

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	1 de 21

## Practica N°1.

### 1. Preparación de soluciones amortiguadas y calibración de micropipeta.

### 2. Objetivos

- Familiarizar al estudiante con la técnica de calibración.
- Fortalecer el conocimiento de estudiante en preparación de soluciones buffer, al preparar soluciones con pH determinado.
- Aprender a comparar soluciones amortiguadas (soluciones buffer)

### 3. Marco Teórico

Los amortiguadores (también llamados disoluciones amortiguadoras, sistemas tampón o buffers) son aquellas disoluciones cuya concentración de protones apenas varía al añadir ácidos o bases fuertes [1].

### 4. Materiales, Equipos e Insumos.

Balanza analítica	1
Vaso de precipitados de 50mL y 100 mL	2 c/u
Balón aforado de 50mL	2
Potenciómetro	1
Frascos de vidrio tapa azul 50mL	2
Pipeta de 10mL	2
Bureta de 50mL	1
Pinza para bureta	4
Espátula	1
Frasco lavador	1
Embudo de vidrio	1
Pipeteador	1
Agitador magnético/magneto	1
Pipeta <i>Pasteur</i> de vidrio	1
Soporte universal	2
Pipeta de 5mL	2
Micropipetas con puntas	1
Frascos de vidrio tapa azul	2
Tubos falcón 15 mL	2

### 5. Reactivos

*Sustancia*

*Frases R/S\**

Fosfato de disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Cloruro de sodio NaCl

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

$\text{H}_2\text{O}$

NaOH

HCl

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	2 de 21

## 6. Procedimiento

### Parte I. Preparación de soluciones amortiguadas (Buffer).

- Realice los cálculos correspondientes para preparar la solución amortiguadora.
- Realizase una de las soluciones buffer.
- Para el primer buffer; adicione 0,7098 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1M a pH 8,0) en 50 mL de agua destilada usando un balón de aforo de 50 mL.
- Para el segundo buffer; adicione 0,11998 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 mM a pH 5,0) en 50 mL de agua destilada usando un balón de aforo de 50 mL.
- Para el tercer buffer; adicione 0,07306 g de EDTA (5 mM a pH 7,0) y 0,4383 g de NaCl (0,15M a pH 7,0) en 50 mL de agua destilada usando un balón de aforo de 50 mL.

### Parte II. Calibración de micropipeta.

- Tome una micropipeta de varianza de (10-100-1000) en unidades de microlitros ( $\mu\text{L}$ ), realizando 20 mediciones en intervalos bajo, medio y alto (decida las unidades en  $\mu\text{L}$  a trabajar)
- Para la realización de las mediciones (utilizando las unidades en  $\mu\text{L}$  teniendo en cuenta el inciso a.), utilice agua destilada como solución a medir; agregándola a un tubo de falcón de 15 mL.
- Una vez tomado el volumen en  $\mu\text{L}$ , lleve el tubo a la balanza analítica y con la ayuda del rollo de papel pese la cantidad de agua. Tome nota y reporte el resultado.
- Realiza nuevamente el inciso b y c hasta obtener las 20 mediciones requeridas.

## 7. Nivel de Riesgo

Bajo

## 8. Bibliografía

- Tomada el día 06/05/2019 a las 10:18 pm de la página web.  
<http://www.ehu.eus/biomoleculas/buffers/buffer.htm>.

## Practica N°2.

### Reproducibilidad de protocolos de soluciones y efecto de la concentración del ácido o base débil en la fuerza de una solución amortiguadora.

#### 2. Objetivos

- Analizar y llevar a cabo la reproducibilidad de protocolos.
- Identificar si se presentan errores en la reproducibilidad de un protocolo.
- Ganar habilidades en la titulación de ácidos y bases débiles con bases y ácidos fuertes respectivamente.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	3 de 21

- Comprender el efecto de concentración del ácido o base fuerte en la fuerza de una solución amortiguadora.

### 3. Marco Teórico

El proceso de titulación se basa en la neutralización que se lleva a cabo entre la disolución ácida y la básica. De esta manera, si se conoce la concentración de iones  $H^+$  de la disolución valorada, se puede inferir la concentración de iones  $OH^-$  de la disolución analizada. Esto se calcula a partir del volumen de disolución valorada utilizado.

En el momento en el que la concentración de  $H^+$  y  $OH^-$  se igualan, se dice que se ha alcanzado el punto de equivalencia. Para determinar este punto, se utiliza un indicador que se caracteriza porque tiene colores diferentes en medio ácido y en medio básico. El punto en que cambia el color de un indicador se llama punto final.

### 4. Materiales, Equipos e Insumos

Balanza analítica	1
Vaso de precipitados de 50mL y 100 mL	2 c/u
Balón aforado de 50mL	2
Potenciómetro	1
Frascos de vidrio tapa azul 50mL	2
Pipeta de 10mL	2
Bureta de 50mL	1
Pinza para bureta	4
Espátula	1
Frasco lavador	1
Embudo de vidrio	1
Pipeteador	1
Agitador magnético/magneto	1
Pipeta <i>Pasteur</i> de vidrio	1
Soporte universal	2
Pipeta de 5mL	2

### 5. Reactivos

<i>Sustancia</i>	<i>Frases R/S*</i>
$H_2O$	
HCl	3,0M
NaCl	
NaOH	4,0M
$Na_2HPO_4$	
$NaH_2PO_4$	
$C_2H_3NaO_2$	
$CH_3COOH$	

\* El estudiante debe consultarlas y escribirlas para cada uno de los reactivos.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	4 de 21

## 6. Procedimiento

### Parte I: Reproducibilidad de protocolos.

- Intercambie los protocolos elaborados la semana anterior con sus compañeros.
- Realice la solución amortiguadora siguiendo cada uno de los pasos (sin hacer ninguna modificación) del protocolo recibido y llene de manera simultánea el *protocolo de trabajo* entregado por su compañero.
- Analice los resultados en forma grupal.

