Bradford**

Está basado en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de

Coomasie G-250 se presenta en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de Absorbancias entre 595 y 465 nm (595-465nm).

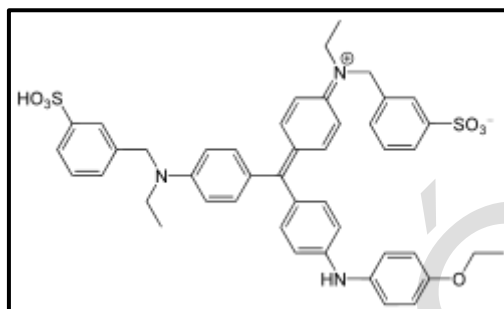


Figura 1. Estructura del azul de Coomassie.

- **Método de Lowry**

Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer

Este método consta de dos etapas:

1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

concentración de esta. Se dice pues que la respuesta de la muestra puede cuantificarse y, empleando la curva patrón, se puede interpolar el dato de la muestra problema hasta encontrar la concentración.

5.4. Materiales

- ✓ 15 Tubos de ensayo.
- ✓ Gradillas para tubos
- ✓ Micropipetas de 20-100 µl y de 100-1000 µl
- ✓ Agitador Vortex

5.5. Equipos

- ✓ Espectrofotómetro.

5.6. Sustancias

- ✓ Reactivo de Bradford
- ✓ Reactivo de Biuret
- ✓ Suero albumina sérica bovina (BSA) (10 mg/mL)
- ✓ Reactivo de Lowry
- ✓ Agua destilada
- ✓ NaCl al 1% (P/P)
- ✓ NaOH 1N

5.7. Procedimiento

- **Método de Biuret, Bradford y Lowry**
 - Pesar 0.1 g de caseína y colocarla en un vaso de precipitado de 100 mL. Añadir 30 mL de solución de NaCl al 1%, agregar gota a gota una disolución concentrada de NaOH 1N hasta completar la disolución de la proteína.
 - Pasar la disolución anterior a un matraz aforado de 50 mL y aforar. Esta es la disolución problema y de estas se tomarán alícuotas.
 - Para la preparación de la muestra problema de leche; tomar 0.05 mL de leche y realizar una dilución de 1:10 (Vol. Final: 1 mL). Si la concentración de proteína no se

encuentra dentro del rango de absorbancia preparar diluciones de 1:20, 1:100 y 1:1000 de la solución inicial.

- A continuación, separar los tubos de ensayo en dos grupos, los seis primeros se utilizaron para obtener la curva patrón y los otros seis para analizar la muestra problema, el tubo 1 contendrá el blanco, del tubo 2 al 6 adicionar los siguientes volúmenes: 0.1 ml, 0.2 ml, 0.4 ml, 0.8 ml y 1.0 ml de solución de albumina sérica bovina (BSA), respectivamente.
- En seguida, los tubos 7 a 12 se tratará con la muestra problema y los reactivos de Biuret, Lowry y Bradford con la misma cantidad (3 mL), como se muestra en la tabla I, se homogeniza la solución por medio de un agitador tipo vortex. (Solamente al tubo 1 se le agregaron 3 ml de reactivo de Biuret, Lowry y Bradford, según corresponda y 3 ml de NaCl).
- Posteriormente, llevar los tubos a 100 °C durante 10 minutos hasta la formación del complejo. Dejar reposar las soluciones hasta alcanzar la temperatura ambiente.
(Realizar un ensayo con y sin calentamiento)
- Finalmente, realizar la cuantificación de la solución por medio de un espectrofotómetro a 540 nm para el reactivo de Biuret, 595 nm para el reactivo de Bradford y 600 nm para el reactivo de Lowry, entre cada medición lavar las celdas; al tener todas las mediciones realizar la curva de calibración.

Tabla I. Metodología para la cuantificación de proteínas.

Tubo No.	Solución *	Absorbancia	Proteína (mg)
1	3 ml NaCl al 0.9%,		Blanco
2	0.1 ml BSA y 2.9 ml NaCl		
3	0.2 ml BSA y 2.8 ml NaCl		
4	0.4 ml BSA y 2.6 ml NaCl		
5	0.8 ml BSA y 2.2 ml NaCl		
6	1 ml BSA y 2 ml NaCl		
7	0.25 ml caseína y 2.75 ml NaCl		
8	0.5 ml caseína y 2.5 ml NaCl		
9	0.25 ml sobrenadante y 2.75 ml NaCl		
10	0.5 ml sobrenadante y 2.5 ml NaCl		
11	0.25 ml leche diluida y 2.75 ml NaCl		
12	0.5 ml leche diluida y 2.5 ml NaCl		

*A todas las soluciones se agregaron 3 ml del reactivo de Biuret, 3ml de reactivos de Bradford y 3 mL de reactivo de Lowry.

Registrar los resultados en la tabla 2.

Tabla 2: Concentración de proteína en las muestras problema.

Tubo No.	Proteína (mg)	Factor de disolución	Proteína (mg/mL)
7			
8			
9			
10			
11			
12			

I.8 Responda las siguientes preguntas:

I.8.1 Defina con sus propias palabras que es una curva patrón.

I.8.2 Explique por qué en el método de Biuret la absorbancia de una proteína se lee a una longitud de 540 nm.

I.8.3 ¿Cuál método es el más sensible?, y el menos sensible?. ¿Por qué?.

I.8.4 Decida qué método de determinación de proteínas elegirías para la cuantificación de proteínas en: suero, orina, durante una purificación enzimática, en un extracto bacteriano concentrado, en preparaciones de membranas plasmáticas solubilizadas con SDS, en preparaciones de membranas mitocondriales solubilizadas con Tritón X-100. Justifique su respuesta.

Referencias bibliográficas

1. Lehninger A, Nelson DL, Cox M (1997). "Principles of Biochemistry", Worth Publishers, 2º edición.
2. D. Voet, JG Voet, CW Pratt. "Fundamentos de Bioquímica". Editorial Médica Panamericana. 2ª Ed. Bioquímica, Madrid, 2007.

- 3 Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- 4 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275).
- 5 Gornall A, Bardawill CJ, David MM (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem. 177: 751-766.

6. FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE POR pI Y PRECIPITACIÓN SALINA.

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No se presenta riesgos.

6.1. Objetivos

- ❖ Analizar el efecto del pH sobre la solubilidad de proteínas hidrosolubles en solución acuosa.
- ❖ Separar proteínas de una solución acuosa de proteínas hidrosolubles utilizando precipitación salina.
- ❖ Cuantificar la concentración de proteínas en diferentes fracciones de leche entera bovina.

6.2. Conceptos relacionados

Proteína Caseína, contenido proteico de la leche, hidrólisis enzimática, desnaturalización de proteínas.

6.3. Fundamento teórico

La caseína (del latín caseus, "queso") es una fosfoproteína (un tipo de heteroproteína) presente en la leche y en algunos de sus derivados (productos fermentados como el yogur o el queso). En la leche, se encuentra en la fase soluble asociada al calcio (fosfato de calcio) en un complejo que se ha denominado caseinógeno. La tabla 1 recoge el contenido de esta proteína en la leche de distintas especies de mamíferos.

Tabla 1. Contenido proteico y caseínico de la leche de algunas especies animales.

Componente	especie			
	humana	bovina	ovina	caprina
proteínas (% del total lácteo)	1,3-1,5	3,2-3,5	5,4-6,0	3,1-4,0
caseínas (% del total proteico)	44,9	82,5	84,8	81,3

Características de las caseínas

Las caseínas es un conjunto heterogéneo de aminoácidos por lo que es difícil fijar una definición. Sin embargo, todas las proteínas englobadas en lo que se denomina caseína tienen una característica común: precipitan cuando se acidifica la leche a pH 4,6. Por ello, a la caseína también se le suele denominar proteína insoluble de la leche. Por otra parte, y aunque las proteínas que se denominan caseínas son específicas de cada especie, se clasifican en los siguientes grandes grupos de acuerdo con su movilidad electroforética: α_1 -caseína, α_2 -caseína, β -caseína y κ -caseína (véase la Figura 1). Esta última es de especial interés en la industria quesera, ya que su hidrólisis enzimática por el cuajo (la enzima quimosina) genera una nueva proteína, denominada para- κ -caseína. Cuando esta última reacciona con el calcio genera paracaseinato de calcio. Durante el proceso de maduración del queso, y a partir de la para- κ -caseína, se forman unos macropéptidos denominados γ -caseínas, responsables de las características reológicas y organolépticas de los quesos.

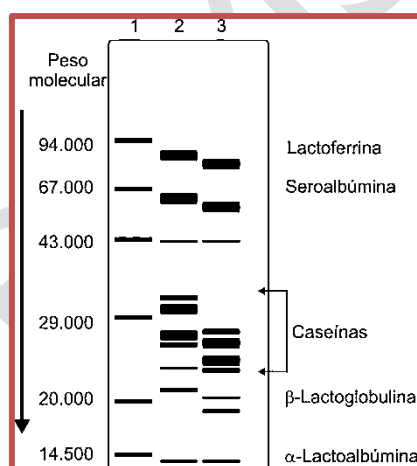


Figura 1. Patrón de electroforesis que se obtienen con las proteínas lácteas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Proteínas procedentes de las especies humanas. Carril 3: Proteínas procedentes de la especie bovina. (Tomada de Farrell, et al.)

Química y física de las caseínas

A diferencia de muchas otras proteínas, incluso del queso, las caseínas no precipita por acción del calor. Por el contrario, precipita por la acción de una enzima proteasa presente en el estómago de los mamíferos llamada renina y forma un precipitado denominado **paracaseína**.

Si la precipitación se realiza por la acción de ácidos, se le llama caseína ácida. En la elaboración de los quesos tienen lugar ambos tipos de precipitaciones.

Cuando se emplea la enzima tripsina, la caseína se hidroliza a una molécula fosfatada llamado pepto.

Las características de las caseínas de la leche de vaca se resumen en la tabla 2. La secuencia aminoacídica de la caseína contiene un número inusual de residuos del aminoácido prolina: entre 10 en la α -s2-caseína y 35 en la β -caseína. Como resultado, las caseínas son relativamente hidrofóbicas (poco soluble en agua) y carecen de estructura secundaria o terciaria bien definidas. En la leche se encuentra como suspensión de partículas que asemeja a las micelas de surfactantes (pequeñas esferas hidrofílicas en el exterior e hidrófobas en el interior). Estas micelas de caseína se estabilizan por iones de calcio e interacciones hidrofóbicas.

Otro dato interesante, utilizado para separar las caseínas del resto de las proteínas lácteas mediante su precipitación, es que su punto isoeléctrico (pI) promedio es de 4,6. A este pH, las caseínas se encuentran en su punto de menor solubilidad debido a la reducción de las repulsiones intermoleculares, por lo que precipitan. Ahora bien, el pI es diferente para cada una de las fracciones caseínicas, ya que varía entre el 4,44-4,97 para la α -s1-caseína y el 5,3-5,8 en la variante genética B de la K-caseína.

Tabla 2. Algunas de las características fisicoquímicas de las caseínas bovinas.

