

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	1 de 33

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

NORMAS DE SEGURIDAD

La realización de prácticas de laboratorio, requiere atención a una serie de detalles que pueden evitar consecuencias desagradables. Las normas de seguridad en el laboratorio han sido elaboradas a partir de innumerables experiencias a lo largo y ancho de los laboratorios de bioquímica que funcionan en el mundo conocido. No son consecuencia del capricho de los profesores. Han sido propuestas para minimizar accidentes y proporcionar el mayor grado de seguridad posible a las personas que se dedican a la práctica de esta interesante disciplina.

Recuerde que el laboratorio es un lugar serio de trabajo. Las prácticas de laboratorio serán realizadas en grupo y cada grupo se ubicará en un determinado espacio de la mesa de trabajo, del cual debe hacerse responsable y mantenerlo limpio y en orden. El estudiante debe proveerse de un pedazo de tela para la limpieza de su lugar de trabajo.

1. Antes de llegar a realizar cada una de las prácticas, **LEA CUIDADOSAMENTE** la guía correspondiente, preparando un diagrama de flujo de la misma.
2. Para ingresar al laboratorio de Bioquímica, es requisito indispensable:
 - 2.1 *El uso de bata de laboratorio.* La misma debe ser de tela blanca no inflamable, manga larga y debe cubrir desde los hombros y el cuello hasta la rodilla. Igualmente, debe presentar al menos un bolsillo a la altura del pecho y dos más en la parte inferior. La bata de laboratorio debe permanecer abotonada. Por su seguridad, la bata de laboratorio debe poder ser retirada con facilidad en caso de accidente, por lo mismo se recomienda el uso de botones para cerrar la misma.
 - 2.2 *El uso de gafas de seguridad.* Las gafas de seguridad para el laboratorio de bioquímica, deben ser de material transparente resistente al impacto. Deben cubrir totalmente los ojos desde el inicio de la cuenca ocular en el borde exterior del cráneo, hasta el borde externo de la nariz. Igualmente, debe cubrir desde la parte superior de las cejas hasta la parte inferior de la cuenca ocular. Por su seguridad, el estudiante debe permanecer con ellas permanentemente puestas el tiempo que dure la práctica. No está permitido el uso de lentes de contacto durante las prácticas de laboratorio de bioquímica. La presencia de sustancias irritantes y contaminantes puede comprometer seriamente su visión de forma permanente al penetrar entre el lente y la superficie del ojo.
 - 2.3 *El uso de indumentaria adecuada.* No debe ingresar al laboratorio vistiendo ropas que dejen al descubierto el abdomen, las piernas o los pies.
 - 2.4 *Permanecer con el cabello recogido:* No está permitido el uso de gorras, sombreros, turbantes o dispositivos semejantes, para aquellas personas que tienen el cabello de longitud apreciable, puede ser amarrado mediante un dispositivo adecuado.
 - 2.5 *Presentar el diagrama de flujo de la práctica a realizar.* El diagrama de flujo debe presentarse en el cuaderno de laboratorio. El diagrama de flujo de la práctica es de carácter eminentemente individual.



Guía Unificada de Laboratorios

Código

FLA-23 v.00

Página

2 de 33

3. Al ingresar al laboratorio asegúrese de conocer la ubicación de extintores de incendio, llaves de gas, duchas y salidas de emergencia.
4. En el laboratorio está terminantemente prohibido el uso de celulares, audífonos o cualquier otro dispositivo que distraiga la atención del practicante o de sus compañeros.
5. Al realizar las prácticas, solo efectúe la señalada para ese día, siguiendo las correspondientes normas de seguridad.
6. Al recibir su material de manos del auxiliar de laboratorio, verifique que se encuentre en buen estado. **NO ACEPTE MATERIAL AVERIADO** pues todo material roto o extraviado durante la práctica será responsabilidad de los integrantes del grupo de trabajo.
7. No toque las sustancias ni los aparatos de los estantes sin autorización.
8. No desplace hasta su lugar de trabajo los diferentes reactivos en los frascos principales. Mida la cantidad indicada en el lugar en que estos se encuentran y luego, haciendo uso de un recipiente adecuado, desplácese hasta su lugar de trabajo, con el mismo.
9. No juegue con las llaves de agua, gas, entre otros, que se encuentran en las mesas.
10. Si deja caer sustancias químicas sobre la mesa, limpie inmediatamente.
11. En caso de accidente en el que se vierta sobre sí un ácido o cualquier sustancia corrosiva, lávese inmediatamente con abundante agua.
12. No toque directamente con las manos las sustancias químicas desconocidas.
13. Si desea conocer el olor de una sustancia, no acerque la cara directamente, abanique un poco de vapor a las fosas nasales, moviendo la mano sobre la sustancia o el recipiente que contiene la sustancia.
14. Compruebe cuidadosamente los rótulos de los frascos de reactivos antes de usar su contenido.
15. No devuelva los sobrantes de compuestos usados a los frascos originales, no introduzca objetos extraños dentro de ellos, no cambie las tapas de los frascos de reactivos por ningún motivo.
16. No transite por el laboratorio con líquidos en goteros o pipetas. Cuando deba medir líquidos, tenga siempre a mano el recipiente sobre el cual va a depositar el líquido medido.
17. Para medir líquidos en el laboratorio haciendo uso de goteros o pipetas, no pipeteo succionando con la boca. Haga uso de las peras o de los dispositivos adecuados para cada sistema de medida.
18. No transite por el laboratorio con sólidos en espátulas. Cuando deba pesar un sólido, tenga siempre a mano el recipiente sobre el cual va a depositar el sólido pesado.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	3 de 33

19. No ingiera alimentos ni bebidas durante su permanencia en el laboratorio.
20. No fume dentro del laboratorio.
21. Al momento de encender el mechero, verifique que las llaves y manguera correspondan al respectivo mechero.
22. Antes y después del experimento, asegúrese de la limpieza de las mesas y aparatos usados, deje todo en su sitio.
23. Todo material roto o extraviado durante la práctica será de responsabilidad de todos los integrantes del grupo.

OPERACIONES PELIGROSAS

1. Nunca caliente un tubo de ensayo, dirigiendo éste hacia sí o hacia algún compañero, las sustancias que se calientan, generalmente líquidas, pueden proyectarse violentamente hacia afuera, provocando un accidente.
2. Nunca prenda un mechero, abriendo totalmente la llave de gas y manteniendo la cara sobre el mismo; la presión del gas produce una llama bastante larga que podría causarle quemaduras.
3. Tenga mucho cuidado al introducir un tubo o un termómetro a través de un tapón de corcho o de jebe. La presión, deberá ejercerse sobre el tubo en un punto próximo al tapón; si se presiona desde el extremo opuesto, se tendrá mayor facilidad, pero puede producirse una palanca que fácilmente lo rompa, es aconsejable cubrirse la mano con un guante de cuero grueso y humedecer en agua, aceite o álcali el tubo o termómetro.
4. Emplee siempre la pinza para coger los tubos, especialmente cuando está efectuando calentamiento. Recuerde que el tubo no siempre se pone rojo cuando está lo suficientemente caliente, como para producir dolorosas quemaduras.
5. Mantenga lejos de la cara, extendiendo bien los brazos, toda clase de reactivos cuando por primera vez se ha de verificar alguna reacción química. Muchas veces ésta desprende gran cantidad de calor, que puede proyectar violentamente los reactantes fuera del tubo.
6. Siempre que deba hacer soluciones acuosas de ácidos y bases fuertes, **VIERTA EL REACTIVO SOBRE EL AGUA** y no al contrario. El incumplimiento de esta norma puede causar salpicaduras, quemaduras graves e incluso explosiones.

EN CASO DE ACCIDENTE

En cualquier tipo de incendio, inmediatamente cerrar toda llave de salida de gas. Si la llama es pequeña, puede ser apagada con una toalla húmeda o con el extintor.

