



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias

Licenciatura en Biología

Manual de prácticas de Bioquímica Básica

Dra. Catalina Arenas Huertero

Ilustración de portada tomada de openstructure.org

Indice

Prefacio	3
Reglamento	4
Determinación cuantitativa de la concentración de CuSO₄ mediante espectroscopía de absorción molecular UV-VIS.....	6
Identificación de carbohidratos, reacciones características	11
Hidrólisis del almidón	14
Determinación de lípidos totales de diferentes órganos de pollo y cuantificación de colesterol.....	18
Separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en papel.	21
Extracción, cuantificación de proteínas.....	23

Prefacio

*“La bioquímica es el estudio de la vida en el nivel molecular. Por tanto, consiste en el estudio de las estructuras y las interacciones de átomos y moléculas con la biología de las estructuras y las interacciones de células y organismos; por lo anterior es que “la vida” en su nivel más básico es un fenómeno bioquímico”.*¹

Este manual de prácticas del laboratorio de Bioquímica Básica, es una compilación y adaptación de prácticas que pueden ser desarrolladas acorde con la infraestructura presente en la Facultad de Ciencias, UASLP. Complementan el estudio de cada una de las biomoléculas que se revisan en el programa de estudios de la materia. Consta de 6 prácticas en las que se da una breve introducción, objetivo, material a utilizar, así como el procedimiento y un cuestionario a resolver.

Es importante resaltar que se estimula al estudiante a familiarizarse con las metodologías generales cualitativas y cuantitativas para analizar las moléculas dependiendo sus características químicas. También se establece que además de la realización de la práctica, el estudiante ensaye la elaboración de un reporte por escrito, en donde se establezca una breve introducción, objetivo, hipótesis, reporte de resultados y análisis de ellos; finalizando con una conclusión y resolución del cuestionario.

Este material se encuentra adecuado para los programas de estudio en donde se imparte Bioquímica general.

1. Donald Voet, Judith G Voet. 2006, Bioquímica, (Silva Rondinone, Diana Klajn y M. V. Preciado) 3ra ed. EDITORIAL MEDICA PARAMERICANA. ARGENTINA. 1763pp.

Reglamento de laboratorio.

1. Para ingresar al laboratorio, es obligatorio el uso de la bata reglamentaria (blanca, de algodón y manga larga) debidamente abrochada y de su manual instructivo.
2. Para el desarrollo de la práctica se deberá portar zapato cerrado cómodo y seguro. Cuando se le indique deberá usar cubre boca y/o careta, guantes y lentes de seguridad.
3. Evitar el uso de joyas (anillos, pulseras, dijes, aretes largos, etc.) que puedan reaccionar con los productos químicos o que puedan engancharse en materiales o equipos. Además, es requisito traer el pelo recogido y las uñas cortadas para evitar contaminación.
4. El tiempo de tolerancia para llegar y entrar al laboratorio será establecido por el maestro (a) y/o instructor.
5. Los útiles y pertenencias que no cumplan un contenido en la práctica, deberán ser colocados en el lugar indicado por el maestro (a) y/o instructor.
6. Al iniciar y terminar cada práctica, deberá limpiar su mesa de trabajo dejándola en el orden en que le fue entregada. En caso de trabajar con muestra biológicas el área de trabajo se desinfectará con benzal o algún germicida que le sea proporcionado por el maestro (a) y/o instructor.
7. Jamás deberá iniciar una práctica sin estar seguro de lo que se va a hacer, por lo que será su obligación leer previamente el manual y atender las indicaciones del maestro (a) y/o instructor.
8. Antes de empezar la práctica le será confiado material del laboratorio el cual tendrá que devolver al final de la misma. En algunas ocasiones, tendrá que aportar materiales o sustancias que sean requeridas para el desarrollo de una práctica particular.
9. Antes de empezar la práctica, deberá verificar la identidad de los productos químicos y biológicos. No deberá oler ni probar los reactivos o productos químicos-biológicos que desconozca. No pipetear con la boca.
10. Por su seguridad queda estrictamente prohibido fumar y consumir alimentos o bebidas durante el desarrollo de las prácticas. De igual forma, queda prohibido llevarse cualquier tipo cosas a la boca dentro del laboratorio.
11. Las prácticas deberán ser realizadas en orden ocupando el lugar asignado en las mesas de trabajo y no deberán desplazarse a otras mesas interviniendo en el trabajo de sus compañeros.
12. La práctica se debe desarrollar con limpieza evitando derramar sustancias en la mesa de trabajo y etiquetando debidamente las soluciones preparadas.
13. En caso de romper o derramar material contaminado, vierta inmediatamente el germicida proporcionado en el laboratorio y deje actuar al menos 10 min. Antes de limpiar el área avise a su supervisor. De igual forma, en caso de algún accidente (cortadura, salpicadura con material contaminado o algún reactivo, quemadura, entre otros) avise a su supervisor.
14. En ocasiones, es necesario reconocer alguna sustancia por su olor. La manera adecuada de hacerlo consiste en abanicar, con la mano, hacia la nariz un poco de vapor y aspirar indirectamente (nunca inhalar directamente del recipiente).
15. Jamás se deben verter los desechos a los lavabos, sino en los recipientes correspondientes asignados por el instructor.
16. Bajo ninguna excusa se permitirá el ausentarse de la práctica.
17. No se permitirán visitas ajenas al laboratorio durante el desarrollo de la práctica.
18. Al término de la práctica, deberá cerciorarse que las llaves de gas, vacío y agua queden perfectamente cerradas.
19. Lavarse las manos al entrar y al salir del laboratorio. El lavado también debe incluir los guantes usados colocándolos en el recipiente adecuado para su desecho.