Característica	Caseína			
	α_{s1}	α_{s2}	B	K
Concentración en leche (g/L)	12-15	3-4	9-11	2-4
Variantes genéticas	B y C	A	A ¹ y A ²	A y B
Masa molecular	23.545 - 23.615	25.226	23.983 - 24.023	19.006 - 19.037
Punto isoeléctrico (pI)	4,44 - 4,76	...	4,83 - 5,07	5,45 - 5,77
Restos de aminoácidos (n°)	199	207	209	169

Por otra parte, cuando la proteína no ha sufrido ningún cambio en su interacción con el disolvente, se dice que presenta una estructura nativa (Figura 2). 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.

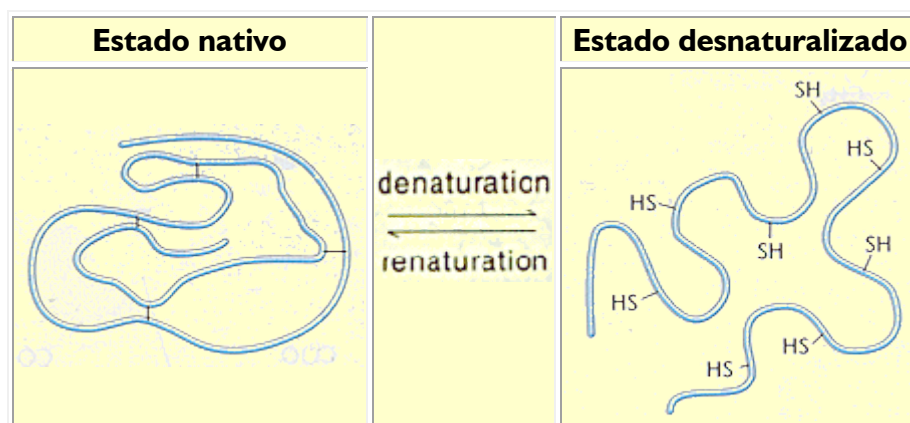


Figura 2. Estados de una proteína.

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman **agentes desnaturalizantes**. Se distinguen agentes **físicos** (calor) y **químicos** (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica). Como en algunos casos el fenómeno de la desnaturalización es reversible, es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en:

- la polaridad del disolvente
- la fuerza iónica
- el pH
- la temperatura

Cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el disolvente disminuirá su estabilidad en disolución y provocará la precipitación. Así, la desaparición total o parcial de la envoltura acuosa, la neutralización de las cargas eléctricas de tipo repulsivo o la ruptura de los puentes de hidrógeno facilitarán la agregación intermolecular y provocará la precipitación. La precipitación suele ser consecuencia del fenómeno llamado **desnaturalización**.

La **precipitación salina** de las proteínas es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Grandes cantidades de una sal agregada a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína-H₂O porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar ésta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas. Comúnmente se usa sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ para tal fin, a causa de su gran solubilidad (760 g de sulfato de amonio/1000 mL de agua a una temperatura de 20°C) y porque el ión sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de ésta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas.

6.4. Materiales

- ✓ 4 tubos de centrífuga
- ✓ 4 tubos de ensayo
- ✓ 1 micropipeta de 100-1000 µL
- ✓ Vasos de precipitado
- ✓ Papel de filtro
- ✓ Embudo Büchner
- ✓ Erlenmeyer con desprendimiento lateral
- ✓ Bomba de vacío

6.5. Equipos

- ✓ pHmetro
- ✓ Centrífuga
- ✓ Espectrofotómetro

6.6. Sustancias

- ✓ Reactivo de Biuret.
- ✓ 100 mL Solución de Sulfato de amonio saturada.
- ✓ 100 mL de leche de cantina.

6.7 Procedimiento

6.7.1 Determinación de las proteínas totales en la leche.

- En un tubo de ensayo tome 1,5 mL de agua destilada y adicione 1,5 mL del reactivo según corresponda. Mezcle bien y calibre el espectrofotómetro.
- En otro tubo de ensayo adicione 1,5 mL de leche y 1,5 mL del reactivo (Biuret, Lowry y Bradford), mezcle bien y mida la absorbancia. Tenga en cuenta la curva de calibración que obtuvo en la práctica anterior. Si la absorbancia es mayor a los valores de la curva, haga diluciones hasta que tenga un valor de absorbancia en el rango de la curva de calibración. Para realizar las diluciones use la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$. Anote los datos de las diluciones para que los tenga en cuenta para calcular la concentración de las proteínas totales de la leche.

6.7.2 Fraccionamiento de las proteínas de la leche.

- Precipitación de caseína por punto isoeléctrico*
 - Tome 20 mL de leche en un vaso de precipitado y mida el pH.
 - Agregue lentamente pequeñas alícuotas de HCl, agite (con agitación magnética), hasta obtener un pH de 4,7. Registre las observaciones del efecto del pH sobre las propiedades de la leche (suspensión de proteínas en agua).
 - Pese el papel de filtro y filtre al vacío usando un embudo Büchner (al vacío). Determine el peso de las caseínas (después de la filtración). Tenga en cuenta este peso para determinar la concentración de caseínas totales en la leche (%).
 - Mida el volumen del sobrenadante y téngalo en cuenta para determinar el porcentaje de las proteínas de la leche que son solubles a pH 4.7.
- Determinación de la concentración de proteínas solubles (presentes en el sobrenadante)*
 - Tome 1,5 mL del sobrenadante y 1,5 mL del reactivo (Biuret, Lowry y

Bradford), mezcle bien y mida la absorbancia. Tenga en cuenta la curva de calibración que se obtuvo en la práctica anterior. Si la absorbancia es mayor a los valores de la curva, haga diluciones hasta que tenga un valor de absorbancia en el rango de la curva de calibración y tenga en cuenta estos datos para calcular la concentración de proteínas solubles totales en la leche (mg/mL).

c) *Precipitación salina de las proteínas solubles (presentes en el sobrenadante).*

- Tome 1,5 mL de la solución de sulfato de amonio saturada y mézclela con 1,5 mL del sobrenadante (proteínas solubles).
- Centrifugue y observe si se forma un pellet. Pese el pellet y mida el volumen del sobrenadante.

6.8. Disposición de los residuos

Tabla. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos acuosos (Buffer)

6.9 Responda las siguientes preguntas:

- ¿Qué es desnaturalización de una proteína?
- Consulte las aplicaciones alimenticias e industriales de la caseína.
- Consulte el pI para las proteínas Lactoferrina, albúmina sérica bovina, α -Lactalbumina y β -Lactalbumina de la leche. Explique por qué estas proteínas no precipitan a pH 4.7.
- ¿Qué tipo de proteínas son las proteínas de la leche, soluble a pH de 4.7?
- ¿Qué otros métodos, diferentes a la precipitación salina, se puede usar para la precipitación de proteínas?.

Referencias bibliográficas

1. Jenness J. 1980. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. Journal of Dairy Science 63(10): 1605-1630.
2. Lonnerdal B and Forsum E. 1985. Casein content of human milk. American Journal of Clinical Nutrition 41(1): 113-120.
3. Ribadeau-Dumas B and Grappin R. 1989. Milk protein analysis. Le Lait 69(5): 357-416.
4. Park YW, Juárez M, Ramos M y Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research 68(1-2): 88-113.
5. Williamson MB. 1944. The amino acid composition of human milk proteins. Journal of Biological Chemistry 156(1): 47 - 52.
6. Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF y Swaisgood HE. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. Journal of Dairy Science '87'(6): 1641-1674.

7. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS POR ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No se presenta riesgos.

7.1. Objetivos

- ❖ Conocer los principios de la técnica de electroforesis.
- ❖ Separación de las proteínas en acetato de celulosa.

7.2. Conceptos relacionados

Proteínas, enzimas, electroforesis, acetato de celulosa, movilidad electroforética, proteínas séricas.

7.3. Fundamento teórico

La electroforesis consiste en la migración de solutos iónicos a través de un medio por efecto de un campo eléctrico. El soluto, como es el caso de esta práctica, puede ser una macromolécula como, por ejemplo, una proteína.

En presencia de un campo eléctrico, E , una partícula cargada con carga q en un medio determinado alcanzará una velocidad estacionaria, v , que depende del balance entre la fuerza que origina el campo eléctrico, $E \cdot q$, y el rozamiento viscoso, $f v$, donde f es el coeficiente de rozamiento, es decir, en condiciones de migración estacionaria $E \cdot q = f \cdot v$. Se define la **movilidad electroforética U** como la velocidad por unidad de campo eléctrico:

$$U = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

La aparición en la ecuación anterior del coeficiente de rozamiento, f , que se relaciona, entre otros factores, con el tamaño y forma de la partícula, sugiere en principio que un experimento de electroforesis con macromoléculas podría proporcionar información sobre su estructura. Sin embargo, esto no ha sido posible debido a la carencia de una formulación exacta del proceso de electroforesis por, entre otras razones, el desconocimiento del valor del campo eléctrico en las cercanías de la macromolécula o, incluso, el valor de la carga de la misma macromolécula. A pesar de estas dificultades teóricas, la electroforesis es una técnica analítica muy utilizada, debido a su capacidad para la separación de sustancias, fundamentalmente macromoléculas biológicas.

Tipos de electroforesis

❖ *Electroforesis de frente móvil o libre*

Las sustancias a separar se introducen en un tubo en forma de U, disueltas en un tampón de pH y fuerza iónica adecuados. Se colocan dos electrodos en sendos brazos del dispositivo, entre los que se crea un campo eléctrico, provocando que las moléculas de proteína cargadas emigren hacia los electrodos de polaridad opuesta. Las diferentes proteínas se desplazan a velocidades diferentes de acuerdo con sus cargas y coeficientes de fricción respectivos, formándose nubes (o frentes) que se desplazan en la disolución tampón.

Este desplazamiento puede seguirse con diversos sistemas ópticos que ponen de manifiesto las sustancias según se van separando. Para impedir la mezcla por convección de las proteínas que emigran se necesita un sofisticado aparato y a su vez se precisa el empleo de muestras muy grandes. Esta es la razón por la que la electroforesis de frente móvil ha sido sustituida por la electroforesis de zona.

❖ *Electroforesis de zona*

En esta técnica, la muestra está obligada a desplazarse sobre un soporte sólido de papel, celulosa o gel. La pequeña cantidad necesaria de muestra permite que las moléculas migren en discretas zonas o bandas. La electroforesis zonal de biomoléculas

cargadas, generalmente se lleva a cabo en una disolución estabilizada con un medio que sirve de soporte.

Electroforesis en papel

La muestra se aplica sobre una tira de papel de filtro humedecido con una disolución tampón, bien en el centro o en cualquiera de los extremos del papel, dependiendo de las sustancias a separar y del pH del tampón. Los extremos de la tira se sumergen en dos recipientes separados que contienen la disolución tampón y en los que se hallan colocados los electrodos. Se conectan los electrodos a una fuente de tensión continua y se aplica una diferencia de potencial durante el tiempo adecuado. Al aplicar una corriente directa, las moléculas cargadas de la mezcla emigran hacia los electrodos de polaridad opuesta formando bandas en el papel. La velocidad de emigración de una molécula, depende preferentemente de su carga. Completada la electroforesis, se desconecta la fuente de tensión y se secan las tiras sobre una superficie, limpia, seca y lisa (cristal, azulejo, etc...).

El revelado se realiza empleando los mismos métodos que los utilizados en cromatografía sobre papel, mediante la acción de los colorantes adecuados.

La electroforesis y la cromatografía en papel tienen ciertas similitudes. Sin embargo, mientras que la electroforesis separa las moléculas fundamentalmente en función de su carga, la cromatografía lo hace en base a una amplia gama de características (ejemplos, solubilidad en la cromatografía de reparto, polaridad en la de adsorción, carga en la de intercambio iónico, etc.).