ÁCIDOS EN LA ROPA: Si cae algo de ácido en el vestido, aplicar inmediatamente solución de amoníaco. Si la cantidad derramada es muy grande, retire la ropa rápidamente y coloque al accidentado bajo la ducha de emergencia. Lave con abundante agua. En caso de accidente, el pudor debe ser dejado en segundo plano pues prima la seguridad y la salud.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	4 de 33

FUEGO EN LA ROPA: Inmediatamente cubrir con una manta o con una toalla. De ser necesario, retire la ropa rápidamente y coloque al accidentado bajo la ducha de emergencia. Lave con abundante agua. En caso de accidente, el pudor de be ser dejado en segundo plano pues prima la seguridad y la salud.

INCENDIO DE REACTIVOS: Cuando hay incendios en vasos o frascos de laboratorio, tapar inmediatamente la boquilla de éstos con una plancha de asbesto o con una toalla húmeda. Para incendios mayores usar el extintor.

CORTES: Producidos por roturas de tubos de vidrio o termómetros, deben ser lavados con agua, aplicar un antiséptico y luego una venda.

ÁCIDOS EN LOS OJOS: Lavar inmediatamente la parte afectada con bastante agua, luego con una solución saturada de ácido bórico o una solución de ácido acético al 1%; secar y poner dentro del ojo unas gotas de aceite de oliva.

ÁLCALI EN LOS OJOS: Lavar inmediatamente la parte afectada con bastante agua, luego con una solución saturada de ácido bórico.

QUEMADURAS PRODUCIDAS POR:

ÁCIDOS: Lavar con bastante agua, luego con una solución saturada de bicarbonato de sodio, volver a lavar con agua, secar con gasa y aplicar picrato de butesina.

FENOL: Lavar con alcohol al 50% con una solución de agua de bromo al 1%, secar y aplicar vaselina.

BROMO: Lavar con bastante agua, luego con una solución con centrada de bisulfito de sodio hasta eliminar el bromo lavar con agua, secar y aplicar vaselina.

FUEGO: Las quemaduras por fuego o por contacto con objetos calientes se alivian, aplicando a la parte afectada picrato de butesina.

ATENCIÓN:

EN CASOS GRAVES, SOLICITAR ATENCIÓN MEDICA.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	5 de 33

1. Título: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE UNA SOLUCIÓN BUFFER.

2. Objetivos:

- Familiarizar al estudiante con el uso de las soluciones buffer.
- Determinar el valor de pH, al cual una solución buffer presenta la mayor resistencia a los cambios de pH.
- Determinar el intervalo de amortiguamiento de una solución buffer.

3. Marco Teórico

Una solución buffer o tampón, se opone a los cambios de pH cuando se le añaden ácidos o bases, o cuando se diluyen. Un buffer o tampón es una mezcla de un ácido y su base conjugada. Debe haber cantidades comparables de ácidos y bases conjugados (digamos, dentro de un factor de 10) para que haya un efecto tampón significativo. La importancia de las soluciones amortiguadoras de pH en todas las áreas de la ciencia es inmensa. Los bioquímicos están particularmente interesados en los tampones, porque el funcionamiento adecuado de cualquier sistema biológico depende del pH. Para que un organismo sobreviva, debe controlar el pH de todos los compartimientos subcelulares, de manera que todas las reacciones catalizadas por enzimas procedan a una velocidad adecuada.

La ecuación fundamental de soluciones amortiguadoras es la ecuación de **Henderson-Hasselbalch**, que simplemente es una forma transformada de la constante de equilibrio K_a .

Ecuación de Henderson-Hasselbalch: $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$

La ecuación de Henderson-Hasselbalch da el pH de una solución, siempre que se conozca la relación de concentraciones del ácido y base conjugados y el pK_a del ácido. Si se prepara una solución a partir de una base débil B y su ácido conjugado BH^+ , es válida una ecuación análoga:

$$pH = pK_a + \log \frac{[B]}{[BH^+]}$$

Independientemente de lo compleja que sea una solución, siempre que $pH=pK_a$, entonces, $[A^-]=[AH]$. Esta relación es cierta, porque *todos los equilibrios que coexisten en cualquier solución en equilibrio se deben satisfacer simultáneamente*. Otro rasgo de la ecuación de Henderson-Hasselbalch es que por cada cambio en una unidad en el exponente de 10 en la relación $[A^-]/[AH]$, el pH cambia una unidad.

La capacidad de una solución buffer o tampón (β), es una medida de la resistencia de la solución a cambiar de pH, cuando se la añade un ácido o una base fuerte. La capacidad de un tampón o solución buffer se define como:

$$\beta = \frac{dC_b}{dpH} = \frac{-dC_a}{dpH}$$

Donde C_a y C_b son el número de moles de ácido fuerte y de base fuerte respectivamente por litro necesarios para producir un cambio de una unidad de pH. Cuanto mayor sea el valor de β , más resistente es la solución a un cambio de pH.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	6 de 33

Al elegir un tampón para un experimento, se debe buscar uno cuyo pK sea lo más próximo posible al pH deseado. El intervalo útil de pH de una solución buffer o tampón, normalmente se considera $pK = \pm 1$. Fuera de ese intervalo no hay suficiente cantidad, ni de ácido débil ni de base débil, para reaccionar con el ácido o base añadida. Desde luego, la capacidad amortiguadora se puede aumentar aumentando la concentración del buffer o tampón.

4. Materiales, Equipos e Insumos

Una (1) balanza analítica	Una (1) espátula
Un (1) frasco lavador	Un (1) vidrio de reloj
Un (1) vaso de precipitados de 50 mL – 100 mL	Un (1) balón aforado de 100 mL y 50 mL
Un (1) erlenmeyer de 250 mL	Un (1) pipeteador
Una (1) pipeta graduada de 10 mL	
Una (1) pipeta aforada de 10 mL	
Una (1) bureta de 25 mL	
Un (1) soporte universal	
Dos (2) juegos de pinzas para bureta	
Un (1) juego de pinzas de laboratorio	
Un (1) agitador de vidrio	
Un (1) embudo de vidrio	

5. Reactivos

500 mL Agua destilada	Ácido acético e Hidróxido de sodio
-----------------------	------------------------------------

6. Procedimiento

Parte I. preparación de soluciones:

Preparar 50 mL de una solución de ácido acético al 0.1 M

Preparar 100 mL de una solución de NaOH al 0.1 M

Parte II. Calibración del pH-metro.

El electrodo del pH-metro siempre debe estar sumergido en una solución de KCl o agua destilada. Enjuagar el electrodo con agua destilada y secar.

Ajustar el pH-metro primero a pH 7, después a 4 y finalmente a 10 con soluciones reguladoras comerciales. Entre cada pH enjuagar con agua destilada (Fig.2B).

Parte III. Determinación de β para el ácido acético al agregarle una base fuerte.

Agregar la solución de ácido acético en un beaker de 150 mL.

Colocar el agitador magnético sobre la base del soporte universal e introducir el magneto dentro de la solución de ácido acético.

Colocar la bureta en el soporte universal y llenarla con la solución de NaOH.

Luego armar un montaje similar al de titulación, para agregar la base sobre el ácido.

Introducir el electrodo del pH-metro dentro de la solución de ácido acético sin que haga contacto con el magneto, (dejarlo dentro de la solución durante el tiempo que dure el experimento) y tomar lectura del pH inicial de la solución.

Agitar la solución de manera suave y permanente a medida que le agrega 0.5 mL de la solución de NaOH, esperar que el pH de la solución del beaker se establezca y tomar el valor de este.

Seguir agregando la solución de NaOH y tomar lectura del pH cada vez que se le adicione 0.5 mL hasta llegar a un pH=10.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	7 de 33

mL de NaOH 0.1 M agregados	pH	[NaOH]/[A.A]	β
0			
0,5			
1			
1,5			
.....			

7. Resultados

1. Muestre todos los cálculos que se requieren para preparar cada una de las soluciones.
2. Llene la tabla de datos adjunta
3. Graficar la relación pH vs. mL de base agregados.
4. Determinar la variación de la capacidad amortiguadora (β) con el pH antes del punto final, derivando la curva obtenida en el punto 2.
5. Determinar el valor de pH en el que se produce la máxima capacidad amortiguadora.
6. Determinar el intervalo de amortiguamiento de un buffer preparado con ácido acético.
7. Comparar el valor de pH determinado en el punto 5, con el valor de pK_a del ácido acético.