Determinación cuantitativa de la concentración de CuSO_4 mediante espectroscopía de absorción molecular UV-VIS.

Laboratorio de Química

Conceptos a revisar:

Absorbancia, ley de Lambert-Beer, dilución.

Introducción

1. Espectroscopía

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

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

$$A = \epsilon c l$$

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

Otra definición sobre la absorbancia está dada por la siguiente expresión:

$$A = \log (I_0/I)$$

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

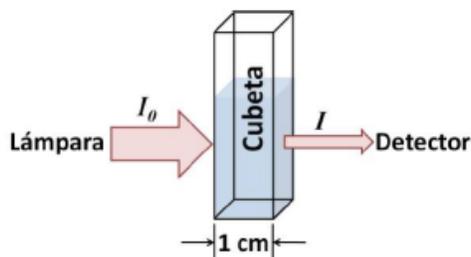


Figura 1. Arreglo interno típico de una cubeta en el espectrofotómetro. Esquema

tomado de “Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica”, Universidad Industrial de Santander. España, 2013.

UN DATO IMPORTANTE PARA TOMAR EN CUENTA: “Valores de absorbancia mayores a 2 no son confiables porque muy poca luz está alcanzando el detector para permitir mediciones acertadas. Cuando se realizan las mediciones, si el valor de absorbancia es mayor de 2, se debe diluir la muestra y realizar las mediciones nuevamente.

La lectura en el espectrofotómetro también puede ser interferida por las huellas presentes en las caras ópticas de la cubeta, así como también por las burbujas de aire o presencia de sólidos en la solución, afectando los valores reales de la medición. Así que antes de realizar la lectura, se debe tomar en cuenta estos aspectos.

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

Los espectrofotómetros tienen capacidad de medir absorbancia a valores específicos de longitud de onda. El método usado más comúnmente involucra un monocromador que permite descomponer la luz incidente en sus componentes con diferentes longitudes de onda y de esta forma escoger una longitud de onda a la cual una muestra dada absorbe con mayor intensidad. La capacidad para medir la absorbancia a diferentes longitudes de onda es muy útil porque el coeficiente de extinción varía al variar la longitud de onda. Además, el espectro de absorbancia puede variar dependiendo de la composición química del compuesto y el ambiente (solvente) alrededor de este.