La electroforesis en papel se emplea principalmente en la separación de sustancias de bajo peso molecular como aminoácidos y péptidos. La difusión que se produce puede disminuirse aumentando la diferencia de potencial entre los electrodos con lo que se reduce el tiempo de desarrollo. Este tipo de electroforesis se denomina de •alto voltaje. El revelador para localizar las sustancias sería la Ninhidrina en el caso de péptidos y aminoácidos.

Las electroforesis en papel también pueden hacerse en tiras de acetato de celulosa, que son químicamente más homogéneas y tienen la ventaja de ser transparentes, con lo que las sustancias a separar, una vez tenidas o reveladas, pueden cuantificarse por densitometría. Es muy útil en los laboratorios clínicos por su fácil manipulación y su rápido desarrollo.

La principal aplicación es la separación de proteínas del suero, conociéndose el resultado como proteinograma. Las fracciones proteicas del suero que se separan mediante este tipo de electroforesis son la albumina y las globulinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β y γ .

El acetato de celulosa se utiliza también para separar lipoproteínas. El resultado obtenido se denomina lipidograma. Las fracciones lipoproteicas son denominadas β , pre- β y γ . El tampón más usado es el veronal, a pH 8,6. La separación se realiza de forma análoga a la de proteínas y se produce en unos 30 minutos. Las lipoproteínas, una vez separadas, se localizan tiñéndolas con colorantes que se unen a la fracción lipídica, como "Negro Sudan" o "Ciba 7B Fat Red".

Electroforesis análogas a las de proteínas y lipoproteínas, utilizando como soporte el acetato de celulosa, se han aplicado también para la separación de isoenzimas de la lactato deshidrogenasa y la creatin-quinasa.

Electroforesis en gel

Un gel es un estado intermedio entre el sólido y el líquido. Este tipo de electroforesis se halla entre los métodos más resolutivos y convenientes empleados en la separación de macromoléculas. Los geles de uso más generalizado son: poliacrilamida y agarosa. Estos poseen poros de diferentes dimensiones moleculares que delimitan la velocidad de traslado y moléculas trasladadas durante el proceso electroforético. De esta forma, la separación no se produce solo por las diferentes cargas de las moléculas, sino también por las diferencias de tamaño. Los geles están formados por un reticulado de polímeros (constituyendo una red enmarañada) y el líquido intersticial en el que se encuentra inmerso esta red.

Existe una gran variedad de tipos de electroforesis en gel, que se pueden agrupar en dos categorías:

- Electroforesis en gel en una dimensión (continuo o discontinuo)
 - PAGE-nativa
 - SDS-PAGE
 - Isoelectroenfoque

- Electroforesis en gel en dos dimensiones (bidimensional)

Según las aplicaciones u objetivos que se pretendan conseguir en una práctica o experimento, se utilizara un tipo u otro de electroforesis en gel. Los geles discontinuos mejoran la resolución de la electroforesis pues se consigue agudizar las bandas en gran medida por el uso de esta técnica conocida como electroforesis a pH discontinuo que precisa de dos geles y dos tampones diferentes.

La PAGE-nativa se utiliza para separar proteínas en condiciones no desnaturalizantes, por tanto, en función de la carga intrínseca de las mismas. La SDS-PAGE es muy útil para calcular el peso molecular de una proteína concreta ya que separa las proteínas según su tamaño. El isoelectroenfoque es un tipo de PAGE en una dimensión que se basa en la separación de moléculas de acuerdo a sus diferentes puntos isoeléctricos.

La electroforesis en gel en dos dimensiones combina el isoelectroenfoque (primera dimensión) con la SDS-PAGE (segunda dimensión). Es una técnica muy resolutiva, y el mejor método analítico para separar proteínas que existe hoy en día.

❖ *Electroforesis capilar*

Aunque la electroforesis en gel en sus diversas formas resulta un método común y efectivo para la separación de moléculas, el proceso de separación puede durar varias horas, siendo difícil de cuantificar y automatizar.

La técnica aquí presentada se lleva a cabo en el interior de tubos capilares (1-10 μm de diámetro). Estos capilares disipan el calor rápidamente permitiendo la aplicación de campos eléctricos elevados, reduciendo así los tiempos de separación.

7.4. Materiales

- | | |
|--|--|
| ✓ Pipetas de 1–5 ml. | ✓ Vasos de precipitado. |
| ✓ Micropipeta de 25–1000 μL . | ✓ Tiras de papel especial (Whatman 1, 3, etc.) de filtro o de acetato de celulosa. |
| ✓ Puntas desechables | |

7.5. Equipos

- ✓ Sistema de electroforesis.
- ✓ Fotodensitómetro
- ✓ Agitador orbital.

7.6. Sustancias

- ✓ Agua destilada
- ✓ Soluciones amortiguadoras: Tris glicina 50 mol/L, pH 8.3 (ver anexo).
- ✓ Solución patrón de albumina 2 mg/mL
- ✓ Suero o plasma sanguíneo.
- ✓ Marcador de corrida: Azul de Bromofenol 3 mg/mL
- ✓ Colorantes.
- ✓ Decolorantes

Preparación de los reactivos:

Tampón Tris glicina 50 mol/L, pH 8.3: Pesar tres gramos de Tris (Tris(hidroxiamino)-aminometano) y 14.413 g de glicina y completar en un balón volumétrico de 1000 mL.

Solución de colorante: Azul de Coomassie R-250 al 0.25% en Metanol: Ácido acético: agua 50%:10%:39.75%.

Solución de decolorante: Mezclar 50 mL de metanol con 10 mL de agua destilada y adicionar 40 mL de ácido acético al 5%.

Solución patrón de Albumina 2 mg/mL.

7.7 Procedimiento

- Colocar una solución tampón en una cubeta, teniendo cuidado de igualar los volúmenes de los dos compartimentos del electrodo.
- Las tiras de acetato de celulosa deben ser sumergidas en la solución tampón durante al menos 10 minutos y como máximo 24 horas. Con la ayuda de unas pinzas, eliminar las tiras de acetato de celulosa de la solución tampón.
- Perforar una esquina de la tira de acetato de celulosa para indicar la polaridad.
- En la parte opaca de la tira de celulosa, marcar un origen o una línea de aplicación de las muestras con lápiz rojo, asegurándose de que el lado perforado esta hacia abajo y hacia la derecha. Marque el origen cerca de 4 cm de la extremidad que se sumergirá en el compartimiento catódico.
- Colocar las tiras bien estiradas rectas en el apoyo, de tal manera que cada extremidad toque la solución tampón. Observar que cada lado perforado deberá permanecer en el polo negativo (cátodo). Como se realizará una corrida en tampón alcalino, las proteínas deberán estar cargadas negativamente y por tanto migrarán hacia el polo positivo (ánodo). Por conveniencia, el polo negativo es de color negro y el positivo de color rojo.
- Adicionar a cada muestra 2 μ L de marcador de corrida (azul de bromofenol).
- Cerrar la cámara de electroforesis y conectar a una fuente de 200 V, dejando correr la electroforesis por 45 a 60 minutos. La corriente aplicada deberá ser de 1 a 1,5 mA/tira.
- Después de la corrida, desconectar la cámara de la fuente de poder.
- Remover las tiras y realizar la coloración con Azul de Coomassie.
- Sumergir las tiras en la solución colorante por 15 minutos, agitando lentamente en el agitar orbital.
- Lavar las tiras 3 veces con una solución de acético al 5%.
- Sumergir las tiras en la solución decolorante, para remover el exceso de colorante. Se deja sólo el que ha sido fijado por las proteínas.
- Cuantificar por densitometría.

- La cuantificación de las bandas de proteína de suero o plasma puede ser realizada por densitometría desde que la tira de acetato de celulosa sea debidamente transparente como sigue:
- Sumergir una tira por 30 segundos en metanol para completa deshidratación. En seguida, colocar la tira en una mezcla Glicerol: metanol: ácido acético 1:85:14 por un minuto. Depositar la tira sobre una placa de vidrio. Secar en una estufa a 55°C, para ser usada en el densímetro.

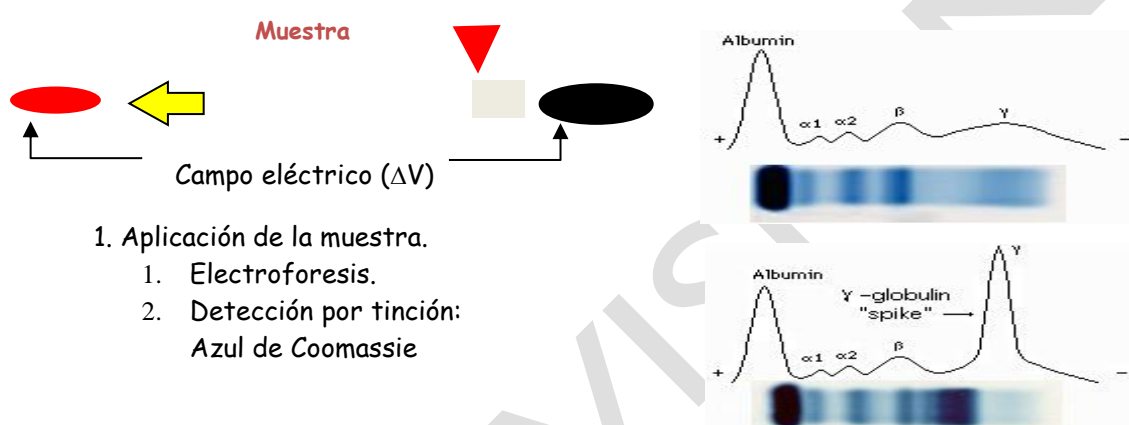


Fig.1. Perfil electroforético de la Albúmina.[tomado de]

7.8. Disposición de los residuos

Tabla. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

Sustancia o Mezcla	Recipiente rotulado
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos de soluciones acuosas (Buffer)

7.9 Responda las siguientes preguntas:

- ¿Para qué polo migra cada fracción proteica de suero o plasma?. Explique.
- ¿Qué factores afectan la separación electroforética de proteínas?.

- c ¿Qué diferencia espera obtener en el perfil electroforético de proteínas de plasma y de suero?.

Referencias bibliográficas

- 1) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica: aulas práticas. 6. ed. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2001. 178 p.
- 2) Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
- 3) Skoog D. A., West D. M. y Holler F.J., "Fundamentos de Química Analítica". Ed. Reverte. Barcelona. 1997

8. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ADN DE LA CEBOLLA

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No se presenta riesgos.

8.1. Objetivos

- ❖ Purificar el DNA de células vegetales.
- ❖ Observar la estructura fibrilar del ADN.

8.2. Conceptos relacionados

Ácido desoxirribonucleico, ácidos nucleicos, propiedades físicas de ácidos nucleicos.

8.3. Fundamento teórico

El ácido desoxirribonucleico (**ADN**), frecuentemente abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. El papel principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información. Muchas veces, el ADN es comparado con un plano o una receta, o un código, ya que contiene las instrucciones necesarias para construir otros componentes de las células, como las proteínas y las moléculas de ARN. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes, pero las otras secuencias de ADN tienen propósitos estructurales o toman parte en la regulación del uso de esta información genética.

Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Un polímero es un compuesto formado por muchas unidades simples conectadas entre sí, como si fuera un largo tren formado por vagones. En el ADN, cada vagón es un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser adenina→A, timina→T, citosina→C o guanina→G) y un grupo fosfato que actúa como enganche de cada vagón con el siguiente. Lo que distingue a un vagón (nucleótido) de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases.

La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena (el ordenamiento de los cuatro tipos de vagones a lo largo de todo el tren) es la que codifica la información genética: por ejemplo, una secuencia de ADN puede ser ATGCTAGATCGC. En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por unas conexiones denominadas puentes de hidrógeno.

Componentes

Estructura de soporte: La estructura de soporte de una hebra de ADN está formada por unidades alternas de grupos fosfato y azúcar. El azúcar en el ADN es una pentosa, concretamente, la desoxirribosa.

- **Ácido fosfórico:**

Su fórmula química es H_3PO_4 . Cada nucleótido puede contener uno (monofosfato: AMP), dos (difosfato: ADP) o tres (trifosfato: ATP) grupos de ácido fosfórico, aunque como monómeros constituyentes de los ácidos nucleicos sólo aparecen en forma de nucleósidos monofosfato.

- **Desoxirribosa**

Es un monosacárido de 5 átomos de carbono (una pentosa) derivado de la ribosa, que forma parte de la estructura de nucleótidos del ADN. Su fórmula es $C_5H_{10}O_4$. Una de las principales diferencias entre el ADN y el ARN es el azúcar, pues en el ARN la 2-desoxirribosa del ADN es reemplazada por una pentosa alternativa, la ribosa.²⁵ Las moléculas de azúcar se unen entre sí a través de grupos fosfato, que forman enlaces fosfodiéster entre los átomos de carbono tercero (3', «tres prima») y quinto (5', «cinco prima») de dos anillos adyacentes de azúcar. La formación de enlaces asimétricos implica que cada hebra de ADN tiene una dirección. En una doble hélice, la dirección de los nucleótidos en una hebra (3' → 5') es opuesta a la dirección en la otra hebra (5' → 3'). Esta organización de las hebras de ADN se denomina antiparalela; son cadenas paralelas, pero con direcciones opuestas. De la misma manera, los extremos asimétricos de las hebras de ADN se denominan extremo 5' («cinco prima») y extremo 3' («tres prima»), respectivamente.

- **Bases nitrogenadas:**

Las cuatro bases nitrogenadas mayoritarias que se encuentran en el ADN son la adenina (A), la citosina (C), la guanina (G) y la timina (T). Cada una de estas cuatro bases está unida al armazón de azúcar-fosfato a través del azúcar para formar el nucleótido completo (base-azúcar-fosfato). Las bases son compuestos heterocíclicos y aromáticos con dos o más átomos de nitrógeno, y, dentro de las

bases mayoritarias, se clasifican en dos grupos: las bases púricas o purinas (adenina y guanina), derivadas de la purina y formadas por dos anillos unidos entre sí, y las bases pirimidínicas o bases pirimídicas o pirimidinas (citosina y timina), derivadas de la pirimidina y con un solo anillo. En los ácidos nucleicos existe una quinta base pirimidínica, denominada uracilo (U), que normalmente ocupa el lugar de la timina en el ARN y difiere de ésta en que carece de un grupo metilo en su anillo. El uracilo no se encuentra habitualmente en el ADN, sólo aparece raramente como un producto residual de la degradación de la citosina por procesos de desaminación oxidativa.

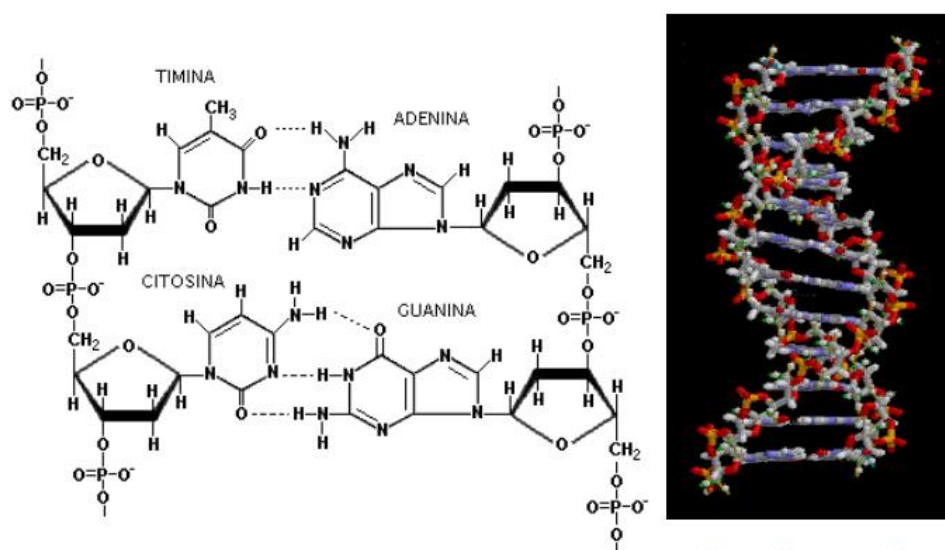


Figura 1. Estructura química del DNA.

8.4. Materiales

- ✓ Una cebolla grande (fresca).
- ✓ Vaso de precipitado
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Varilla de vidrio.
- ✓ Micropipetas automáticas
- ✓ Puntas desechables
- ✓ Algodón

8.5. Sustancias

- ✓ Agua desionizada
- ✓ EDTA
- ✓ Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1%.
- ✓ Difenilalanina
- ✓ Etanol al 95%
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)

Preparación de los reactivos:

Soluciones Stock y buffer

1. Solución de lisis

Mezclar 0.1% de SDS con una solución 25mM de EDTA, pH=8.

2. Reactivo de difenilamina

Disolver 1g de Difenilamina en 100 mL de ácido acético glacial y adicionar 2,75 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

8.6 Procedimiento

1. Descascarar una cebolla de tamaño medio.
2. Rajar la cebolla, pesar 50 g y adicionar 100 mL de solución de lisis.
3. Mezclar a temperatura ambiente por 10 a 20 minutos.
4. Filtrar la suspensión en un embudo que contenga algodón, recogiendo el filtrado en una probeta. Anotar el volumen.
5. Transferir 4 mL del filtrado y colocar en un tubo de ensayo. Adicionar 8 mL de etanol al 95% (se debe adicionar gota a gota) procurando no mezclar ambas soluciones. Observar la formación de un precipitado blanco. Con la ayuda de una varilla de vidrio enrollar el precipitado.
6. Transferir el material de vidrio a otro tubo de ensayo y adicionar 0.5 mL de agua. A esta solución adicionar 1.5 mL de reactivo de difenilamina.
7. En otro tubo de ensayo adicionar 0.5 mL de agua y 1.5 mL de difenilamina. Colocar los dos tubos a baño de María fuerte por 10 minutos. Comparar los resultados obtenidos.
8. El volumen restante del filtrado debe ser transferido a un vaso de precipitado y adicionar dos volúmenes de etanol al 95%. El precipitado obtenido se transfiere a un tubo de ensayo.
9. Disolver el precipitado en 5 mL de agua con ayuda de la varilla de vidrio. Dividir esta solución en dos tubos para observar las diferencias de viscosidad en las diferentes condiciones.

10. Pipetear la solución de uno de los tubos con una pipeta graduada de 0.2 mL y cronometrar el tiempo de flujo de salida (dejar caer libremente el líquido por gravedad) de la solución hasta extraer 0.15 mL.
11. El otro tubo debe ser calentado en baño de María por 10 minutos. Después del período de calentamiento, proceder como en el ítem 10, anotando el tiempo de flujo.
12. Enfriar esta solución en hielo por 15 minutos y repetir el procedimiento 10.
13. Interpretar los resultados.

8.7. Disposición de los residuos

Tabla 1. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos acuosos (Buffer)

8.8 Responda las siguientes preguntas:

- a ¿Cuál es la función de los dos componentes de la solución de lisis ?. Explique.
- b ¿A qué se debe la diferencia de viscosidades del DNA observada en los experimentos?.

Referencias bibliográficas

- 1) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica: aulas prácticas. 6. ed. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2001. 178 p.
- 2) Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
- 3) Lewin, B. Genes VI. Oxford: Oxford University Press, 1997. Pág: 1260.

9. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS EN GEL DE AGAROSA

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No se presenta riesgos.

9.1. Objetivos

- ❖ Observar el perfil de migración de diferentes formas de DNA en electroforesis de gel de agarosa.
- ❖ Familiarizarse con métodos de separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa

9.2. Conceptos relacionados

Ácidos nucleicos, electroforesis, gel de agarosa, marcadores de peso molecular, plásmidos.

9.3. Fundamento teórico

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos. Existen muchos tipos de electroforesis, que se engloban en dos categorías fundamentales:

Electroforesis de frente móvil.

-Electroforesis de zona.

Actualmente, sólo se utiliza la electroforesis de zona, en la cual la muestra se desplaza sobre un soporte sólido, como papel de filtro, celulosa o gel (agarosa, acrilamida...) y los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas, también llamadas zonas.

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos

nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular.

El DNA problema que se va a analizar mediante electroforesis en gel de agarosa en esta práctica es DNA plasmídico. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y de pequeño tamaño (entre dos y varios cientos de kilobases) que se encuentran en muchas especies bacterianas. Se caracterizan porque se replican de manera independiente del DNA cromosómico bacteriano, tienen su propio origen de replicación, y no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyan a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos. Una determinada célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar un número variable de los mismos. Algunas clases de plásmidos poseen la propiedad conocida como “replicación relajada”, esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Se han desarrollado un gran número de métodos para la purificación de DNA plasmídico de bacterias y todos ellos implican invariablemente tres pasos:

- a) Crecimiento de la estirpe bacteriana portadora en medio de cultivo
- b) Recogida y lisis de las bacterias
- c) Purificación del DNA plasmídico

El método utilizado para la obtención de plásmido en esta práctica se denomina lisis alcalina y se basa en la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante alcalinización con NaOH y adición

de SDS (detergente), en condiciones en las que el DNA plasmídico permanece próximo a su estructura nativa, debido principalmente a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada.

Al neutralizar el medio y añadir una alta concentración de sal (acetato potásico), se produce la precipitación de gran parte de las proteínas debido al tratamiento con SDS y a la alta concentración de sales. También precipita el DNA cromosómico, probablemente porque se producen reasociaciones al azar entre las diferentes regiones de este DNA y así se forman agregados insolubles. Por el contrario, no precipita el DNA plasmídico, que queda en el sobrenadante. Este DNA puede ser analizado y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa. En cada una de las calles del gel donde se cargue el DNA plasmídico, veremos tres bandas de distinto tamaño que corresponderán a las tres formas principales con las que migra el mismo en función de su grado de enrollamiento. Son las formas circular, enrollada y superenrollada que migran con menor a mayor velocidad, respectivamente, en una electroforesis.

9.4. Materiales

- ✓ Matrices pequeños.
- ✓ Pipetas de vidrio de 5 mL.
- ✓ Tubos eppendorf de 1,5 mL.
- ✓ Micropipetas automáticas
- ✓ Puntas desechables

9.5. Equipos

- ✓ Centrifuga eppendorf de sobremesa.
- ✓ Microondas o placa calefactora.
- ✓ Equipo de electroforesis (cámara de electroforesis, soporte, peine, fuente de alimentación).