8. Preguntas y Ejercicios

- ¿Cuántos gramos de NaOH se requieren para preparar 250 mL de solución 0.2M?
- Explique cada uno de los pasos requeridos para preparar:
 - a). 500 mL de solución 0.2M de HCl a partir de HCl concentrado (36% en peso de HCl y densidad 1.18 g/mL)
 - b). 2 L de NaOH 0.3M a partir de NaOH del 99.5 % de pureza en peso.
- ¿A qué volumen final deben diluirse 50 mL de NaOH 6M para obtener una solución 1M de NaOH? Explique.

9. Referencias

- HARRIS, Daniel C. 2 ed., Barcelona: Editorial Reverté, 2001.p.220-231.
- BERG, Jeremy M. STRYER, Lubert and TYMOCZKO John L. Biochemistry. 5 ed., Barcelona: Editorial Reverté, 2002. P. 128-130.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	8 de 33

1. Título: EXTRACCIÓN DE ADN

2. Objetivo

Aplicar las técnicas de ruptura celular y solubilización para extraer ADN a través de tejidos vegetales.

Familiarizarse con las técnicas experimentales empleadas en el estudio de ADN.

3. Marco teórico

El ADN es una biomolécula constituida por cuatro nucleótidos que forman dos cadenas antiparalelas dispuesta en forma de doble hélice, organizada en unas estructuras complejas conocidas como cromosomas. La principal función del ADN es almacenar la información genética, necesaria para la síntesis de proteínas.

El ADN se encuentra localizado en el núcleo de células eucariotas o citoplasma de células procariotas. Las mitocondrias en células eucariotas, también contienen ADN.

En 1977, se describió un método para secuenciar moléculas de ADN, cuyo primer paso consistía en el aislamiento de ADN. En términos generales, el protocolo de purificación de ADN desde una muestra celular se compone de tres pasos: ruptura, o lisis celular, solubilización del ADN y precipitación de las proteínas y los restos celulares presentes en el lisado.

La ruptura celular se realiza empleando detergentes que disuelven los lípidos en la membrana celular y nuclear, liberando el contenido de la célula. Las proteínas asociadas al ADN, se desnaturalizan y se separan de éste por acción del detergente. El lisado celular obtenido contiene ADN, restos moleculares (principalmente, ARN, carbohidratos y proteínas) y celulares. Estos últimos se pueden separar mediante centrifugación o filtrado, dejando el lisado celular clarificado.

La extracción de ADN desde el lisado celular clarificado se basa en la interacción molecular entre los iones salinos de la solución de extracción y las cargas negativas del ADN, permitiendo su solubilización. Finalmente, la separación del lisado celular se realiza utilizando alcohol etílico, el cual precipita el ADN, favoreciendo la separación sencilla del mismo desde los otros componentes del lisado.

4. Materiales, equipos e insumos

- Balanza analítica
- Gradilla
- 3 Tubos de ensayo
- 1 Vaso de 100 ml
- 1 Pipeta 5 ml
- 1 Pipeteador
- 2 Vidrio reloj
- 1 Espátula
- 1 Varilla de vidrio
- 2 probetas de 100ml
- 1 Embudo grande
- 1 Vaso de 250ml
- 1 Licuadora

5. Reactivos

- Agua destilada
- Hielo

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	9 de 33

- Alcohol al 70%V/V
- Cloruro de sodio
- Bicarbonato de sodio
- Papel filtro grande
- Hielo
- Palillos*
- Jabón líquido*

Los elementos marcados con * deben ser proporcionados por el estudiante.

6. Procedimiento

- a) Preparación de la solución de extracción: Disuelva 1,5g de Cloruro de sodio y 5g de Bicarbonato de sodio en 120 mL de agua. Luego adicionar 5 mL de jabón. Mezcle y enfríe empleando hielo.
- b) Corte en pequeños trozos un banano, agregue a la licuadora con 100 mL de agua.
- c) Licúe la mezcla así: pulsos de licuado de 10 segundos de duración cada uno, esperando 30 segundos entre cada pulso. Realice éste procedimiento hasta obtener un licuado completo.
- d) Agregue la solución de extracción fría al licuado. Para ello emplee el doble de solución de extracción respecto al licuado de banano. Por ejemplo, 200mL de extracción por 100 mL de licuado.
- e) Licúe la mezcla realizando tres pulsos de 2 minutos de duración cada uno, con espera de 30 segundos entre cada pulso.
- f) Filtre el lisado (mezcla licuada) en un papel filtro y recoja el filtrado en un vaso de precipitado. Mantenga el vaso en un baño de hielo.
- g) Tome 2mL del filtrado y transfíralo a un tubo de ensayo. Añada etanol frío y observe la separación de la mezcla. Se formarán una fase acuosa superior y una fase orgánica inferior. Justo entre las dos fases debe observarse un material gelatinoso y blanco, éste será el ADN.
- h) Con ayuda de palillos de madera retire el ADN y transfíralo a un tubo con etanol.

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que, aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.

Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	10 de 33

1. Título: PROPIEDADES IÓNICAS DE LOS AMINOÁCIDOS

2. Objetivo

Demostrar las propiedades ácido-base de los aminoácidos.

3. Marco teórico

Todos los aminoácidos son anfóteros los cuales contienen al menos un grupo funcional ácido (carboxilo) y uno básico (α -amino). Algunos aminoácidos contienen otros grupos que se ionizan fácilmente: grupos amino, carboxilo, hidroxifenilo, sulfhidrilo, guanidino e imidazol. El carácter iónico de los polipéptidos y las proteínas es en gran parte debido a estos grupos adicionales ionizables debido a que los grupos α -amino y carboxilo de los aminoácidos participan en los enlaces peptídicos. En esta práctica se estudia la reacción de aminoácidos cuando se adiciona un ácido o una base y se observa el cambio de pH. Además, después de cada adición de ácido o base durante una titulación, los resultados se pueden predecir por el uso de la ecuación general de Henderson-Hasselbalch.

4. Materiales, equipos e insumos

1. Balanza analítica
2. pH metro
3. Barra y agitador magnético
4. Bureta
5. Pinzas para bureta
6. Soporte
7. Espátula
8. 8 vasos de precipitados de 100 ml
9. Embudo.

5. Reactivos

4. Muestras de aminoácidos en polvo
5. NaOH 1N
6. HCl 1N
7. Amortiguadores estándar

6. Procedimiento

Titulación de aminoácidos desconocidos.

Pesar cerca de 400 mg de muestra y disolverla en 20 ml de H₂O en un vaso de precipitado. Introducir una barra magnética y colocarlo en una placa de agitación, así como el electrodo para medir pH. Titular la muestra disuelta desconocida con HCl 1N, registrando las lecturas de la bureta y el pH a intervalos frecuentes (cada 0,5 mL) hasta que la solución alcance un pH de 1.0. *Observe y registre la solubilidad de la muestra*

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	11 de 33

durante la titulación. Titular otros 20 ml de agua (blanco) con HCl 1N, gota a gota en las primeras 10 gotas y de dos en dos gotas las siguientes 10 gotas. Finalmente de cuatro en cuatro gotas hasta que la solución alcance pH de 1.0 Registrar el pH y el volumen del ácido después de cada adición. Disolver otra muestra (otra vez aproximadamente 400 mg en 20 ml de agua) y titular la muestra con NaOH 1N de la misma manera que para la titulación con ácido hasta que el pH de la solución llegue a 12. *Observe y registre la solubilidad de la muestra durante la titulación.* También titular a 20 ml de agua (blanco) con NaOH 1N hasta pH 12.0 de manera similar que el primer blanco.

Hacer una tabla de resultados para cada titulación:

5. Muestra con NaOH, Agua con NaOH, Muestra con HCl, Agua con HCl.
6. Dibujar la curva de titulación verdadera siguiendo el siguiente procedimiento: Para determinar la curva de titulación verdadera de cualquier sustancia, se debe medir cuánto ácido o base se consume al titular el solvente (agua) en cada pH y entonces restar esta cantidad de la cantidad total de ácido o base consumida para alcanzar ese pH.
7. Determinar la capacidad amortiguadora del o los aminoácidos.