### Parte II: Fuerzas de soluciones amortiguadoras.

- Elaborar los cálculos para 50mL de soluciones de Acetato de sodio y ácido acético, con distintas concentraciones.

Concentración 1: 0,2 M de  $C_2H_3NaO_2$  y 0,2M de  $CH_3COOH$

Concentración 2: 0,4 M de  $C_2H_3NaO_2$  y 0,4M de  $CH_3COOH$

Concentración 3: 0,8 M de  $C_2H_3NaO_2$  y 0,8M de  $CH_3COOH$

- Elabore dos soluciones de igual concentración para las que previamente realizó los cálculos.
- Titule 30mL de las soluciones elaboradas con NaOH (1M) o HCl (1M) adicionando 0.2mL de ácido o base fuerte por vez. Anote el valor de pH encontrado por el potenciómetro y continúe la titulación hasta pH ~ constante.

## 7. Nivel de Riesgo

Bajo

## 8. Bibliografía

No aplica

## 9. Anexos

NOTA: Intercambie los datos con sus compañeros para hacer el informe de laboratorio.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	5 de 21

### Practica N°3.

#### Reconocimiento cualitativo de aminoácidos proteicos y proteínas.

#### 2. Objetivos

Reconocer proteínas y aminoácidos mediante reactivos químicos específicos.  
Comprobar el efecto de algunos factores físicos y químicos sobre la estructura de las proteínas.

#### 3. Marco Teórico

Los aminoácidos son compuestos orgánicos formados por carboxilos y aminas. Estos compuestos se unen para formar proteínas y otras macromoléculas. Se dividen en dos grupos: esenciales y no esenciales.

Son sustancias cristalinas, casi siempre de sabor dulce; tienen carácter ácido como propiedad básica y actividad óptica; químicamente son ácidos carbónicos con, por lo menos, un grupo amino por molécula, 20 aminoácidos diferentes son los componentes esenciales de las proteínas. Aparte de estos, se conocen otros que son componentes de las paredes celulares. Las plantas pueden sintetizar todos los aminoácidos, nuestro cuerpo solo sintetiza 16 aminoácidos, estos, que el cuerpo sintetiza reciclando células muertas a partir del conducto intestinal y catabolizando las proteínas dentro del propio cuerpo.

Un aminoácido es una molécula que contiene un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) libres. Pueden representarse en general por NH<sub>2</sub>-CHR-COOH, siendo R un radical o cadena lateral característica de cada aminoácido.

Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano de manera autónoma. Por este motivo, dicho tipo de aminoácidos debe ser ingerido a través de los alimentos.

En términos generales, las funciones de los aminoácidos son las siguientes:

1. Regular el ciclo del sueño y vigilia.
2. Sintetizar hormonas.
3. Estimular la síntesis de proteínas musculares.
4. Mejorar la circulación de oxígeno en los músculos.
5. Regular la actividad cerebral (tales como los estados de alerta y las sensaciones de depresión)
6. Producir y almacenar energía.
7. Los aminoácidos esenciales son ocho: fenilalanina, triptófano, lisina, metionina, treonina, isoleucina, leucina y valina.

Los aminoácidos no esenciales son 12: glicina, alanina, serina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, arginina, tirosina, prolina e histidina.

#### 4. Materiales, Equipos e Insumos

- Pipeta 1mL, 5mL, 10 mL
- Pipeteador
- Mechero con soporte, soporte, malla y aro

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	6 de 21

- Tubos de ensayos flameables
- Pinzas
- Vaso precipitado 50 mL, 100 mL
- Vidrio reloj
- Espátula
- Balanza analítica
- Churrusco
- Gradilla

### 5. Reactivos

- |                             |                             |                   |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
| • NaOH 4 M                  | monobásico 0,5M             | • Valina          |
| • Nitroprusiato de sodio 1% | • Agua destilada            | • Glicina         |
| • Ácido nítrico             | • Papel indicador universal | • Alanina         |
| • Ninhidrina                | • Hidróxido de amonio 10 M  | • Serina          |
| • Reactivo millón           | • Fenilalanina              | • Cisteína        |
| • Nitrito de sodio 1%       | • Triptófano                | • Acido aspártico |
| • Sulfato de cobre 10 % m/v | • Lisina                    | • Acido glutámico |
| • Reactivo de sakaguchi     | • Metionina                 | • Asparagina      |
| • Fosfato de sodio          | • Treonina                  | • Glutamina       |
|                             | • Isoleucina                | • Arginina        |
|                             | • Leucina                   | • Tirosina        |
|                             |                             | • Prolina         |
|                             |                             | • Histidina       |

### Fuentes de proteínas adquiridas por el estudiante

- Lentejas
- Huevo
- Leche

### 6. Procedimiento

#### Parte I. reacción de Ninhidrina:

Colocar 1 mL de solución de aminoácido en un tubo de ensayo y ajustar el pH cercano a 7, agregar 5 gotas de la solución de ninhidrina y dejar hervir por 2 min.