9.6. Sustancias

- ✓ Agua desionizada
- ✓ Acrilamida 30%
- ✓ Bisacrilamida 0.8%
- ✓ Tris-HCl, 1.5 M, pH=8.8
- ✓ Glicina
- ✓ Glicerol
- ✓ 2-Mercaptoetanol
- ✓ Tetrametiletilendiamina (TEMED)

- ✓ Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 y 20%.
- ✓ Persulfato de amonio 10%
- ✓ Solución Colorante.
- ✓ Solución Decolorante.
- ✓ Marcador de peso molecular: Pageruler Unstead Protein

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Soluciones Stock y buffer

14. Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)

Pesar 14.6 g de Acrilamida (29.2 g/100 mL) y 0.4 g de Bis-acrilamida (0.8 g/100 mL) y aforar en un balón de 50 mL con agua desionizada. Filtrar y almacenar a 4 °C en la oscuridad (30 días como máximo).

15. SDS al 20 y 10% P/V.

Disolver 10 g de SDS y aforar en un balón de 100 mL con agua desionizada.

Disolver 20 g de SDS y aforar en un balón de 100 mL con agua desionizada.

16. Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

Disolver 27.23 g de Tris base y adicionar 80 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.8 con una solución de HCl 6N. Adicionar agua hasta 150 mL de agua desionizada y almacenar a 4 °C.

17. Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

Disolver 6 g de Tris base y adicionar 60 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.8 con una solución de HCl 6N. Adicionar agua hasta 100 mL de agua desionizada y almacenar a 4 °C.

9.7 Procedimiento

18. Realizar el montaje de electroforesis como se muestra en la figura.

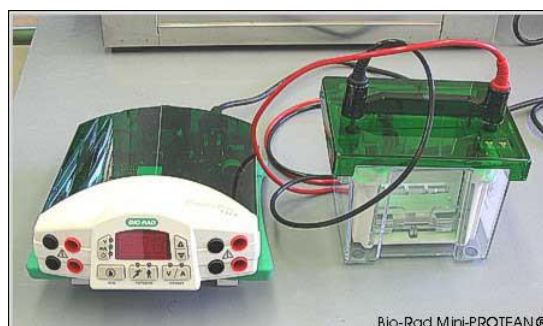


Figura 1. Equipo de electroforesis. Tomado de <http://www.bio-rad.com/>

19. Preparar 5.01 mL del gel siguiendo el orden y las cantidades descritas en la tabla:

Tabla 1. Componentes y volúmenes para el gel de separación.

GEL DE SEPARACIÓN	
Agua destilada	1.70
Acrilamida/Bis-acrilamida	2.00
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.25
SDS al 20%	0.025
Persulfato de amonio 10%	0.025
TEMED	0.010

20. Vierta el gel entre los vidrios y cubra con una capa de isopropanol al 60%, con el propósito de hacer más efectiva la polimerización.
21. Una vez polimerizado el gel de corrido lave con agua para retirar el isopropanol y porciones de acrilamida sin polimerizar.
22. Seque con papel de filtro y agregue 3.165 mL de gel de concentración de acuerdo a la tabla 2:

Tabla 2. Componentes y volúmenes para el gel de concentración.

GEL DE CONCENTRACIÓN	
Agua destilada	1.86
Acrilamida/Bis-acrilamida	0.45
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	0.75
SDS al 10%	0.030
Persulfato de amonio 10%	0.060
TEMED	0.010

23. Una vez terminada la polimerización saque el peine, limpie los pozos con papel de filtro.
24. Introduzca el montaje en la cámara de electroforesis y cubra con buffer de corrido. La composición de buffer de corrido se describe a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. Composición y concentración del buffer de separación.

BUFFER DE CORRIDO	
Tris base	0.3%
Glicina	1.44%
SDS	0.1%

25. Prepare las muestras mezclando 10 μ L del extracto de proteínas de interés con 10 μ L de buffer de carga, la composición y el buffer de carga se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Composición y concentración del buffer de carga para muestras.

BUFFER DE CARGA PARA MUESTRAS	
Tris-HCl 0.5 M	25%
Glicerol	20%
SDS al 10%	40%
2-Mercaptoetanol	10%
Azul de bromofenol	5%

26. Siembre en los pozos las muestras junto a 4 μ L de marcador de peso molecular
27. Aplique voltaje entre 80-110 V de acuerdo al frente de corrido.

28. Terminado el corrido transfiera el gel a la solución colorante de azul de Coomassie R250, deje colorear 30 minutos. La composición de la solución colorante.
29. Para observar las bandas, deje el gel en solución decolorante hasta que el gel decolore y se observen las bandas.
30. Posteriormente, escanear el gel y comparar las bandas con el carril I que corresponde al marcador de peso molecular.

9.8. Disposición de los residuos

Tabla 6. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Residuos acuosos (Buffer)
El residuo sólido del gel se debe envolver en papel aluminio y se debe desechar en el recipiente de residuos sólidos.	Residuos sólidos


a. Responda las siguientes preguntas:

- a ¿Cuál es el fundamento de la técnica de electroforesis ?. Explique.
- b ¿Cuál es la naturaleza bioquímica de la estructura de la agarosa?.
- c Indique las posibles aplicaciones de la técnica de electroforesis
- d Diferencie la utilización de Bromuro de etidio y de azul de bromofenol durante el proceso de coloración de DNA.

Referencias bibliográficas

- 1) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica: aulas prácticas. 6. ed. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2001. 178 p.
- 2) Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
- 3) Miller, MB. DNA technology in schools: a straightforward approach. Biotechnology education, v. 4, 1993. Págs:15-21.

10. CARBOHIDRATOS

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	

10.1. Objetivos

- ❖ Diferenciar las sustancias que contienen carbohidratos simples por medio de reacciones químicas.
- ❖ Demostrar que el almidón es un polisacárido compuesto por muchas moléculas de azúcares sencillos (glucosa).
- ❖ Identificar la presencia de azúcares reductores mediante la reacción de Fehling.

10.2. Conceptos relacionados

Carbohidrato, azúcares reductores, almidón.

10.3. Fundamento teórico

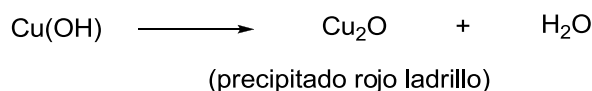
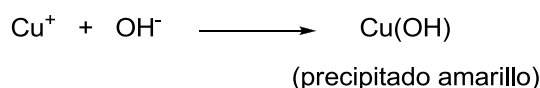
Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera. La mayoría pueden ser representados con la fórmula general $C_n(H_2O)_n$, por lo que se les conoce como hidratos de carbono. Gran parte de sus funciones biológicas dependen de su estructura química tan particular y versátil. Ellos son componentes fundamentales de muchos alimentos y su degradación durante el proceso de digestión genera la energía necesaria para las funciones vitales del organismo. Cuando se encuentran combinados con otras biomoléculas, dan origen a moléculas más complejas cuyas funciones pueden ser estructurales o de soporte celular y tisular, de comunicación entre células, de reconocimiento o de señalización. Químicamente se definen como polihidroxialdehídos o polihidroxiacetonas cíclicas o sustancias que luego de hidrolizarse dan origen a los mismos. Un carbohidrato que no puede ser hidrolizado en uno más simple es llamado monosacárido. Los monosacáridos más comunes son la glucosa, la fructosa, la galactosa y la manosa. Un carbohidrato que puede ser hidrolizado en dos moléculas de monosacáridos es llamado disacárido. Los más importantes

son la lactosa (presente en la leche), la sacarosa (presente en el azúcar común) y la maltosa. Por su parte, aquellos carbohidratos que pueden ser hidrolizados en varias moléculas de monosacáridos son llamados polisacáridos. Los más comunes son el almidón y la celulosa, éste último es componente estructural de las plantas. La determinación de glucosa es de importancia médica ya que niveles sanguíneos alterados pueden ser signo de una enfermedad metabólica común conocida como diabetes mellitus.

Algunos azúcares tienen la propiedad de oxidarse en presencia de agentes oxidantes suaves como el ion Fe^{3+} o Cu^{2+} . Esta característica radica en la presencia de un grupo carbonilo libre, el cual es oxidado y genera un grupo carboxilo. Por lo tanto, aquellos azúcares con un grupo carbonilo libre son llamados azúcares reductores y aquellos en los que el grupo carbonilo se encuentra combinado en unión glicosídica se conocen como azúcares no reductores. Existen varias reacciones químicas que permiten determinar si se está en presencia de un azúcar reductor o no. Algunas de ellas son, la prueba de Benedict, la prueba cualitativa de la glucosa oxidasa, la prueba de yodo para almidón e hidrólisis del almidón.

(i) Prueba de Benedict

Esta prueba se basa precisamente en la reacción o no de un azúcar con el ion Cu^{2+} . El reactivo de Benedict contiene soluciones de carbonato de sodio, sulfato de cobre, y citrato de sodio. El Na_2CO_3 confiere a la solución un pH alcalino necesario para que la reacción pueda llevarse a cabo. El citrato de sodio mantiene al ion Cu^{2+} en solución ya tiene la propiedad de formar complejos coloreados poco ionizados con algunos de los metales pesados. Con el cobre produce un complejo de color azul. Si se le agrega al reactivo una solución de azúcar reductor y se calienta hasta llevar la mezcla a ebullición, el azúcar en solución alcalina a elevadas temperaturas se convertirá en D-gluconato y su ene-diol, rompiéndose luego en dos fragmentos altamente reductores, los cuales con sus electrones expuestos, reaccionarán con el Cu^{2+} . Se obtiene entonces un azúcar oxidado y dos iones Cu^+ . Posteriormente el Cu^+ producido reacciona con los iones OH^- presentes en la solución para formar el hidróxido de cobre.

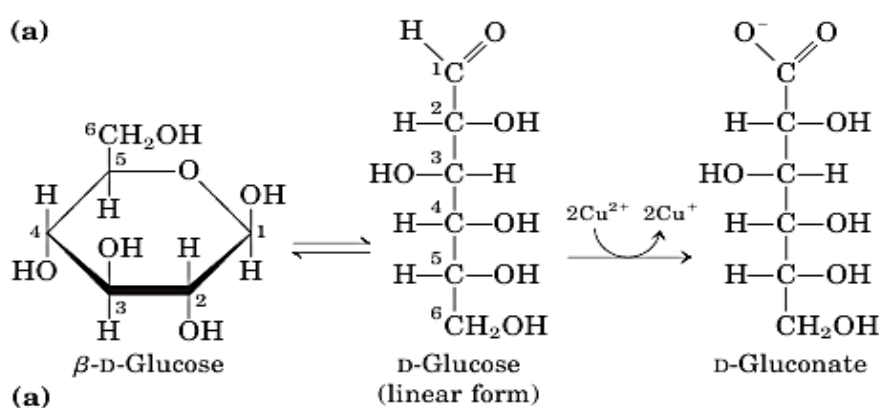


Esquema I. Reacción de la prueba de Benedict.

La aparición de un precipitado amarillo, anaranjado, o rojo ladrillo evidencia la presencia de un azúcar reductor.

(ii) Prueba cualitativa de la glucosa oxidasa

Este método es utilizado hoy en día para la determinación y cuantificación de glucosa en sangre y orina; vino a reemplazar a otros como la prueba de Benedict, debido a su mayor especificidad y sensibilidad. La prueba se basa el uso de una enzima llamada glucosa oxidasa que reconoce específicamente a una de las formas anoméricas de la D-glucosa, la forma beta glucopiranososa. Esta enzima, en presencia de glucosa, oxígeno y un amortiguador de pH, genera gluconolactona y peróxido de hidrógeno.