Titulación del lado ácido. Construcción de la gráfica

El siguiente ejemplo con el lado ácido de la titulación de un aminoácido ilustra uno de varios de los métodos disponibles para corregir por dilución. Para la muestra y el blanco de agua, graficar el volumen del ácido adicionado contra el pH alcanzado (Fig. 1). De la gráfica o de los datos originales, preparar una tabla como la Tabla 1. Restar el volumen del ácido requerido para llevar el blanco de agua a cualquier pH del volumen del ácido requerido para llevar la muestra al mismo pH. La diferencia representa la cantidad de ácido consumida en la titulación de la muestra solamente. Usando los datos de su tabla, graficar el pH contra el número de equivalentes de ácido necesario para titular la muestra del aminoácido a cualquier pH (ver Fig. 2).

Titulación del lado básico.

Para corregir por dilución el lado básico de la curva se puede aplicar un método similar.

Preparar una curva de titulación completa y corregida para el aminoácido titulado.



Figura 1

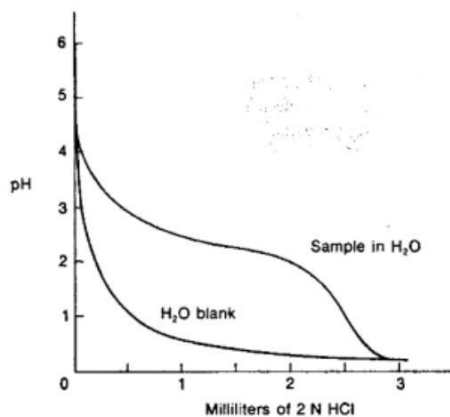


Figura 2

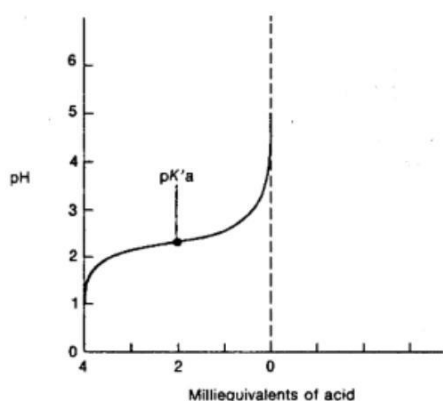


Tabla 1. Ácido requerido para titular la muestra y el blanco*

pH	Volumen (ml) de ácido (2 N HCl)		
	Muestra + agua	agua	Diferencia
3.5	0.103	0.003	0.100
3.0	0.335	0.020	0.315
2.5	0.667	0.032	0.635
2.2	1.063	0.063	1.000
2.0	1.425	0.200	1.225

*Clarck, J.M. Jr. y Switzer R. L. Experimental Biochemistry. WH: Freeman and Company N.Y. 1977.

El número de equivalentes de ácido o base consumidos al pasar a través de la inflexión de una curva, como en la Fig. 2, representa la cantidad de ácido requerida para titular un grupo ionizable en la cantidad del aminoácido que se ha ensayado. El punto final de la titulación se debe reconocer como el punto en que se eleva (o cae) drásticamente el pH con la adición del titulante. Este punto generalmente se determina con más precisión de la curva de titulación del aminoácido con la base.

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- 18. No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.
- 19. Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	13 de 33

Bibliografía

Clark, J.M and R. L. Switzer. 1977. Experimental Biochemistry. W.H. Freeman and Company

Anexos

24. Usando la ecuación de Henderson –Hasselbalch, calcular el pKa de cada grupo ionizable titulado.

25. ¿Coincide con el pKa reportado en los libros?

26. ¿Cómo se podría confirmar la identidad del aminoácido?

27. Dibujar la curva que se esperaría en la titulación del ácido aspártico y la que se esperaría en la titulación de la lisina, señalando las especies predominantes en cada región.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	14 de 33

1. Título: AISLAMIENTO DE CASEÍNA

2. Objetivos

- Aislar caseína de la leche a partir de su punto isoeléctrico

3. Marco Teórico

En bioquímica es muy común aislar y purificar proteínas para estudiar su composición, su estructura y de ser posible su función, como es el caso de las enzimas. Para dicha purificación se emplean métodos basados en sus propiedades de solubilidad. Cada proteína tiene una composición de aminoácidos específica que las hace diferentes unas de otras y, por lo tanto, su comportamiento en disoluciones también es diferente. Por lo general las proteínas fibrosas son solubles en agua y resistentes a la degradación enzimática, sin embargo, con soluciones de cierta fuerza iónica se pueden solubilizar. Las proteínas globulares son relativamente más solubles en agua y en soluciones de baja fuerza iónica, aunque algunas coagulan cuando se calientan.

La composición de aminoácidos, es también responsable del comportamiento de las proteínas en diferentes condiciones de pH. Así al acidificar o alcalinizar una determinada proteína, ésta puede llegar a su punto isoeléctrico, es decir, alcanzar una carga neta de cero y por lo tanto precipitar. La leche es un producto rico en proteínas, tales como las caseínas y globulinas, además de contener carbohidratos y ácidos grasos. De la leche se puede separar la caseína por precipitación en su punto isoeléctrico (pH 4.6).

4. Materiales, Equipos e Insumos

- Potenciómetro (pH-metro)
- Probeta 100mL
- Probeta de 50 mL
- 2 vasos de precipitado de 250 mL
- Vaso de precipitado de 100mL
- 2 pipetas graduadas de 5 mL
- 4 tubos de centrifuga
- Agitador de vidrio
- Erlenmeyer
- Parrilla eléctrica
- Centrifuga
- 4 viales de vidrio
- Pipetas pasteur
- Embudo bushner
- Embudo de vidrio
- Gradilla

5. Reactivos

- HCl 20%V/V
- Etanol
- Papel filtro
- Leche cabra, vaca, humana, oveja (una diferente por grupo)*
- Papel aluminio*

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	15 de 33

*(las sustancias marcadas con * deben ser suministradas por los estudiantes)


6. Procedimiento

1. El día anterior a la práctica, dejar enfriando la leche para que se separe la parte lipídica.
2. Al iniciar la práctica, eliminar los lípidos que se encuentran en la superficie con una pipeta Pasteur.
3. Después de haber eliminado los lípidos, tomar 3 mL de la leche y guardar en el refrigerador en un vial previamente etiquetado.
4. Colocar 100 mL de la leche descremada en un vaso de precipitados de 250mL junto con el agitador magnético y agitar suavemente sobre la parilla.
5. Calibrar el potenciómetro con las soluciones patrón de pH7 y pH4
6. Introducir el electrodo en el vaso con leche, cuidando no golpearlo con el agitador magnético.
7. Adicionar lentamente, con una pipeta Pasteur, la solución de HCl al 20% hasta ajustar el pH a 4.6.
8. En el punto isoeléctrico se formará un precipitado voluminoso. En ese momento se detiene la agitación y se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Mezclar la suspensión por unos cuantos minutos y distribuirla en tubos de centrifuga, procurando recuperar todo el precipitado.
10. Equilibrar los tubos por parejas y centrifugar a 2000 rpm durante diez minutos.
11. Verter el sobrenadante en una probeta y anotar el volumen total. Tomar 3 mL de éste y guardarlo en un vial previamente etiquetado. El resto se desecha.
12. El precipitado de todos los tubos se coloca en un vaso. Agregar 20 mL de agua y agitar sobre una parrilla con un agitador magnético, hasta obtener una suspensión homogénea. Este lavado es para eliminar el HCl.
13. Colocar la suspensión en un solo tubo de centrifuga efectuar el proceso de centrifugación a 2000 rpm durante diez minutos. Desechar el sobrenadante y repetir los lavados con agua dos veces más.
14. Al eliminar el agua del último lavado adicionar 10 mL de etanol al precipitado y homogeneizar con un agitador de vidrio. Volver a centrifugar para eliminar el etanol.
15. Finalmente, lavar con acetona y éter etílico de la misma forma que se hizo con el alcohol.
16. Recuperar el precipitado y colocarlo en papel aluminio, en forma extendida, para que se seque y forme un polvo.

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	16 de 33

- Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.