#### Parte II. Reacción Xantoproteica.

Agregar volúmenes iguales de ácido nítrico a aproximadamente 0.5 mL de solución de aminoácido, dejar enfriar y observar el cambio de color. Agregar suficiente hidróxido de sodio hasta que la solución alcance alcalinidad. El cambio de color amarillo en solución acida a naranja brillante en solución básica, constituye un resultado positivo.

#### Parte III. Reacción de Millón.

A 1 mL de muestra agregar 5 gotas de reactivo de Millón y calentar en un baño de agua hirviendo por 10 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 5 gotas de nitrito de

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	7 de 21

sodio al 1%. La aparición de un color ladrillo da un resultado positivo.

**Parte IV. Prueba del nitroprusiato:**

Mezclar 2 mL de la muestra con 0,5 mL de nitroprusiato de sodio al 1%. Adicionar 40 gotas de hidróxido de amonio. Observar.

**Parte V. prueba de Biuret para enlaces peptídicos:**

A 2 mL de muestra agregar 5 gotas de la solución de sulfato de cobre al 10% m/v y luego 2 mL de hidróxido de sodio 10 M; mezclar vigorosamente y observar.

**Parte VI. Reactivo de Sakaguchi para la arginina.**

Colocar 2 mL de una muestra de proteína en un tubo de ensayo adicionarle 1 mL de hidróxido de sodio 2 N, mezclar bien y luego agregarle 2 gotas de reactivo de Sakaguchi.

**7. Nivel de Riesgo**

Bajo

**8. Bibliografía**

No aplica

**Practica N°4.**

**AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEASA**

**2. OBJETIVOS**

- Realizar el aislamiento de proteína en muestras vegetales tales como: tallo de la piña, higo y papaya por precipitación fraccionada.
- Realizar purificación (papaína, bromelina y la ficina), utilizando dos soluciones; etanol absoluto/ácido tricloroacético 5% y sulfato amonio (5, 3M).
- Estudiar el efecto de pH sobre la actividad de la proteasa papaína, bromelina y la ficina.

**3. MARCO TEORICO.**

El látex de Carica papaya es una fuente rica de endopeptidasas de cisteína, incluidas la papaína, la glicildendopeptidasa, la quimopapaína y la caricaína, que constituyen más del 80% de la fracción enzimática completa [1]. La papaína (EC 3.4.22.2) es un componente menor (5-8%) entre las endopeptidasas [1,2] de papaya.

La enzima se usa ampliamente como ablandador de carne y también tiene otras aplicaciones, por ejemplo, para desfibrar heridas, tratar edemas, lanas impermeables, etc.

La purificación de papaína a partir de látex de papaya se ha logrado tradicionalmente mediante los métodos de precipitación [3,4]. Sin embargo, la enzima purificada todavía está contaminada con otras proteasas. Una estrategia de purificación alternativa ha involucrado el uso de varias técnicas cromatográficas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico,

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	8 de 21

covalente o de afinidad.

La bromelina es un nombre general para una familia de enzimas proteolíticas de sulfhidrilo obtenidas de *Ananas comosus*, la planta de la piña. Por lo general, se distingue como bromelina de la fruta o bromelina del tallo, dependiendo de su origen, y toda la bromelina disponible en el mercado se deriva del tallo. El término bromelina se usará para referirse a la bromelina del tallo en el resto de este artículo. El componente primario de la bromelina es una fracción proteolítica de sulfhidrilo.<sup>5</sup>

La Ficina se deriva del látex extraído del *Ficus sp.*, este género incluye una gran variedad de árboles tropicales de higo. La Ficina es utilizada en la industria por su capacidad de cambiar la estructura de los productos cárnicos y harinas, así como por ser estabilizante. Por su actividad estabilizante la Ficina es capaz de mantener cierto estado fisicoquímico ideal en el alimento. Dentro de esta categoría hay ingredientes que permiten mantener homogéneo el alimento y otros que ayudan a mantener o intensificar algún color.

#### 4. Materiales, Equipos e Insumos

Balanza analítica	1
Vaso de precipitados de 50mL y 100 mL	2 c/u
Balón aforado de 50mL	2
Potenciómetro	1
Frascos de vidrio tapa azul 50mL	2
Pipeta de 10mL y 5mL	2
Bureta de 50mL	1
Pinza para bureta	4
Espátula	1
Frasco lavador	1
Embudo de vidrio	1
Pipeteador	1
Agitador magnético/magneto	1
Pipeta <i>Pasteur</i>	5
Soporte universal	2
Pipeta de 5mL	2
Vidrio reloj	2
Papel filtro	
Centrifugadora	
Erlenmeyer 100mL	2
Mortero y pistilo	1

#### 5. Reactivos

- Etanol absoluto
- Ácido acético  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- Ácido tricloroacético
- Di hidrógeno fosfato de sodio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	9 de 21

- Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- NaOH 4M,
- HCl 2M
- Agua destilada
- Tris- Base
- Hidrogeno fosfato de sodio  $\text{NaHPO}_4$
- Acetato de sodio  $\text{CH}_3\text{COONa}$
- Piña (verde) (1 corazón)
- Papaya verde (1)
- Higo verde (5 unidades)
- 1 sobre Gelatina sin sabor

## 6. PROCEDIMIENTO

### Parte 1: Soluciones amortiguadores

a. Realice los cálculos para cada elaborar 50 mL de cada una de las siguientes soluciones:

1. 280mM de Hidrogeno fosfato de sodio, 280mM de Dihidrógeno fosfato de sodio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a pH 7,0 (pKa es 7.20)
2. 280mM de Ácido acético, 280mM de Acetato de sodio pH 5.0 (pKa 4.75)
3. 280mM de Tris-Base a pH 8,0 (8.1 at 25°C)
4. HCl 2 M
5. NaOH 4M

b. Realizar titulación acido-base, para restablecer en las soluciones buffer el pH requerido, usando la solución de NaOH 4M como base y solución de HCl 2M como acido. Para las soluciones acético / acetato e hidrogeno fosfato / di hidrógeno fosfato.

c. Una vez elaborada la solución buffer rotúlela adecuadamente y manténgala refrigerada hasta el próximo laboratorio.

d. Medir 50 mL de etanol absoluto en un vaso precipitado de 50 mL y adicionarle ácido tricloroacético a un 5%.

e. Preparar una solución de sulfato de amonio a concentración 5,3 M en agua destilada aforado a 50 mL.

f. Una vez elaborada las soluciones, rotúlelas adecuadamente y manténgalas refrigerada hasta el próximo laboratorio.

**Nota:** La refrigeración se realiza solo si no alcanza a hacer el aislamiento el mismo día, si es el caso, un día antes de realizar el aislamiento saqué del refrigerador las soluciones; ya que se deben encontrar a temperatura ambiente.

### Parte 2. aislamiento de proteínas por precipitación fraccional

#### 2.1. aislamiento de bromelina en piña

a. Lavar la muestra con abundante agua, luego secarla usando papel toalla para evitar los productos contaminantes.

b. Una vez lavada la piña picar la muestra en cuadrado muy pequeños y macerar en 5mL de buffer acético/acetato hasta tener una mezcla homogénea y fíltrela.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	10 de 21

- c. Tome 8 mL del filtrado en un tubo falcón y adicionar lentamente y en baño de hielo 8 ml de solución de etanol-tricloroacético. Agitar por 15 minutos y llevar a centrifugación a 4000 rpm por 10 min.
- d. Transfiera el sobrenadante a un tubo falcón y adicionar 8mL de la solución de etanol-tricloroacético en la misma forma que en literal C. Centrifugue de nuevo por 10 minutos a 4500 rpm.
- e. Tome 8 mL del filtrado en un tubo falcón y adicionar lentamente y en baño de hielo 8 ml de solución de Sulfato de amino. Agitar por 15 minutos y llevar a centrifugación a 4000 rpm por 10 min.
- f. En un vidrio reloj agregar una porción de gelatina preparada; la gelatina se prepara utilizando 50 mL de agua destilada, en la cual se disuelve el sobre de gelatina.
- g. Vierta 5mL de la gelatina caliente en los vidrios de reloj que contienen 10mL de cada una de las soluciones amortiguadoras preparadas con anterioridad revolver las mezclas con rapidez para evitar burbujas que afecten la visión de la actividad proteica una vez empiece a gelificar deje de revolver ya que puedes dañar el todo el ensayo.
- h. En cada uno los vidrios colocar una gota (filtrado) o pizca (precipitado y solido) de cada uno de los sobrenadantes y precipitados, luego deje en refrigeración.
- i. Evaluar el efecto 2h, 4h, y 24h después.

## **Parte 2.2. aislamiento de papaína (látex) en papaya.**

- a. Seleccionar un fruto verde.
- b. Lavar la muestra con abundante agua, luego secarla usando papel toalla para evitar los productos contaminantes. Una vez lavada, para la extracción de látex de la muestra realizar cuatro incisiones de aproximadamente 2 mm de espesor máximo, se recomienda no hacer más de cuatro incisiones al mismo tiempo.
- c. Al realizar las incisiones colocar un vaso precipitado de 100 mL debajo de la muestra de papaya para la recolección de látex. Realizar este paso lo más rápido posible para evitar la pérdida de su actividad proteolítica.
- d. Una vez obtenida la muestra procesada realizar el mismo procedimiento de la parte 2.1 escritos del inciso c al inciso i.

## **Parte 2.3. aislamiento de ficina (látex) en Higo.**

Realizar el mismo procedimiento parte 2,2.

## **7. NIVEL DE RIESGO**

Mediano. Usar implementación adecuada en el laboratorio para evitar irritaciones o accidentes de toxicidad.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. zarkan M, Moussaoui AE, van Wuytswinkel D, Dehon G, Loo ze Y. Fraccionamiento y purificación de las enzimas almacenadas en el lat ex de Carica papaya. J Chromatogr 2003; 790: 229–38.
2. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Introducción: cisteína peptidasas y sus clanes. En: Manual de enzimas proteolíticas. San Diego: Prensa Académica; 1998. p. 545–6.
3. Kimmel JR, Smith EL. La papaína cristalina: preparación, especificidad y activación. J

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	11 de 21

BiolChem 1954; 207: 515–31

4. Baines BS, Brocklehurst K. Una modificación necesaria para la preparación de papaína a partir de cualquier látex de alta calidad de Carica papaya y evidencia de la integridad estructural de la enzima producida por los métodos tradicionales. Biochem J 1979; 177: 541–8.

5. Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem J 1990; 266:869-875.

## Practica N°5.

### Análisis cuantitativo de la vitamina C contenida en los alimentos.

#### 2. Objetivos

- Determinar la cantidad de vitamina C que está presente en ciertos productos alimenticios comerciales mediante el método de titulación.

#### 3. Marco Teórico

El ácido ascórbico se conoce comúnmente como vitamina C. Fue una de las primeras vitaminas que desempeñó un papel en el establecimiento de la relación entre una enfermedad y su prevención mediante una dieta adecuada. El escorbuto de la enfermedad se conoce desde hace siglos, por Jacques Cartier, un explorador del siglo XVI en el continente americano dio una descripción vívida: “Algunos perdieron su fuerza y no pudieron mantenerse de pie. . . Otros . . . Tenían su piel manchada con manchas de sangre. . . su boca se volvió apesetosa, sus encías tan podridas que toda la carne se desprendió ”.

La prevención del escorbuto se puede obtener al comer verduras y frutas frescas. El ingrediente activo en frutas y verduras que ayuda a prevenir el escorbuto es el ácido ascórbico. Es un poderoso antioxidante biológico (agente reductor). Ayuda a mantener el hierro en la enzima, prolil hidroxilasa, en forma reducida y, por lo tanto, ayuda a mantener la actividad de la enzima. La prolil hidroxilasa es esencial para la síntesis de colágeno normal. En el escorbuto, el colágeno anormal causa lesiones en la piel y vasos sanguíneos rotos.

El requerimiento cuantitativo humano de la vitamina C aún es controvertido y requiere más investigación. En este experimento, la cantidad de vitamina C se determina cuantitativamente mediante la titulación de la solución de prueba con una forma soluble en agua de yodo I<sup>3-</sup>.

#### 4. Materiales, Equipos e Insumos

Vaso de precipitados de 50mL y 100 mL	2 c/u
Potenciómetro	1
Pipeta de 10mL	2
Bureta de 50mL	1

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	12 de 21

Pinza para bureta	4
Espátula	1
Frasco lavador	1
Embudo de vidrio	1
Probeta 100mL	1
Erlenmeyer 50mL	2
Erlenmeyer 100mL	1
Pipeteador	1
Agitador magnético/magneto	1
Pipeta <i>Pasteur</i>	3
Soporte universal	1
Pipeta de 5mL	2

## 5. Reactivos

*Sustancia*

H<sub>2</sub>O

HCl 3,0M

Solución de almidón 2%

Yodo en yoduro de potasio 0,01M (Lugol).

Bebida de Frutas manzana, naranja y toronja, pero no oscura, como la uva.

Algodón.

Papel filtro.

\* El estudiante debe consultarlas y escribirlas para cada uno de los reactivos.

## 6. Procedimiento

- Vierta aproximadamente 60 mL de una bebida de frutas que desee analizar en un vaso de precipitados limpio y seco de 100 mL. Medir el pH inicial de la bebida.
- Con una pipeta transfiera 10,00 mL de la bebida de frutas a un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Luego agregue 20 mL de agua destilada, 5 gotas de HCl 3 M (como catalizador) y 10 gotas de solución de almidón al 2% en el matraz.
- Sujete una bureta de 50 mL limpia y seca en el soporte de la bureta. Enjuague la bureta dos veces con porciones de 5 ml de solución de yodo. Deje que los enjuagues pasen por la punta de la bureta y deséchelos. Llene la bureta ligeramente por encima de la marca cero con una solución de yodo estandarizada. Registrar la molaridad de la solución de yodo estandarizada. Registre la lectura inicial de la solución de yodo estandarizada a los 0.02 mL más cercanos.
- Coloque el matraz que contiene la muestra de vitamina C debajo de la bureta y agregue la solución de yodo gota a gota, mientras gira, hasta que el indicador cambie a azul oscuro. Este color debe persistir durante al menos 20 segundos. Registre la lectura final de la bureta y el pH final.
- Calcule el volumen total de solución de yodo requerido para la titulación, el peso de vitamina C en la muestra y el porcentaje (p / v) de vitamina C en la bebida. Repita

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	13 de 21

este procedimiento de titulación dos veces más, excepto que use porciones de 20 y 30 mL de la misma bebida de frutas en lugar de 10 mL. Registre los volúmenes de solución de yodo que se requieren para cada titulación.

## 7. Nivel de Riesgo

Bajo

## 8. Bibliografía

No aplica

### Practica N°6.

## RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS.

### 2. OBJETIVOS

- Detectar la presencia de carbohidratos en una muestra problema.
- Identificar carbohidratos según su poder reductor.
- Aplicar reacciones específicas que permitan la identificación de carbohidratos en una muestra problema.
- Identificar pentosa y hexosas
- Reconocimiento de carbohidratos en celulosas.