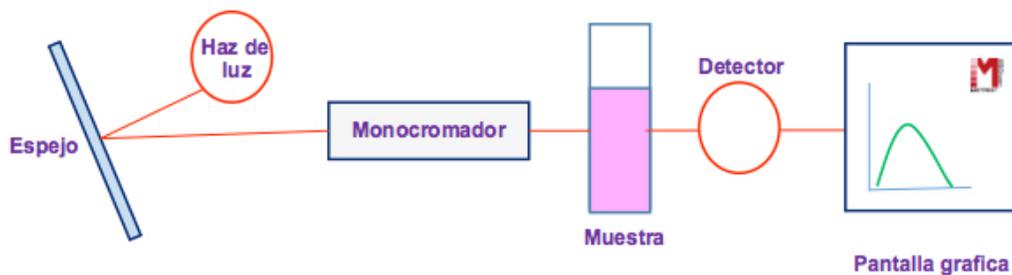


Figura 2. Funcionamiento de un espectrofotómetro. Esquema tomado de Metrixlab.

Por otro lado, para cada sustancia es necesario analizar su máximo de absorbancia a diferentes longitudes de onda. en la figura 3, se muestra el espectro de absorbancia de una proteína. Esta tiene un valor muy alto de absorbancia de alrededor de 280 nm, y muy bajo a mayores longitudes de onda. Para esta proteína, los únicos cromóforos que absorben a esta longitud de onda son los anillos aromáticos de los aminoácidos tirosina y triptófano. Como estas proteínas absorben en el espectro ultravioleta, son incoloras. Sin embargo, hay otras proteínas que absorban en la región visible como lo son la Hemoglobina que posee un grupo (Hemo) que absorbe fuertemente en esta región.

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

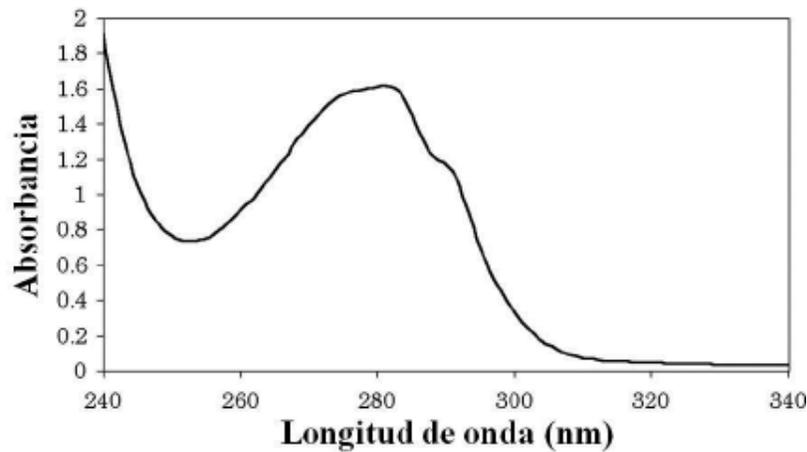


Figura 3. Espectro de absorción de una proteína diferente a Hemoglobina. *Esquema tomado de "Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica", Universidad Industrial de Santander. España, 2013*

2. Diluciones

Diversas soluciones usadas en bioquímica son preparadas por dilución a partir de una solución estándar. Para esto se necesita considerar la concentración final deseada y el volumen requerido del material diluido, para esto se puede hacer utilizando la siguiente ecuación.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

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

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

$V_1 = ?$ ES EL VALOR DESCONOCIDO

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

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

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

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

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

Otro factor importante es la nomenclatura para las diluciones la cual puede ser mostrada como una relación. Por ejemplo: Una relación 1:2 quiere decir que a un volumen inicial se le agrega otro volumen de solvente para lograr el volumen final. Una relación 1:5 quiere decir que a un

volumen inicial se le agregan 4 volúmenes de solvente.

Otras veces la nomenclatura está dada en valores de "X", por ejemplo una solución 10X. Si se quiere preparar de esta una dilución 1X se necesitara diluirlo 10 veces o se puede interpretar que se llevará a cabo una relación 1:10 para prepararla. De la misma forma se pueden preparar otras diluciones para realizar una curva de calibración. En esta practica, se aprenderá cómo preparar diluciones, cómo usar el espectrofotómetro y cómo interpretar los datos.

Objetivo

Comprender y aplicar los procedimientos de espectroscopia UV-VIS y su importancia para analizar soluciones de concentración desconocida. Así también, se revisarán los conceptos de molaridad, normalidad, porcentajes de peso a peso y dilución.