8. Bibliografía

H. Robert Horton, J. David Rawn, K. Gray Scrimgeour, Laurence A. Moran, Marc D. Perry. Principles of Biochemistry. 4 ed. Pearson Prentice Hall, 2006.p.107-110

9. Anexos

- ¿Cuántos gramos de caseína obtuvo?
- ¿Qué porcentaje representa del volumen inicial?
- Según la literatura, ¿Cuántos gramos debía obtener? ¿Fue bueno el rendimiento?
- ¿Con cuál de los tipos de leche usados se obtuvo más rendimiento de proteína?

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	17 de 33

1. Título: DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2. Objetivos

- Observar la estabilidad de las proteínas en función de la temperatura.
- Observar la desnaturalización de proteínas debida a cambios de pH.

3. Marco Teórico

Los cambios ambientales o tratamientos químicos pueden alterar la conformación nativa de una proteína, con la pérdida concomitante de su actividad biológica. Esta interrupción se le llama desnaturalización. La cantidad de energía necesaria para causar la desnaturalización es a menudo pequeña, tal vez equivalente a la necesaria para la interrupción de tres o cuatro enlaces de hidrógeno. Algunas proteínas se pueden desplegar completamente cuando se desnaturalizan para formar una espiral aleatoria (una cadena fluctuante considera totalmente desordenada). Sin embargo, algunas proteínas desnaturalizadas retienen una estructura interna considerable. A veces es posible encontrar condiciones en las que una pequeña desnaturalización de las proteínas desnaturalizadas se pueden renaturalizar espontáneamente (un replegamiento, tras la desnaturalización).

Las proteínas se desnaturalizan comúnmente por calentamiento. Bajo las condiciones apropiadas, un modesto aumento en la temperatura dará lugar a la pérdida de despliegue y de la estructura secundaria y terciaria. La desnaturalización se lleva a cabo en un intervalo relativamente pequeño de la temperatura. Esto indica que se desarrolla es un proceso cooperativo: la desestabilización de sólo unas pocas interacciones débiles conduce a la casi completa pérdida de la conformación nativa. La mayoría de las proteínas tienen una característica de "fusión" temperatura (T_m) que corresponde a la temperatura en el punto medio de la transición entre las formas nativas y desnaturalizadas. La T_m depende del pH y la fuerza iónica de la solución. En condiciones fisiológicas, la mayoría de las proteínas son estables a temperaturas de hasta 50 °C a 60 °C. Sin embargo, algunas especies de bacterias, tales como los que habitan aguas termales y la vecindad de los respiraderos termales del océano profundo, prosperan a temperaturas muy por encima de este rango. Las proteínas en estas especies tienen una T_m muy alta como se esperaba. Los bioquímicos activamente estudian estas proteínas con el fin de determinar cómo se resisten a la desnaturalización.

Las proteínas también pueden ser desnaturalizadas por dos tipos de productos químicos y detergentes caotrópicos (Sección 2.4). Las altas concentraciones de agentes caotrópicos, tales como urea y sales de guanidinio (Figura 4,27), las proteínas se desnaturalizan por la solvatación de las moléculas de agua a grupos apolares en el interior de las proteínas. Las moléculas de agua rompen las interacciones hidrófobas, que normalmente estabilizan la conformación nativa.

6. Materiales, Equipos e Insumos

- Potenciómetro (pH-metro)
- Pipeta graduada de 1 mL
- pipeta graduada de 5 mL
- vidrio reloj
- pipeteador
- beaker de 500 mL
- frasco lavador
- beaker de 50 mL
- termómetro

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	18 de 33

- espátula
- balón aforado de 50 mL
- Balanza analítica
- Bureta de mL
- Soporte universal con aro, malla y 2 pinzas para bureta
- Tubos de ensayo
- Gradilla

7. Reactivos

- NaOH en lentes
- HCl Concentrado
- KCl
- Clara de huevo*
- Leche*
- Saliva*
- soluciones buffer patrón
- Caseína

*(las sustancias marcadas con * deben ser suministradas por los estudiantes)

6. Procedimiento

Parte I. desnaturalización de proteínas por incremento de temperatura:

Tomar 5 tubos de ensayo y llenarlos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación muestras de proteína.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Caseína 0.1 g	Leche 8 mL	Clara de huevo 2 mL	Saliva 2 mL	Agua destilada 8 mL
Agua destilada 8 mL		Agua destilada 6 mL	Agua destilada 6 mL	

Una vez preparadas las muestras, introducirlas dentro de un baño maria y calentar hasta 80 °C. Luego enfriar hasta temperatura ambiente.

Parte II. Desnaturalización de proteínas por pH ácidos.

Preparar las muestras conforme lo indica la tabla 1.

Medir el pH inicial de cada muestra.

A cada muestra adicionar 2 mL de HCl 1 N.

Medir nuevamente el pH de cada muestra.

Finalmente adicionar a cada muestra 2 mL de NaOH 1 N y medir nuevamente el pH final.

Parte III. Desnaturalización de proteínas por pH básicos.

Preparar las muestras conforme lo indica la tabla 1.

Medir el pH inicial de cada muestra.

A cada muestra adicionar 2 mL de NaOH 1 N.

Medir nuevamente el pH de cada muestra.

Finalmente adicionar a cada muestra 2 mL de HCl 1 N y medir nuevamente el pH final.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	19 de 33

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.
- Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.

9. Bibliografía

H. Robert Horton, J. David Rawn, K. Gray Scrimgeour, Laurence A. Moran, Marc D. Perry. Principles of Biochemistry. 4 ed. Pearson Prentice Hall, 2006.p.107-110

10. Anexos

11. Analizar el comportamiento de cada una de las proteínas de acuerdo al cambio efectuado y observar si se regenera o no.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	20 de 33

Título de la práctica: REACCIONES ENZIMÁTICAS

1. Objetivos

- Reconocer a las enzimas como proteínas que aceleran y controlan las reacciones químicas en los seres vivos.
- Identificar la presencia de diversas clases de enzimas en tejidos animales y vegetales.
- Aplicar los componentes teóricos en las reacciones enzimáticas observadas.
- Discutir la presencia de inhibidores enzimáticos que pueden preservar algunos alimentos.

2. Marco Teórico

Un automóvil obtiene su energía de la oxidación del hidrocarburo gasolina a dióxido de carbono y agua en una explosión controlada dentro de un motor en el que los gases pueden alcanzar temperaturas de 2200 °C. En contraste, la célula viva obtiene energía oxidando el carbohidrato glucosa a dióxido de carbono y agua a una temperatura (en el ser humano) de 37°C.¹

El ingrediente secreto en los organismos vivos es la catálisis, un proceso llevado a cabo por enzimas proteínicas. Una reacción que requiere muchas horas para completarse no puede ser útil, desde el punto de vista metabólico, para una bacteria que ha de reproducirse en 20 minutos, o para una célula nerviosa humana que debe responder a un estímulo de forma instantánea.

De hecho la vida aprovecha hábilmente el hecho de que la mayoría de las reacciones deban estar catalizadas.

Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o la velocidad de la reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La sustancia sobre la que actúa una enzima se denomina sustrato de esa enzima. Y lo que se obtiene es denominado producto de la reacción.

Podemos apreciar el poder de la catálisis enzimática con un ejemplo: la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:



Esta reacción, aunque muy favorecida termodinámicamente, es muy lenta, a menos que sea catalizada. Se puede comprar una botella de una solución de H₂O₂ (agua oxigenada) y guardarla en un armario durante muchos meses antes de que se degrade. Sin embargo si añadiera un trocito de ión férrico, observaría que la velocidad de la reacción aumenta unas 1000 veces. La proteína hemoglobina que contienen hierro, es aun más eficaz para incrementar la velocidad de esta reacción. Si uno aplica la solución de peróxido de hidrógeno a un corte de un dedo, se observa un burbujeo inmediato del O₂ liberado: la reacción se está produciendo ahora aproximadamente un millón de veces más

¹ CAMPBELL, M. K, FARELL, S. O. Bioquímica. 4ª Ed. México. Thomson. 2004. P. -134-135

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	21 de 33

rápidamente que el proceso sin catalizar. Pero pueden alcanzarse velocidades aún. La **catalasa** una enzima presente en muchas células, aumenta la velocidad de descomposición del H₂O₂ sin catalizar aproximadamente 1000 millones de veces. Algunas reacciones celulares producen peróxido de hidrógeno que es un oxidante peligroso, por lo que la **catalasa** se ha perfeccionado para defenderse de él.