### 3. MARCO TEORICO.

Las pruebas para la determinación de los carbohidratos pueden ser generales como la reacción de Molisch, la cual no discrimina el tipo de carbohidrato analizado, o específicas si el resultado final logra la identificación de un carbohidrato en particular. Independientemente de la prueba a que se haga referencia, existen dos propiedades que sirven de fundamento a la mayoría de éstas. La primera es la formación en medio ácido de compuestos conocidos como derivados furfúricos. Estos se producen al “deshidratar” los azúcares mediante la aplicación de calor y la exposición a un medio fuertemente ácido.

Estos derivados furfúricos reaccionan con compuestos fenólicos como el  $\alpha$ -naftol, el orcinol, el resorcinol o la antrona, para formar cromógenos que evidencian la positividad de las reacciones. El tipo de compuesto fenólico utilizado dependerá del tipo de carbohidrato a determinar y por lo tanto de la reacción que se esté realizando.

### 4. Materiales, Equipos e Insumos

Vaso de precipitados de 50mL y 100 mL	2 c/u
Pipeta de 10mL	2
Tubos de ensayo	10
Pinza para tubo de ensayo	4
Espátula	1
Frasco lavador	1

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	14 de 21

Gradilla	1
Pipeteador	1
Pipeta <i>Pasteur</i>	5
Soporte universal	1
Pipeta de 5mL	3
Vidrio reloj	2

## 5. Reactivos

### Sustancia

- $\alpha$ -naftol al 10%
- Agua o destilada
- Ácido sulfúrico concentrado  $H_2SO_4$
- Ácido clorhídrico concentrado  $HCl$
- Ácido pícrico saturado
- $Na_2CO_3$  1M
- disolución acidad de cobre
- Reactivo de Tollens (Floroglucina).
- Reactivo de Seliwanoff (resorcinol/ $HCl$ )
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Barfoed
- Reactivo de fosfomolibdico.
- Reactivo de Bial

\* El estudiante debe consultarlas y escribirlas para cada uno de los reactivos.

### Muestra problema

- una bebida refrescante que diga que es baja en azúcar.
- un insecto (lo suficiente mente grande para que alcance para todas las pruebas).
- un edulcorante (stevia, aspartame, splenda, etc)

## 6. Procedimiento.

### Reacción de Molisch

- Pipetear en un tubo de ensayo 2 ml de disolución problema
- Añadir 2 gotas de  $\alpha$ -naftol al 10% y se mezclar bien.
- Con una pipeta se dejan resbalar por la pared del tubo de ensayo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado con mucho cuidado procurando que no se mezcle para que forme una capa bajo la disolución de problema.

En la superficie de separación de ambas capas se producirá la deshidratación de la muestra y su reacción con el  $\alpha$ -naftol formará un anillo de color oscuro en dicha interfase. Molisch positivo: anillo oscuro.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	15 de 21

### Reacción de Braun

- Añadir en un tubo de ensayo con 4 ml de disolución problema seguidamente adicionar 2ml de Ácido pícrico saturado (ojo, muy venenoso). Agitar vigorosamente.
- Adicionar 2ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Calentar a ebullición.
- Si el test es positivo, el color amarillo pasa a rojo.

### Prueba de Barfoed

- Pipetear en un tubo de ensayo, agregar un 1ml de disolución problema y 1 ml de disolución acidad de cobre, añadir 1 ml del reactivo de fosfomolibdico. Calentar a ebullición durante 3 minutos.
- Si la prueba es positiva aparece un color azul oscuro muy intenso.

### Prueba de Seliwanoff

- En un tubo de ensayo se añadir 1ml de reactivo Seliwanoff (resorcinol/HCl) en 1ml de disolución problema.
- Hervir durante 1 minuto en el baño a ebullición.
- La aparición de un color rojo o un precipitado rojo es indicativa de la presencia de cetosas.

### Prueba de Tollens

- Añadir en un tubo: 2 ml Disolución de problema, 2ml de HCl (concentrado) 2 ml, 0,1 ml de Floroglucina (Tollens).
- Calentar a ebullición. El color puede aparecer hasta 5 minutos después de calentar.

### Reacción de Benedict

- Pipetear en un tubo de ensayo; 5 ml de reactivo de Benedict, añadir 1 ml de la disolución problema, mezclar bien, calentar a ebullición por 3 min aproximadamente.
- Si la reacción es positiva aparece un precipitado rojizo, aunque si la cantidad de la muestra problema es pequeña puede dar color anaranjado o verdoso.

### Reacción de Bial

- Rotule dos tubos de ensayo (1 y 2)
- Agregar 2 mL del carbohidrato al tubo 1 y 2 mL del compuesto desconocido al tubo 2. Colocar 2 mL de reactivo de Bial a los dos tubos. Calentar los tubos en baño de agua hirviente por 5 minutos.
- La reacción es positiva cuando aparece una coloración azul-verdosa que indica la presencia de pentosas.