Esquema 2. Reacción de la prueba de la glucosa oxidasa. a) Oxidación del carbono anomérico de glucosa y otros azúcares es la base de la reacción de Fehling. b) Concentración de glucosa en sangre determinada por la medida de la concentración de H_2O_2 producido en la reacción catalizada por Glucosa oxidasa.

El peróxido de hidrógeno es a su vez sustrato de otra enzima, la peroxidasa, la cual en presencia de fenol y una amina aromática (en nuestro caso, la amino-4-antipirina) genera un compuesto de color rosado y agua. Por lo tanto, cuando el reactivo vira de incoloro a rosado, se demuestra la presencia de glucosa en la muestra.

(iii) Prueba de yodo para almidón

El polisacárido almidón está constituido de dos polímeros, amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida de largas cadenas lineales de glucosa unidas en enlace glicosídico alfa 1,4 (figura 1). Estas cadenas no poseen un tamaño determinado sino que pueden variar desde unos miles de unidades de glucosa hasta un millón. Por otro lado, la amilopectina posee, al igual que la amilosa, cadenas lineales de glucosa unidas en enlace alfa 1,4 pero además, posee una gran cantidad de ramificaciones, las cuales se presentan cada 24 a 30 residuos de glucosa y en enlace glicosídico alfa 1,6.

El almidón es la molécula de reserva energética en las plantas por excelencia. Debido a que muchos organismos superiores poseen las enzimas necesarias para su degradación, este polímero puede ser convertido durante el proceso de digestión en diferentes intermediarios metabólicos que generan energía. El glucógeno a su vez es la contraparte del almidón en el reino animal, con la diferencia de que esta molécula posee una mayor cantidad de ramificaciones que el almidón y es más compacta. La conformación de los enlaces alfa 1,4 presentes en estas moléculas causa que estos polímeros asuman una estructura helicoidal muy estrecha. La prueba del almidón es una prueba muy sencilla pero que todavía se utiliza para determinar la presencia de almidón en algunos alimentos. La prueba se basa en una reacción física y no química, en la cual el almidón reacciona con el yodo para formar un complejo de color azul intenso. Bajo las mismas condiciones, el glucógeno da una coloración café.

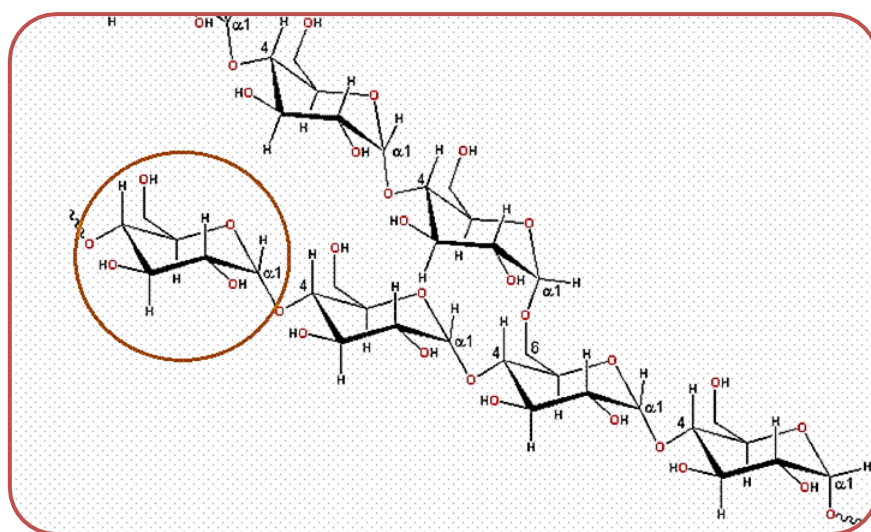


Figura 1. Estructura química del almidón.

(iv) Hidrólisis del almidón

Esta prueba tiene como objetivo demostrar que efectivamente los polisacáridos como el almidón están compuestos de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos. Como se mencionó anteriormente, el almidón está constituido de un solo monosacárido, la glucosa. Las propiedades del almidón son diferentes a las de la glucosa como se evidenciará mediante la hidrólisis del almidón para generar glucosa. Todos los polisacáridos son hidrolizados en sus constituyentes monosacáridos, por la acción de ácidos diluidos. Esta es una reacción gradual que puede observarse durante el tiempo de la sesión de laboratorio. Es por tanto recomendable que usted inicie el proceso de hidrólisis al comenzar la sesión de laboratorio y luego proceda con el resto de las pruebas. La hidrólisis del almidón se puede evidenciar con dos pruebas:

- Desaparición del color azul característico de la prueba del yodo.
- Aparición de glucosa, un azúcar reductor. La aparición de glucosa se evidenciará mediante la prueba de Benedict.

10.4. Materiales

- | | |
|------------------------------------|----------------------------|
| ✓ 1 Tubo de ensayo grandes (10 mL) | ✓ 1 balón aforado de 1 L |
| ✓ 10 Tubos de ensayo medianos | ✓ Micropipeta de 0.5-5 mL. |
| ✓ 2 Gradillas | ✓ Espátula |

✓ 7 Balón aforado de 1000 mL

✓ 1 placa de aglutinación

10.5. Sustancias

✓ Agua destilada

10.5.1. Prueba de Benedict

✓ Reactivo de Benedict: 100 g de Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro, 173 g de Citrato de sodio, 17,3 g de Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

✓ Soluciones de carbohidratos 0,1 mol/L

✓ Solución de almidón al 1%

10.5.2. Prueba cualitativa de la glucosa oxidasa

✓ Solución de glucosa/oxidasa: contiene glucosa oxidasa, peroxidasa, amortiguador y amino-4-antipirina.

✓ Soluciones de carbohidratos 0,1 mol/L, usados en la prueba anterior

✓ Solución de almidón al 1%, usado en la prueba anterior.

10.5.3. Prueba de yodo para almidón

✓ Solución de almidón al 1%, usado en las pruebas anteriores.

✓ Solución de yodo: 1 g de yodo, solución de KI al 2%

10.5.4. Hidrólisis del almidón

✓ Ácido clorhídrico (HCl) concentrado
✓ Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,4 mol/L

✓ Solución de yodo, usado en la prueba anterior.

✓ Reactivo de Benedict

10.6. Procedimiento

10.6.1. Prueba de Benedict

- Pesar 100 g de Na_2CO_3 anhidro y disolver en 200 mL de agua destilada hervida.
- Pesar 173 g citrato de sodio ($\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$) y disolverlo en 200 mL de agua destilada hervida.
- Pesar 17,3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y disolverlo en 300 mL de agua destilada hervida.

- Mezclar las tres soluciones cuando estén frías. Aforar a 1 L con agua destilada hervida.
- Preparar una solución 0.1 mol/L de cada uno de los siguientes carbohidratos glucosa, galactosa, lactosa, xilosa, fructosa, sacarosa y una solución al 1% de Almidón (La disolución del almidón se realiza en agua caliente).
- Rotular las soluciones.
- Adicionar 2,5 mL de reactivo de Benedict en un tubo de ensayo mediano (los tubos de ensayo grandes se usan en la prueba de hidrólisis del almidón).
- Repetir el paso anterior en 6 tubos más. Luego, a cada tubo, añadir 6 gotas de una de las soluciones de carbohidratos.
- Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Observar cualquier cambio de color durante el calentamiento.
- Tomar los tubos y ponerlos en una gradilla y después de un corto tiempo observar si se ha formado un precipitado, el cual puede ser rojo, anaranjado o verdoso.
- Observar si los resultados concuerdan con lo esperado teóricamente sobre carbohidratos reductores y en el informe dar explicación de ello.

10.6.2. Prueba cualitativa de la glucosa oxidasa

- Poner 3 gotas de solución de glucosa oxidasa/peroxidasa en siete depresiones de la placa de ensayos.
- Añadir una gota de glucosa a una depresión, una gota de fructosa a otra, etc. Observe las depresiones inmediatamente y anote los resultados. Vuelva a observar las depresiones y revise si existe algún cambio. Si se observa algún cambio luego de incubar por más tiempo las diferentes reacciones, en el informe se debe explicar a qué se debe este cambio y qué implicaciones podría tener este resultado.

10.6.3. Prueba de yodo para almidón

- En tres tubos medianos distribuir los reactivos como se indica en la tabla I.
- Agitar muy bien los tubos y notar la diferencia de color que se atribuye a la formación de un complejo entre el almidón y el yodo. Anotar el resultado.

- Colocar los tres tubos en un baño de agua caliente (70 °C) con cuidado, por 10 minutos y observar cualquier cambio de color. Anotar el resultado.
- Enfriar los tubos y observar nuevamente. Anotar el resultado.

Tabla I. Preparación de mezclas para la prueba de yodo.

<i>Tubo</i>		<i>Sustancia</i>		
<i>No.</i>	<i>Agua (mL)</i>	<i>Almidón al 1% (gotas)</i>	<i>Solución de yodo (gotas)</i>	
1	5	5	1	
2	5	1	1	
3	5	0	1	

10.6.4. Hidrólisis del almidón

- Poner 10 mL de una solución de almidón al 1% en un tubo de ensayo grande.
- Añadir 1 mL de HCl concentrado al tubo. Agitar bien y luego colocar el tubo en un baño de agua hirviendo con cuidado de no quemarse.
- Mientras el almidón se está hidrolizando (tarda de 1:30 h a 2 h aproximadamente), efectúe la prueba de coloración del yodo. Para ello, añada en otro tubo 5 mL de agua, una gota de la solución de yodo y 0,5 mL de la solución de almidón que tiene hidrolizando en el baño maría a ebullición. Anote el resultado de la prueba del yodo.
- Después de que la hidrólisis del almidón se haya llevado a cabo por 15 minutos, saque 0,5 mL del almidón que se está hidrolizando en el baño maría y repita la prueba del yodo cada 15 minutos. Continúe la hidrólisis hasta obtener una prueba de yodo negativa.
- Posteriormente y para confirmar la presencia de glucosa, efectúe la prueba de Benedict. Para ello, añada en un tubo 0.5 mL del almidón hidrolizado, 1 mL de NaOH 0,4 mol/L (para neutralizar el ácido) y 2,5 mL de reactivo de Benedict. Incubar por 8 minutos en agua hirviendo. Anotar y analizar los resultados. Utilice sus resultados del punto 1 (Prueba de Benedict) y del punto 2 (Prueba de yodo para almidón) para interpretar sus resultados.

10.7. Disposición de los residuos

Tabla 2. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Solución acuosa-colorantes

10.8. Consultar antes de la práctica

- ¿Qué otro reactivo se puede usar para análisis de azúcares reductores?
- ¿Por qué es necesario el citrato de sodio en el reactivo de Benedict?
- ¿Qué coloración es una prueba positiva para la glucosa oxidasa?
- ¿Por qué la prueba de la glucosa oxidasa es específica para la determinación de glucosa?
- ¿Qué tipo de enlaces es capaz de romper el HCl? ¿Por qué?

Referencias bibliográficas

- 1) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica: aulas práticas. 6. ed. Curitiba: Ed. Da UFPR, 2001. 178 p.
- 2) Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
- 3) Miller, MB. DNA technology in schools: a straightforward approach. Biotechnology education, v. 4, 1993. Págs:15-21.

II. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE LÍPIDOS

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	No tiene indicaciones de peligro

II.1. Objetivos

- ❖ Extraer y caracterizar la lecitina y el colesterol de yema de huevo.
- ❖ Determinar cualitativamente la presencia de colina, fosfatos y glicerol en un hidrolizado de lecitina.

II.2. Conceptos relacionados

Lípidos, Lectinas, colina, fosfatos y glicerol.

II.3. Fundamento teórico

Se llama **lípidos** a un conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Tienen como característica principal ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como el benceno.

Los lípidos forman un grupo de sustancias de estructura química muy heterogénea, siendo la clasificación más aceptada la siguiente:

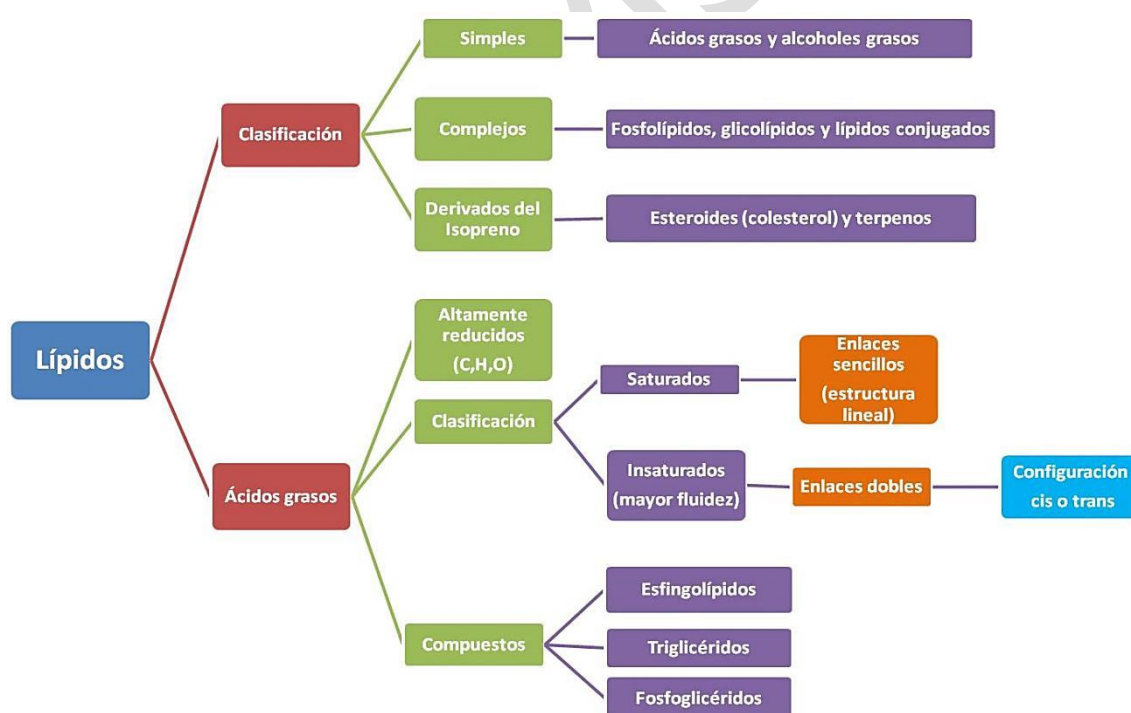
- **Lípidos saponificables:** Los lípidos saponificables son los lípidos que contienen ácidos grasos en su molécula y producen reacciones químicas de saponificación. A su vez los lípidos saponificables se dividen en:

Lípidos simples: Son aquellos lípidos que sólo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Estos lípidos simples se subdividen a su vez en: Acilglicéridos o grasas (cuando los acilglicéridos son

sólidos se les llama grasas y cuando son líquidos a temperatura ambiente se llaman aceites) y Céridos o ceras.

Lípidos complejos: Son los lípidos que además de contener en su molécula carbono, hidrógeno y oxígeno, también contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra biomolécula como un glúcido. A los lípidos complejos también se les llama lípidos de membrana pues son las principales moléculas que forman las membranas celulares: Fosfolípidos y Glicolípidos.

- **Lípidos insaponificables**: Son los lípidos que no poseen ácidos grasos en su estructura y no producen reacciones de saponificación. Entre los lípidos insaponificables encontramos a: Terpenos, Esteroides y Prostaglandinas. En el esquema I se muestra la clasificación general de los lípidos.

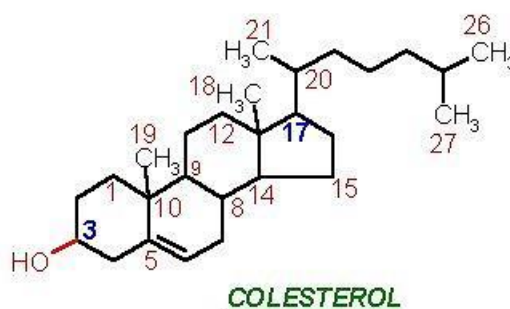


Esquema I. Clasificación general de los lípidos.

Principalmente cumplen las siguientes tres funciones:

- Función de **reserva energética**: Los lípidos son la principal fuente de energía de los animales ya que un gramo de grasa produce 9,4 kilocalorías en las reacciones metabólicas de oxidación, mientras que las proteínas y los glúcidos sólo producen 4,1 kilocalorías por gramo.
- Función **estructural**: Los lípidos forman las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Además recubren y proporcionan consistencia a los órganos y protegen mecánicamente estructuras o son aislantes térmicos como el tejido adiposo.
- Función **catalizadora**, hormonal o de mensajeros químicos: Los lípidos facilitan determinadas reacciones químicas y los esteroides cumplen funciones hormonales.

El colesterol es una grasa presente en todas las células del organismo. Se presenta en altas concentraciones en la médula espinal, páncreas y cerebro pero se sintetiza principalmente en el hígado y en el intestino delgado. Aproximadamente el 50% de las necesidades de colesterol son sintetizadas en el hígado mientras que el resto se obtiene de los alimentos de origen animal presentes en la dieta.



Esquema 2. Molécula de colesterol.

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por los distintos ciclos y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula hidrofóbica que al igual que otros lípidos es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo, acetona y éter. Considerando

lo anterior, cualquier método de extracción de lípidos requiere utilizar mezclas de solventes orgánicos que permitan solubilizar todos los lípidos y precipiten proteínas e hidratos de carbono para su mejor separación.

Los organismos mamíferos obtienen colesterol a través de dos vías:

- Vía exógena o absorción de colesterol contenido en los alimentos. El colesterol se encuentra exclusivamente en alimentos de origen animal, mayoritariamente en la yema de huevo, hígado, lácteos, cerebro (sesos) y músculo esquelético (carnes rojas).
- Vía endógena o síntesis de colesterol en las células animales a partir de su precursor, el acetato, en su forma activada acetil-coenzima A.

Un huevo posee una alta densidad de colesterol: aproximadamente 213 gramos por unidad, que se encuentran en la yema. Según antiguas recomendaciones para la población sana en general, sólo deberían consumirse tres huevos a la semana como máximo. Pero ahora se sabe que el colesterol dietario, por ejemplo el contenido en los huevos, no afecta en gran medida al colesterol sanguíneo en personas sanas, dado que no es el principal responsable de ese aumento.

Más aun, el huevo posee la ventaja de tener mayor porcentaje de ácidos grasos poli y monoinsaturados y, por ende, más grasas insaturadas que saturadas. Estas últimas constituyen uno de los factores principales del aumento del colesterol en sangre, pero los huevos las poseen en escasa cantidad. Específicamente, un huevo contiene 1,5 gramos de grasas saturadas y de 2,5 a 3 gramos de grasas insaturadas. Pero además, las grasas monoinsaturadas contribuyen a elevar los lípidos de alta densidad (HDL), también llamado "colesterol bueno".

El colesterol es el principal esteroide del organismo humano y precursor de todos los demás esteroides corporales. Se encuentra formando parte de membranas celulares, lipoproteínas, ácidos biliares y hormonas esteroideas.

El colesterol puede extraerse de muestras biológicas con cloroformo, etanol caliente, éter dietílico, acetona, y otros solventes orgánicos. Es común la práctica de usar una mezcla de solventes orgánicos en su extracción. Cuando está inmerso en agua el colesterol se hincha y

forma una emulsión. Al contrario de otros lípidos el colesterol no está sujeto a la precipitación por agentes alcalinos.

Entre los fosfoglicéridos más comunes, tenemos a los tres derivados del ácido fosfatídico, a saber: Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. A los fosfatidilcolina se les conoce con el nombre genérico de lectinas. Existen varias lectinas dependiendo de los dos ácidos grasos que contengan esterificados en carbono alfa y beta del glicerol.

Las lectinas son moléculas polares que existen en formas de sales internas o zwitteriones, ya que contienen la carga negativa del ácido fosfórico, y la carga positiva del grupo trimetilamino de la colina. El pH isoelectrico de una lectina pura es generalmente de 6.7, lo cual concuerda con su estructura anfótera.

Las lecitinas puras son sustancias blancas de aspecto grasoso, que cuando se exponen a la luz y el aire toman una coloración café, debido a la autooxidación y descomposición. Son solubles en los solventes ordinarios de las grasas, excepto en acetona. Esta propiedad se emplea para su aislamiento. Son higroscópicas y se mezclan bien con el agua formando soluciones coloidales nebulosas.

La identificación de la lecitina puede hacerse por saponificación, para separar los ácidos grasos y su hidrólisis para separar la colina.

11.4. Materiales

- | | |
|---------------------------------|----------------------|
| ✓ Yema de huevo cocida | ✓ Erlenmeyer |
| ✓ Mortero | ✓ Varilla de vidrio. |
| ✓ Manta de calentamiento | ✓ Pipetas |
| ✓ Vaso de precipitado de 100 mL | ✓ Probeta de 25 mL |
| ✓ Balanza | ✓ 1 Tubo de ensayo |
| ✓ Embudo | ✓ Papel de filtro |

11.5. Sustancias

- ✓ Mezcla etanol:éter 2:1
- ✓ Mezcla Cloroformo:etanol 2:1
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado
- ✓ Ácido molibdato
- ✓ Ácido ascórbico 1 mg/mL recién preparado.
- ✓ Anhídrido acético

11.6. Procedimiento

- Pesar media yema de huevo cocido.
- Adicionar 20 mL de una mezcla de etanol:éter 2:1. Macere en un mortero, deje en reposo 10 minutos con agitación ocasional.
- Filtrar la solución. El filtrado recogerlo en un vaso de precipitado de 100 mL y el residuo guardarlo para una segunda extracción.
- Evapore el filtrado en baño de María usando una manta de calentamiento. Pesar los lípidos totales.
- Posteriormente, disolver los lípidos totales en 5 mL de éter, adicionar a esta solución 15 mL de acetona. El precipitado obtenido es el contenido de lecitina en la yema. Aglomere el precipitado de Lecitina. Decante y filtre de nuevo.
- Pese el precipitado de Lecitina y el sobrenadante (Triglicéridos + colesterol), evaporar, pesar y guardar para el análisis de colesterol.

11.6.1 Identificación de colesterol

Reactivo de Liberman Burchard

- Tome 2 mL del sobrenadante del paso 1 en un tubo de ensayo y añada 10 gotas de anhídrido acético y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, la aparición de una coloración verde es indicadora de la presencia de colesterol.