Este ejemplo muestra que la velocidad de una reacción favorable depende en gran medida, de que exista o no un catalizador y de la naturaleza del mismo.²

3. Materiales

Papa.

Cuchillo.

Manzana.

Mortero.

Cuchara o espátula.

Portaobjetos. Pipeta

Pasteur.

1 Vaso de precipitados 50 ml.

4. Reactivos

100 ml de peróxido de hidrógeno o “agua oxigenada” comercial.

1 Pastilla de vitamina C.

6. Procedimiento

A. Presencia de *polifenol oxidasa* de manzana

1. Moler una pastilla de vitamina C hasta que quede un polvo fino - Cortar una manzana por la mitad.
2. Colocar en una mitad de la manzana el polvo de la vitamina C, procurando que quede bien esparcido.
3. Dejar ambas mitades de manzana a temperatura ambiente durante 60 minutos y observar los cambios de coloración.

B. Presencia de *catalasa* de papa

1. Cortar una rebanada de papa y colocarla sobre un portaobjetos.
2. Agregar 3 gotas de agua oxigenada sobre la rebanada de papa.
3. Ver la actividad de la **catalasa** por el burbujeo de oxígeno que se desprende.
4. Observar el tiempo en el cual se llevan a cabo la reacción.

C. Interpretación de resultados

Después de efectuar todos los experimentos en cada caso:

1. ¿Cómo evidencia que se produjo una reacción enzimática?
2. ¿A qué se debe la presencia del color marrón en la manzana que no tiene vitamina C?
3. ¿Qué papel desempeña la vitamina C sobre la manzana expuesta al oxígeno?
4. ¿A qué se debe la producción de burbujas en el experimento de la **catalasa**?
5. ¿Y cuando dejan de formarse?
6. ¿Qué es lo que estamos midiendo en ese caso?
7. ¿Cómo comprobar que el gas desprendido en el experimento con **catalasa** es oxígeno?

Cuestionario

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	22 de 33

1. Diseñe un experimento para averiguar cómo varía la velocidad de la reacción. Y así poder determinar qué tan veloz y afín es la enzima por su sustrato en el caso de los experimentos realizados en clase. Realice un esquema.
2. ¿Cómo calculan la velocidad total de cada una de las reacciones realizadas en el laboratorio?
3. ¿Cuál es el efecto de agregar diferentes cantidades de sustrato sobre la velocidad de esta reacción? Justifiquen sus conclusiones.

7. Nivel de Riesgo:

- **Nivel 2: Riesgo Medio (Bata de Laboratorio, Guantes, Cofia, Tapabocas, Zapato Cerrado Bajo, Pantalón Largo)**

Manejo de residuos:

- Línea 19

8. Bibliografías

CAMPBELL, M. K, Farell, S. O. Bioquímica.4ª Ed .México. Thomson. 2004. P. -134-

135 MATHEWS, et al. Bioquímica. 3a. Editorial Mac Graw Hill. 2.000. P. 404-405

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	23 de 33

1. Título: RECONOCIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE CARBOHIDRATOS

2. Objetivo

- Reconocer los carbohidratos por medio de reacciones coloreadas de carácter cualitativo.
- Diferenciar Hexosas de pentosas
- Diferenciar e identificar azúcares reductores y no reductores
- Diferenciar monosacáridos, disacáridos y polisacáridos
- Diferenciar aldosas de cetosa

3. Marco Teórico

Los carbohidratos también llamados azúcares, osas o sacáridos, son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas o compuestos poliméricos que por hidrólisis producen polihidroxialdehidos y polihidroxicetonas.

Según el número de unidades de azúcares sencillos que posean se clasifican en:

MONOSACÁRIDOS o azúcares sencillos, que a su vez pueden ser **ALDOSAS** cuando contienen el grupo aldehído o **CETOSAS** cuando contienen el grupo cetona. Los monosacáridos naturales pertenecen a la serie D de los azúcares y pueden tener entre tres y hasta siete átomos de carbono.

DISACÁRIDOS que están formados por dos monosacáridos unidos entre sí por enlaces glucosídicos.

OLIGOSACÁRIDOS que tienen entre tres y diez monosacáridos unidos también por enlaces glucosídicos.

POLISACÁRIDOS que son polímeros naturales con varios miles de unidades de azúcar sencillo ligadas entre sí.

De acuerdo con lo anterior, además de reconocer si un compuesto pertenece a la familia de los carbohidratos, es necesario diferenciar si se trata de un monosacárido tipo aldosa o cetosa, si es fácilmente oxidable o no, es decir si es un **AZÚCAR REDUCTOR** o no lo es, si es de cinco átomos de carbono (pentosa) o de seis átomos de carbono (hexosa), si es disacárido o polisacárido.

Ensayo de Molisch: Este ensayo es un ensayo para reconocimiento general de carbohidratos en el que los polisacáridos y disacáridos se hidrolizan con ácido sulfúrico concentrado hasta monosacáridos y se convierten en derivados del furfural o 5-

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	24 de 33

hidroximetil furfural los cuales reaccionan con α -naftol formando un color púrpura violeta.

Ensayo de Benedict: El ensayo de Benedict permite el reconocimiento de carbohidratos reductores, al igual que el reactivo de Felhing, el de Benedict contiene ion cúprico en medio alcalino que se reduce hasta óxido cuproso en presencia de azúcares con el hidroxilo hemiacetálico libre.

Ensayo de Barfoed: Esta prueba permite diferenciar entre monosacáridos y disacáridos reductores, también contiene ion cúprico que se reduce hasta óxido cuproso más rápidamente con los monosacáridos que con los disacáridos.

Ensayo con Lugol: El reactivo de Lugol que contiene una mezcla de yodo y yoduro, permite reconocer polisacáridos, particularmente el almidón por la formación de una coloración azul violeta intensa y el glicógeno y las dextrinas por formación de coloración roja.

Ensayo de Seliwanoff: Este ensayo es específico para cetosas y se basa en la conversión de la cetosa en 5-hidro-metil-furfural y su posterior condensación con resorcinol formando así complejos coloreados

Ensayo de Vial: El reactivo de Vial contiene orcinol en ácido clorhídrico, el cual forma complejos de coloración sólo con las pentosas.

De otro lado una propiedad importante que permite identificar los carbohidratos, y determinar el grado de pureza de los mismos, particularmente monosacáridos es la rotación óptica ocasionada por la presencia de centros asimétricos o quirales en la estructura molecular, los cuales desvían el plano de luz polarizada. Esta propiedad no es exclusiva de los carbohidratos pues la presentan todas aquellas sustancias denominadas óptimamente activas, por tener en su estructura centros quirales.

Para la medición de la rotación óptica los factores importantes a tener en cuenta son: La longitud de onda de luz polarizada, la cantidad de material óptimamente activo, y la naturaleza del solvente cuando se usa. Los cambios en la temperatura ocasionan solo pequeñas variaciones en las medidas de la rotación.

TEMAS DE CONSULTA

Elabore el preinforme con las siguientes indicaciones:

- Fórmulas estructurales en proyección de FISHER y de HAWORTH de la glucosa, galactosa, fructosa, ribosa.
- Fórmula estructural en proyección de HAWORTH de la sacarosa.
- Breve descripción de los polisacáridos: almidón y glicógeno.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	25 de 33

- Reacciones de oxidación de monosacáridos reductores, ilustradas con la estructura en proyección de FISHER de la glucosa.
- Funciones e importancia biológica de los carbohidratos.
- Fundamentos de polarimetría que debe incluir: diferenciación entre luz monocromática y luz polarizada. Funcionamiento y partes del polarímetro.
- Extracción y refinamiento del azúcar de caña (sacarosa).
- Aplicaciones industriales de la celulosa.
- Construya las tablas de identificación y diferenciación de azúcares (Ver tabla 1)

Tabla N°1: Identificación de monosacáridos

Compuesto	Formula	Reactivo	Observaciones	Rxn Química

4. Materiales, Equipos e Insumos

- 16 tubos de ensayo
- Gradilla
- Una pipeta graduada de 1 ml
- Una pipeta graduada de 5 ml
- Un vaso de precipitados de 500ml
- Una varilla de vidrio
- Una gradilla para tubos de ensayo
- Una pinza metálica para tubo de ensayo
- Soporte, aro con nuez, malla y mechero.
- Una espátula
- Perlas de vidrio

5. Reactivos

- Alfa-naftol al 10%
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B
- Reactivo de Tollens
- Reactivo de Seliwanoff
- Reactivo de Vial
- Lugol
- Soluciones acuosas al 1% de: almidón, glicógeno, sacarosa, maltosa, glucosa, galactosa,
- fructosa, ribosa, arabinosa.
- Solución de glucosa al 10%.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	26 de 33

Solución de sacarosa al 10%.