### Reacción de Fehling

- Mezclar en un tubo de ensayo: 2 ml Fehling A ( $\text{CuSO}_4$ ) y 2 ml Fehling B (Tartrato/ $\text{NaOH}$ ). Agitar y calentar a ebullición (aproximadamente 1 min). Añadir 1 ml de la disolución de problema y hervir durante un minuto.
- Si se reduce el cobre se forma un precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$  de color rojizo. Fehling positivo: color rojizo.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	16 de 21

## 7. NIVEL DE RIESGO

Mediano. Usar implementación adecuada en el laboratorio para evitar irritaciones o accidentes de toxicidad.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alemany, M; Font, S. Práctica de Bioquímica. Edit Alhambra. España, 1983.
- J.M. Clark. Bioquímica experimental. 1966.
- Pavia, Donald; Lampman, Gary; Kriz George. Introduction to organic laboratory techniques. Saunders editores. 1976.
- Robyt, John; White Bernard. Biochemical Techniques. Waveland Press. 1987

### Practica N°7.

#### Fermentación alcohólica de distintos carbohidratos.

#### 2. Objetivos

Llevar a cabo la fermentación alcohólica de distintos carbohidratos, al igual que determinar la cantidad que quede CO<sub>2</sub>, que genera la fermentación de cada carbohidrato.

#### 3. Marco Teórico

Fermentación alcohólica es el proceso anaerobio realizado por algunos microorganismos que procesan carbohidratos para producir ATP y además producen compuestos de desecho como dióxido de carbono y etanol. Tiene un amplio empleo en la industria alimenticia, como por ejemplo es utilizada para la elaboración de panes, vinos, cervezas etc.

La fermentación se da en plena ausencia de aire (oxígeno - O<sub>2</sub>), originado por la actividad de algunos microorganismos, entre ellos el *Saccharomyces Cerevisiae*, que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

#### 4. Materiales, Equipos e Insumos

Balanza analítica	1
Vaso de precipitados de 50mL y 100 mL	2 c/u
Potenciómetro	1
Pipeta de 10mL	2
Espátula	1
Frasco lavador	1
Embudo de vidrio	1
Pipeteador	1
Soporte universal	2
Pipeta de 5mL	2

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	17 de 21

Mechero	1
Varilla de agitación	1
Probetas	2
Mangueras	2
Globos	
Vaso precipitado 250 mL, 600 mL	2
Erlenmeyer con desprendimiento lateral con corchos	2

## 5. Reactivos

Agua Destilada.  
 Sulfato de Amonio.  
 Glucosa.  
 Sacarosa.  
 Maltosa.  
 Almidón (maicena o harina de platano).  
 Lactosa.  
 Levadura.

## 6. Procedimiento

### Preparación de la solución de suspensión de levadura.

En un vaso precipitado de 250mL se le agrega 10g de levadura, se le adiciona 0,1g de sulfato de amonio y se disuelve con 100mL de agua destilada y se agita.

### Preparación del almidón.

Para el almidón se manejará en 2 partes una porción cruda y una a la cual se le hará un tratamiento térmico.

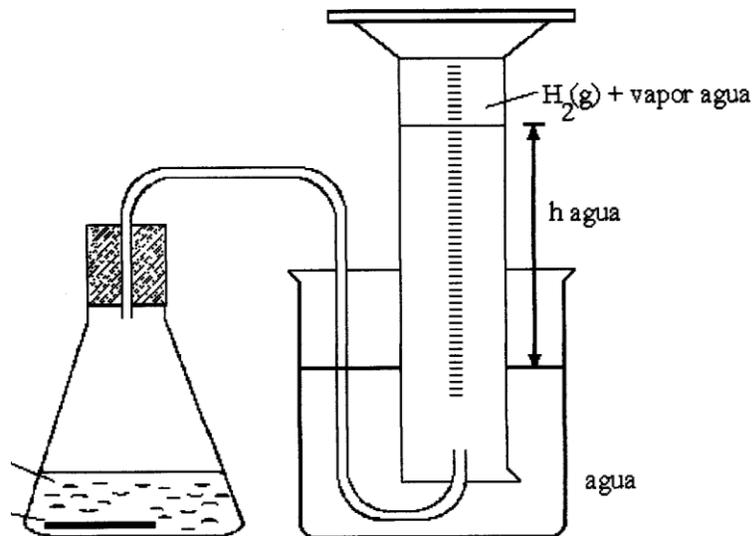
Se tomará una parte del almidón y se adicionará a un vaso precipitado de 250mL y se le adicionará agua destilada, se llevará a calentamiento para cocinar el almidón por un corto tiempo.

### Fermentación de Carbohidratos.

En un Erlenmeyer con desprendimiento lateral, se le adiciona 0,5g de Glucosa, junto con 5mL de agua destilada y se agita, posteriormente adicionarle al Erlenmeyer 10mL de la solución de suspensión preparada de la levadura. Se toma un valor de pH inicial y se lleva a baño maría.

Se tomará medidas de pH y volumen de las soluciones en tiempos de 1 hora y media, 3 horas, 24 horas y 30 horas.

El Erlenmeyer debe estar acoplado a un montaje de recolección de gases, para poder determinar la cantidad de CO<sub>2</sub>, que se produce en la reacción, en su defecto puede utilizarse un globo para captar el CO<sub>2</sub> y posteriormente medirlo.



Se repite los anteriores pasos con distintos Carbohidratos (Sacarosa, Maltosa, Lactosa) con la misma cantidad de 0,5g del Carbohidrato.

En un Erlenmeyer se adiciona 0,5g de almidón crudo junto con 1g de glucosa, se le adiciona 5mL de agua destilada y se agita, posteriormente adicionarle al Erlenmeyer 10mL de la solución de suspensión preparada de la levadura.

En un Erlenmeyer se agregan 0,5g de almidón cocido con 1g de glucosa y se realiza el mismo tratamiento de los carbohidratos anteriores.