Reacción de Salkowski

- Mida 1 mL del sobrenadante del paso 1 en un tubo de ensayo, incline el tubo y deslice por su pared interna un volumen igual de ácido sulfúrico concentrado, cuidando que los líquidos no se mezclen. Observe la formación de un anillo coloreado en la interfase.

Después de pesado el precipitado de **lecitina**, disuélvalo nuevamente con 10 mL de una mezcla de etanol-éter 2:1 y realice las siguientes pruebas:

Identificación de fostatos

Tome 1 mL del filtrado y adicione 1 mL de ácido molíbdico, agite, deje 3 minutos en reposo. Adicione 1 mL de solución de ácido ascórbico observe la formación de un color azul.

Detección de colina

Tome 1 mL de filtrado y caliente suavemente en un mechero o en un baño de agua hirviendo. La trimetilamina liberada se caracteriza por un olor a pescado.

Identificación de glicerol

Tome 2 mL de filtrado + 2 mL de agua de bromo. Calentar en vitrina para expulsar el exceso de bromo. Tomar 0,4 mL de esta solución + 0,1 mL de solución de naftol al 5% en etanol, agitar. Adicionar 40 gotas de ácido sulfúrico. Calentar 2 minutos en baño maría, enfriar. Observar la aparición de coloración verde.

11.7. Disposición de los residuos

Tabla 2. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

Sustancia o Mezcla	Recipiente rotulado
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Solución acuosa-colorantes

11.8. Consultar antes de la práctica

- ¿Es saponificable el colesterol?. Argumente su respuesta.
- ¿Cuáles deben ser los valores promedio de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL)?. ¿Son los mismos para todas las edades?
- ¿Cuáles son las funciones del colesterol en los humanos?
- ¿De cuáles compuestos es el colesterol un precursor?
- En qué órgano y a partir de que compuesto se sintetiza el colesterol en los humanos?

Referencias bibliográficas

- 4) Bohinski, R.C. Bioquímica. 1991. Editorial Addison-wesley. Ed. Iberoamericana.
- 5) Nelson, D.L., Cox, M. M. Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Capítulo 3 (2006).
- 6) Stryer, L. Bioquímica. 1.995. Editorial Reverté, Barcelona

EN REVISIÓN

12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA EXTRAÍDA DE HOJAS DE PLANTA (PALMA AFRICANA) Y SU INHIBICIÓN POR EFECTO DE LA TEMPERATURA

Tipo de práctica:	Duración:	Indicaciones de peligro:
Grupal (2 personas)	4 horas	    

12.1. Objetivos

- ❖ Extraer en solución la enzima peroxidasa y cuantificar su actividad a diferentes diluciones.
- ❖ Determinar el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la peroxidasa.

12.2. Conceptos relacionados

Enzimas, peroxidasa, actividad enzimática.

12.3. Fundamento teórico

En Bioquímica, se llaman **enzimas** las sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible (si bien no pueden hacer que el proceso sea más termodinámicamente favorable). En estas reacciones, las moléculas sobre las que actúa la enzima en el comienzo del proceso son llamadas sustratos, y estas los convierten en diferentes moléculas, los productos.

Las propiedades de las enzimas se derivan de su estructura proteica, siendo la principal propiedad su capacidad catalítica. La especificidad y estabilidad de las enzimas están también determinadas por su condición de proteínas. Así tenemos:

• Estabilidad

La capacidad catalítica de una enzima depende de la manutención de su estructura nativa. Dicha configuración es la resultante de muchas fuerzas de interacción. Los cambios

ambientales pueden debilitar estas interacciones alterando la estructura tridimensional nativa ocasionando la pérdida total o parcial de su funcionalidad biológica

La desnaturalización se entiende como cualquier proceso que altere la estructura tridimensional nativa de una enzima que conlleva a la pérdida de la actividad. Dependiendo de la magnitud del agente desnaturalizante, puede verse afectada su estructura cuaternaria (si existe), terciaria o secundaria. La pérdida de la estructura cuaternaria es frecuentemente reversible, pudiéndose recobrar la actividad catalítica, por el contrario la pérdida de la estructura terciaria es frecuentemente irreversible y lleva asociada una pérdida total o parcial de la actividad; la alteración de la estructura secundaria es irreversible, provocando un efecto de coagulación y la inactivación total de la enzima.

Las enzimas son catalizadores muy sensibles a la temperatura. Un aumento del nivel térmico se traduce en un aumento de la energía vibracional que puede provocar la ruptura de puentes de hidrógeno y la destrucción de interacciones apolares.

La fuerza iónica del medio afecta la estabilidad de la enzima produciéndose, a bajos valores de fuerza iónica, una disminución de las interacciones enzima-solvente y un incremento de las interacciones iónicas en el interior de la cadena que pueden desestabilizar su estructura.

El pH también afecta fuertemente la estabilidad de la enzima. La carga de los residuos aminoácidos de la proteína depende de la concentración de protones en el medio. Valores de pH bajo o sobre el punto isoelectrico provocan la acumulación de cargas ya sean positivas o negativas que pueden ocasionar la desestabilización de la estructura de la enzima debido a las fuerzas de repulsión.

- **Actividad**

La capacidad catalítica o actividad es la propiedad esencial de una enzima. Desde un punto de vista termodinámico la enzima, como catalizador, actúa disminuyendo la magnitud de la energía de activación que requiere una reacción de transformación de sustrato o producto. Desde un punto de vista cinético la acción de la enzima se traduce en un incremento en la velocidad de transformación de sustrato a producto.

La capacidad catalítica de la molécula enzimática reside en el centro activo que comprende un número reducido de residuos aminoacídicos, próximos en la estructura tridimensional aunque lejanos en la estructura primaria. El centro activo es una estructura compleja cuya configuración permite ubicar la molécula de sustrato en la posición correcta para que los grupos funcionales de la enzima efectúen su transformación química

Existen diversos métodos para medir la velocidad de una reacción enzimática. La espectrofotometría permite detectar cambios en la absorbancia de luz por parte del sustrato o del producto (según la concentración de estos) y la radiometría implica incorporación o liberación de radiactividad para medir la cantidad de producto obtenido por tiempo. Los ensayos espectrofotométricos son los más utilizados, ya que permiten medir la velocidad de la reacción de forma continua. Por el contrario, los ensayos radiométricos requieren retirar las muestras para medirlas, por lo que son ensayos discontinuos. Sin embargo, estos ensayos son extremadamente sensibles y permiten detectar niveles muy bajos de actividad enzimática. Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (ΔG^\ddagger) de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más deprisa que la correspondiente reacción no catalizada.

Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas.

Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, en las cuales la porción proteica corresponde aproximadamente 34000 Da, el resto del peso molecular del grupo está constituido por el grupo prostético (grupo hemo), dos iones calcio y algunos glicanos superficiales enlazados. Por lo general son moléculas más pequeñas que las oxidasas.

La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno (el cual es el sustrato). Es utilizada ampliamente en bioquímica clínica. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasa como enzima acoplada. También se utiliza en inmunoensayos para la detección de virus tan conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA o el herpesvirus. La peroxidasa también se utiliza como biocatalizador para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes. En este experimento, para analizar la actividad de la enzima se utilizará la solución extraída de la planta y reaccionará con soluciones de H_2O_2 . La enzima descompondrá el peróxido produciendo O_2 libre que reaccionará con un compuesto (Guayacol) que al oxidarse forma una solución coloreada (Tetraguayacol) y de esta forma poder ser detectado a una longitud de onda en el rango visible.

Para determinar la actividad de la peroxidasa se debe tener en cuenta que el coeficiente de extinción molar a 470 nm del tetraguayacol es $5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Utilice la siguiente ecuación:

$$Act = (m(3.1)(60)(1 \times 10^3)) / 5200 \text{ donde}$$

m = pendiente de la gráfica para cada experimento de dilución de peroxidasa

3.1 = volumen total en ml de la solución en la celda del espectrofotómetro

60 = factor de la pendiente de segundos a minutos

1×10^{-3} = factor de mmol a μmol para el valor de M del coeficiente de extinción.

12.4. Materiales

- | | |
|---------------------------------------|---------------------|
| ✓ Mortero | ✓ 5 tubos de ensayo |
| ✓ Pipeta de 10 mL | ✓ Tubos eppendorf |
| ✓ Micropipeta de 0.5-10 μL | ✓ XXXXXXXXXXXXXXXX |

12.5. Sustancias

- | | |
|---|---------------------------------|
| ✓ Solución extractora: Buffer fosfato 60 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,0 | ✓ Peróxido de hidrógeno al 30%. |
| ✓ Buffer fosfato 10 mM pH 6,0 | ✓ Guayacol |

12.6 Equipos

Centrifuga

12.7. Procedimiento

12.7.1. Solución de peroxidasa

- Picar 2 g de hoja de palma africana y homogenizar con 20 mL de la solución extractora en licuadora durante 2-3 minutos.
- Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos. Usar el sobrenadante como solución de peroxidasa.

12.7.2. Solución de sustratos

- Disolver 10 μL de peróxido de hidrogeno al 30% y 40 μL de guayacol en 20 mL de buffer fosfato pH 6.0.

12.7.3. Actividad enzimática

- Preparar en 5 tubos de ensayo 100 μL de la solución de peroxidasa cada una de las siguientes diluciones: 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50.
- Llevar con una pipeta 3 mL de la solución de sustrato a la celda del espectrofotómetro, colocar la longitud de onda a 470 nm y calibrar la absorbancia a cero con esta solución.
- Para realizar las lecturas de absorbancia adicione primero 100 μL de la solución de peroxidasa (5 experimentos, 1 para cada dilución) a la celda, inmediatamente adicione 3 mL de solución de sustrato y registre el valor de la absorbancia cada 15 segundos por un periodo entre 3-5 minutos.
- Dibuje una gráfica para los 5 experimentos de absorbancia vs tiempo.
- Determine la actividad de la peroxidasa.
- Determinar la concentración de proteína utilizando el método de Biuret (con estándares de Albumina de suero Bovino (BSA)).

- Utilizar los valores de concentración de proteína para mirar el comportamiento y elucidar un valor aproximado para la actividad específica de la enzima.

12.7.4. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima

- Seleccionar una de las diluciones de la enzima del experimento anterior.
- Adicionar 1 mL de esta dilución a un tubo de eppendorf, taparlo y calentarlo en un baño a 95 °C.
- Sacar 0,1 mL de esta solución a los 0, 5, 10, 15, 30 minutos de incubación y enfriarlos inmediatamente en un vaso con hielo.
- Realizar el experimento que se hizo anteriormente con esta dilución para determinar la actividad de la misma forma que lo anterior para cada valor de tiempo.
- De los datos obtenidos comparar los valores de actividad para la enzima sin calentar y al calentar la dilución a cada tiempo.

12.8. Disposición de los residuos

Tabla. Disposición final de los residuos generados en la práctica.

<i>Sustancia o Mezcla</i>	<i>Recipiente rotulado</i>
Todos serán descartados en el recipiente indicado	Solución acuosa

12.9. Consultar antes de la práctica

- ¿Cómo varía la acción enzimática sobre la naturaleza física de la muestra (comparar resultados, hígado y papa macerados Vs las mismas muestras sin homogeneizar).
- ¿Cuál es la función de un catalizador sobre la velocidad de reacción?
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Referencias bibliográficas

EN REVISIÓN