- Solución fructosa al 10%.
- Solución de sacarosa al 10% en ácido clorhídrico 0.5M

6. Procedimiento

Realice los ensayos que se describen a continuación, en tubos de ensayo **LIMPIOS Y SECOS**, con las soluciones patrón de los carbohidratos que se indican en cada caso y la muestra problema.

Ensayo de Molisch:

Soluciones patrón de carbohidratos: ARABINOSA, GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA Y ALMIDÓN.

Coloque en un tubo de ensayo 2.0 mL de la solución del carbohidrato y agregue 0.2 mL de α -naftol al 10%, mezcle bien y luego adicione CUIDADOSAMENTE POR LAS PAREDES DEL TUBO, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, la formación de un anillo violeta en la interfase es prueba positiva para carbohidratos.

Ensayo de Lugol:

Soluciones patrón de carbohidratos: ALMIDÓN Y RIBOSA.

Coloque en un tubo de ensayo 2.0 ml de la solución del carbohidrato y agregue 0.2 ml de Lugol, mezcle y observe la formación de los colores rojo para glicógeno, azul-violeta para almidón como pruebas positivas.

Ensayo de Benedict:

Soluciones patrón de carbohidratos: GLUCOSA, MALTOSA Y SACAROSA.

Coloque en un tubo de ensayo 2.0 ml de la solución del carbohidrato y agregue 0.1 ml del reactivo de Benedict, caliente al baño maría. La formación de un precipitado amarillo o rojizo, es prueba positiva para carbohidratos reductores.

Ensayo de Barfoed:

Soluciones patrón de carbohidratos: GLUCOSA, MALTOSA Y SACAROSA.

Coloque en un tubo de ensayo 2.0 mL de la solución del carbohidrato y agregue 2 ml del reactivo de Barfoed, caliente en baño maría a ebullición. La formación de un precipitado rojo entre 5 y 7 minutos, es prueba positiva para MONOSACÁRIDOS REDUCTORES. Si el precipitado se forma entre 10 y 12 minutos, la prueba es positiva para DISACÁRIDOS REDUCTORES.

Ensayo de Seliwanoff:

Soluciones patrón de carbohidratos: FRUCTUOSA Y GLUCOSA.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	27 de 33

Coloque en un tubo de ensayo 2.0 ml de la solución del carbohidrato y agregue 2 ml del reactivo de Seliwanoff, caliente en baño maría a ebullición por dos minutos. La formación de una coloración roja es prueba positiva para cetosas.

Ensayo de Vial:

Soluciones patrón de carbohidratos: RIBOSA, ARABINOSA Y GLUCOSA.

Coloque en un tubo de ensayo 2.0 ml de la solución del carbohidrato y agregue 3 ml del reactivo de Vial, caliente en baño maría a ebullición y observe. La formación de una coloración verdosa es prueba positiva para pentosas.

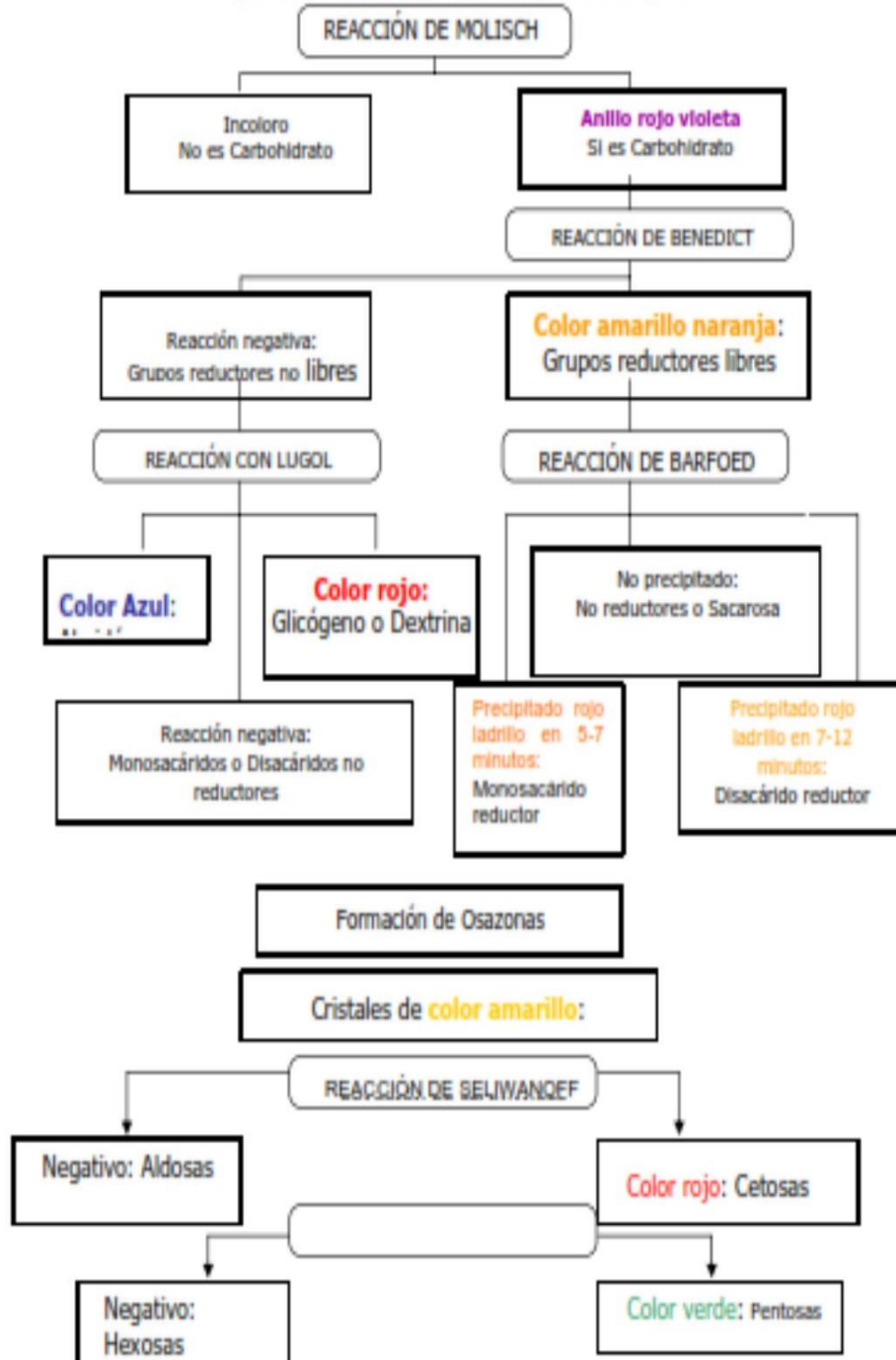
Muestra problema

El profesor le asignará una muestra problema para identificar y clasificar.

En un papel escriba el número de la muestra problema, las reacciones que utilizó y los resultados que obtuvo, diga si el problema corresponde a: un monosacárido, un disacárido, un polisacárido, un pentosa, una hexosa una cetosa una aldosa o una combinación de alguno de ellos y entréguelo antes de terminar el laboratorio.



Figura No 1 RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS



PARA EL INFORME

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	29 de 33

1. Elabore tablas con los resultados de los ensayos realizados.
2. Análisis de los resultados obtenidos en cada ensayo para la muestra problema, comparando con los resultados obtenidos para las soluciones patrón de carbohidrato correspondiente.
3. Con base en el análisis, caracterizar la sustancia problema; si es polisacárido, disacárido, monosacárido. En caso de ser disacárido o monosacárido si es o no reductor. Si se trata de un monosacárido indicar si es aldopentosa, cetopentosa, aldohexosa o cetohexosa.
4. Describa el análisis y las reacciones que siguió para identificar la muestra problema, si ya conoce el nombre del compuesto problema discuta los resultados reportados.