## 7. Nivel de Riesgo

Bajo

## 8. Bibliografía

No aplica

## Practica N°8.

### EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y CROMATOGRFIA EN CAPA FINA

#### 2. OBJETIVOS

- Identificar lípidos en muestras de origen animal
- Por medio de capa fina determinar los tipos de lípidos
- Hacer las respectivas extracciones de lípidos en las muestras.

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	19 de 21

### 3. MARCO TEORICO.

Los lípidos son un grupo de compuestos biológicos que se clasifican conjuntamente por su estructura, están formados por átomos de carbono, hidrogeno y oxígeno, también se puede encontrar en ellos nitrógeno, fosforo y azufre. Generalmente son compuestos apolares esto hace que sean poco solubles en agua y se extraen mediante solventes orgánicos.

Existen diversos tipos de lípidos los cuales adquieren distintas estructuras y funciones, algunos de ellos son:

- Los ácidos grasos constan de una cadena alquílica con un grupo carboxílico terminal siendo la configuración más sencilla la de una cadena lineal completamente saturada, los ácidos grasos se encuentran principalmente en forma de ésteres del glicerol, es decir, formando monoglicéridos, diglicéridos, y triglicéridos. Los ácidos grasos en su forma "libre" (no esterificada) pueden ser fuente de energía para el organismo.

- Diglicérido: Tiene dos radicales de ácidos grasos y existe en las formas 1,2 o 1,3 dependiendo de las posiciones donde los ácidos grasos se unen a la molécula de glicerol.

- Triglicérido: Consiste en una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos. Los triglicéridos son los constituyentes principales de los aceites vegetales y las grasas animales. Los triglicéridos tienen densidades más bajas que el agua (flotan sobre el agua), y pueden ser sólidos o líquidos a la temperatura normal del ambiente. Cuando son sólidos se llaman "grasas", y cuando son líquidos se llaman "aceites". Los triglicéridos son una forma fundamental de almacenamiento de energía.

- Colesterol: Son derivados del anillo del ciclopentanoperhidrofenantreno. A estos compuestos se los conoce con el nombre de esteroides. Las células de todo el cuerpo utilizan el colesterol para producir una serie de hormonas importantes e imprescindibles para el crecimiento y la reproducción. El colesterol es un componente vital para la formación de nuevas paredes celulares en diferentes partes del cuerpo. Además, también es un ingrediente esencial de la bilis producida en el hígado, que más adelante pasa al intestino para ayudar a digerir las grasas.

- Los fosfolípidos: Son los componentes primarios de las membranas celulares. En su estructura química podemos observar una molécula de glicerol, dos ácidos grasos, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Los fosfolípidos son anfipáticos, esto es que son simultáneamente hidrofílicos e hidrofóbicos. En efecto, una parte de su estructura es soluble en agua (hidrofílica), mientras que la otra, es soluble en lípidos (hidrofóbica).

### 4. Materiales, Equipos e Insumos

Balanza analítica	1
Espátula	1
Frasco lavador	1
Gradilla	1
Micropipetas (P20, P200 y P1000)	1



Tips para micropipetas

Tubos eppendorf 5

Centrifuga

Placas para cromatografía en capa fina de 20 x 20 cm cubiertas con Silicagel 60 G (Wathman Silicagel 60 G) de 0,20 mm de espesor

Vidrio reloj 2

Vaso precipitado de 50 mL 2

Pipeta de 1mL 2

Pipeteador

Varilla de agitación

Capilares

## 5. Reactivos

- Muestra animal
- Cloroformo
- Metanol
- Agua destilada
- Solvente de corrida: cloroformo: metanol: acético: agua (65:25:4:2)
- I<sub>2</sub> (iodo) en forma gaseosa como revelador
- Colesterol
- Oleico
- Linoleico
- Palmítico

## 6. Procedimiento

- a. Se tomó el tubo eppendorf con la muestra (bazo) previamente pesada y se agregó 0,6 ml de metanol.
- b. Se utilizó un tip de micropipeta para triturar la muestra de tejido.
- c. Se agregó 0,3 ml de cloroformo y se agito el tubo durante 15 minutos.
- d. Se agregó 0.3 ml de cloroformo y se agito.
- e. Se centrifugo durante 5 minutos a 10.000 rpm.
- f. Se extrajo el sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo.
- g. Se adiciono 0,3 ml de agua y se centrifugo durante 5 minutos a 10.000 rpm.
- h. Se extrajo la fase acuosa y se la coloco en un tubo previamente tarado.
- i. Se sembró una gota de la muestra en la placa para cromatografía previamente preparada por el instructor.
- j. Se colocó la placa en un recipiente con solvente durante 45 minutos.
- k. Se colocó la placa en un recipiente junto con iodo (I<sub>2</sub>) para iniciar el revelado.

## 7. NIVEL DE RIESGO

	<b>Guía Unificada de Laboratorio de Bioquímica.</b>	<b>Código</b>	FLA-23 v.00
		<b>Página</b>	21 de 21

Mediano. Usar implementación adecuada en el laboratorio para evitar irritaciones o accidentes de toxicidad.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002
- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York: W.H. Freeman & Co.; c1999.
- Cox, M.M. y Nelson, D.L (2009). (5ª edición). Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed.: Omega