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.
- Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.

8. Bibliografía

1. Hart H., Craine L. y Hart. D. Química Orgánica. McGraw Hill. Novena edición. España. 1997.
2. McMurry, J. Química Orgánica. Quinta edición, Thomson editores, México, 2001
3. The Merck Index: an encyclopedia of chemical. Drugs and Biologicals. Budavari S. Guide for safety in the Chemical Laboratory.
4. Carey Francis A. Química Orgánica Mc Graw Hill , Tercera Edición . España. 2000

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	30 de 33

1. Título: RECONOCIMIENTO DE LIPIDOS

2. Objetivo

- Determinar el contenido de materia grasa en muestras de leche.
- Establecer el contenido de lípidos presentes en la leche.
- Aplicar algunas características importantes de los lípidos.

3. Marco Teórico

Los lípidos a diferencia de las proteínas y carbohidratos no son un grupo que posea una identidad en cuanto a estructura; en él encontramos moléculas con composición y función diversas, por ejemplo: vitaminas y ceras.

Los lípidos se definen usualmente como compuestos orgánicos que son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Están constituidos generalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. En algunos casos contienen además fósforo y nitrógeno.

Los lípidos constituyen uno de los componentes mayoritarios de los alimentos; adquieren importancia al formar parte de las membranas y paredes celulares, por su valor nutritivo y por el destacado papel tecnológico (emulsificante, transmisión de calor, etc.) que desempeñan. En términos generales, los lípidos de los alimentos presentan ácidos grasos de cadena lineal y número par de átomos de carbono, normalmente entre 12 y 24 carbonos.

Lo que caracteriza a los lípidos de la leche es la presencia de glóbulos de grasa emulsionados en el plasma acuoso. La estabilidad de la emulsión se debe a la existencia de una membrana envolvente lípido-proteica cargada negativamente, que impide la salida de la grasa de aceite y asegura la repulsión electrostática entre los diferentes glóbulos.

En un mililitro de leche hay unos 10.000 millones de glóbulos, cuyo diámetro varía de 0,1 a 20 micras con un valor medio de 3 a 5 micras.

En el centro del glóbulo se halla una gota de grasa compuesta por lípidos de bajo punto de fusión, que son líquidos a temperatura ambiente, y en la periferia se encuentran glicéridos neutros, fosfolípidos y proteínas. El ordenamiento de los constituyentes individuales no es fácil de definir, pero es fácil de imaginar el papel que juegan los fosfolípidos, que deben asegurar la transición entre la gota de glicéridos apolares, gracias a su extremo lipófilo (ácido graso) y la película proteica polar, gracias a su grupo hidrófilo (fosfato).

Igualmente, la membrana tiene gran cantidad de enzimas, tales como: xantín-oxidasa (25-75%), catalasa (<20%), fosfatasa alcalina (35-60%), fosfatasa ácida (<5%), lipasa, acetilcolinesterasa. La cantidad de enzimas presentes en la membrana varía en función de factores zootécnicos y tecnológicos.

Fundamento:

Este método es aplicable a las leches naturales, certificadas, higienizadas y esterilizadas, enteras o parcialmente desnatadas.

El contenido en materia grasa se determina gravimétricamente previa extracción de la citada materia grasa de una solución alcohólico-amoniacoal de la leche mediante éter etílico y éter de petróleo, evaporación de los disolventes y posterior pesada del residuo, según el principal método de Rose-Gottlieb.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	31 de 33

4. Materiales, Equipos e Insumos

Materiales

- Ampolla de decantación y aro (dos por grupo)
- Soporte, aro, malla y mechero.
- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Matraz de 250 ml de fondo plano.
- Vaso de precipitado de 100 ml.
- Varilla de vidrio.
- Termómetro de 0-50°C.
- Horno eléctrico
- Balanza de precisión.
- Equipo de destilación.

Reactivos

- Solución de amoníaco, de un 25% en P/V. 12 ml por grupo
- Etanol del 96%. 90 ml por grupo
- Éter etílico exento de peróxidos. 200 ml por grupo
- Éter de petróleo de punto de ebullición entre 40-60°C. 200 ml por grupo
- Muestras de leche.*

*Materiales que debe traer el estudiante para la práctica

Procedimiento

1. Preparación de la Muestra: Mezclar la muestra (15 ml a 20°C) cuidadosamente hasta obtener una distribución homogénea de la materia grasa. Si resulta dificultoso dispersar la capa de nata, calentar lentamente hasta 35-40°C, mezclando cuidadosamente y teniendo la precaución de reincorporar a la muestra la nata que pudiera adherirse a las paredes del recipiente; enfriar rápidamente la muestra hasta la temperatura ambiente.
2. Determinación: Secar un matraz de paredes delgadas y base plana con capacidad de 150-250 ml, en el horno eléctrico. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente y pesar en balanza de precisión.
3. Tomar de 10 a 11 gramos de la muestra (densidad media = 1.032, se puede medir exactamente 10 ml.), bien mezclada con aproximación del mg.
4. Añadir 1.5 ml de la solución de amoníaco al 25% y mezclarlo agitando enérgicamente.
5. Transvasarlo a una ampolla de decantación.
6. Añadir 10 ml de etanol y mezclar suavemente, pero de modo homogéneo.
7. Añadir 25 ml de éter dietílico, cerrar la ampolla y agitar suavemente.
8. Agregar 25 ml de éter de petróleo, agitando de nuevo. Se debe agitar suavemente ya que si no se forma una emulsión y no se separan las dos capas.
9. Dejar la ampolla en reposo hasta que las dos capas se hallan separado claramente.
10. Transvasar la capa acuosa a otra ampolla de decantación y la capa etérea se transvasa al matraz previamente tarado.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	32 de 33

11. Se hace una segunda extracción para agotar la grasa en la capa de agua repitiendo las operaciones descritas, pero utilizando solo 15 ml de éter dietílico y 15 ml de éter de petróleo.
12. Eliminar el máximo de disolvente mediante destilación.
13. Terminar la desecación en estufa a 100°C.
14. Dejar enfriar el matraz hasta temperatura ambiente y pesar en balanza de precisión.
15. Se realizará un ensayo en blanco con 10 ml de agua. Más de 0.5 mg de diferencia, comprobar reactivos.

*Los deshechos deben ir en el recipiente: orgánicos

Cálculos:

El contenido en materia grasa de la muestra, expresado en porcentaje de la masa es:

$$G \% = \frac{(M2 - M1) - (B2 - B1)}{S} \cdot 100$$

M1 = peso en gramos del matraz seco y vacío

M2 = peso en gramos del matraz con la materia grasa

S = peso en gramos de la cantidad de muestra utilizada

B1 y B2 = peso del matraz en el ensayo en blanco

Resultados:

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones repetidas no debe ser mayor de 0.03 g de materia grasa de 100 g de producto.

Nivel de riesgo:

Alto. Por lo tanto, deben tener cuidado al manipular los reactivos, tanto en el contacto con la piel, como con las inhalaciones. Deben usar lentes, guantes, tapabocas y la campana extractora.

Bibliografía:

- Belitz, H.D., Grosch, W. "Química de Alimentos" Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza 1997
- Bermúdez, A.S., Guzmán Rodríguez, R. "Química de Alimentos". Editorial UNISUR. Bogotá 1995
- Cheftel, J.C. "Introducción a la Bioquímica y Tecnología de Alimentos". Editorial Acribia. Zaragoza. 1999.
- Coulate, T.P. "Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos". Editorial Acribia. Zaragoza, 2002
- Fennema, O.R. "Química de Alimentos". Editorial Marcel Dekker. New York
- Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Fernández, L., García, M.L. García de Fernando, L. Selgas, M.D. "Tecnología de los Alimentos". Volumen I. Editorial Síntesis. Madrid 1998

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	33 de 33

- Miller D. D. "Química de Alimentos. Manual de Laboratorio". Traducido al español por Editorial Limusa, S.A. 2001