Material por equipo de 4-5 personas

Micropipetas

Puntas para micropipetas

13 tubos de ensayo

Sustancias

sol. De sulfato de cobre (CuSO_4) 0.1M

sol. Problema de CuSO_4

Agua destilada

Equipo empleado

Espectrofotómetro UV-Vis

Celda de cuarzo

Procedimiento

Dilución simple 1

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

Dilución simple 2

1. Asumiendo que la solución estándar de CuSO_4 es 5X, preparar las siguientes diluciones: 0.5X, 1X, 2X.
2. Leer y registrar la absorbancia a la longitud de onda dada para cada dilución.

Diluciones en serie

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

Solución problema

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

Registro de resultados

1. Realizar en cada caso de las diferentes diluciones, una gráfica de Absorbancia vs Concentración.
2. Realizar un análisis de regresión lineal para determinar el coeficiente de correlación. En cada experimento extrapolar el valor de absorbancia de la solución problema, para conocer la concentración.
3. Comparar en cada caso que la solución problema haya tenido el mismo valor de concentración.

Cuestionario

1. ¿Qué es la reflectancia de una solución?
2. ¿Qué es la transmitancia de una solución?
3. ¿A que longitud de onda absorben los carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos?

Bibliografía

Práctica tomada y adaptada de: "Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica", Universidad Industrial de Santander. España, 2013.

Identificación de carbohidratos, reacciones características

Laboratorio de Química

Conceptos a revisar:

Definición de carbohidratos, Monosacárido, polisacárido.

Aldosas y cetosas, reacción de Fehling, reacción de Barfoed, reacción de Seliwanoff

Introducción

Los carbohidratos son una fuente importante de producción rápida de energía, pero también forman parte de las estructuras fundamentales de las células y componentes de numerosas rutas metabólicas. También son tan importantes porque pueden unirse a proteínas y lípidos formando un sistema de información necesaria para los procesos vitales. En esta práctica se identificarán las características químicas importantes de un grupo de monosacáridos y disacárido.

Objetivo

Identificar carbohidratos reductores, monosacáridos, disacáridos y determinar si se trata de una aldosa o cetosa.

Material por equipo de 4-5 personas

16 Tubos de ensaye de 13x100

Pinzas para tubos de ensaye

Gradilla

Sustancias

Reactivo de Fehling, solución A y solución B

Reactivo de Barfoed

Reactivo de Seliwanoff

Equipo Empleado

Baño de agua a $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$

Procedimiento

Reacción de Fehling

Instale un baño de agua a temperatura por arriba 60°C .

1. Coloque en su gradilla 4 tubos de ensaye de 13x100, numérelos del 1 al 4.
2. Agregue 1 mL del azúcar correspondiente a cada tubo y agregue a cada tubo 0.5 mL del reactivo A y 0.5 mL del reactivo B de Fehling.
3. Coloque los tubos al mismo tiempo en el baño de agua.
4. Una vez que aparezca el precipitado característico de color rojo ladrillo, en la mayoría de los tubos (le lleva de 1-3 minutos), saque todos los tubos del baño de agua al mismo tiempo. Si algún tubo no ha dado el precipitado después de cinco minutos quiere decir que la reacción con el carbohidrato en ese tubo fue negativa.
5. Anote sus resultados en la hoja de datos. Los tubos con reacción positiva serán los que contienen carbohidratos reductores.

6. Lave inmediatamente los tubos.

Reacción de Barfoed

1. Repita el paso 1 de la reacción anterior y anexe otro tubo conteniendo 1 mL del carbohidrato 2 con 1 mL del carbohidrato 4. No use los mismos tubos aunque ya estén lavados.
2. Agregue 1 mL de reactivo de Barfoed a cada tubo preparado previamente con azúcares.
3. Coloque los tubos al mismo tiempo en el baño de agua.

Espere hasta 10 min., observe cuidadosamente la observación del precipitado. El precipitado será menos grueso que en la reacción anterior. Anote los tiempos de aparición de los precipitados. Los tubos positivos a la prueba en 3 min. serán los que tienen carbohidratos monosacáridos. Los tubos positivos en 5 min. o mas serán los que contienen carbohidratos disacáridos.

Observe detenidamente lo que pasa en su tubo 5, en cuanto aparezca el primer precipitado, saque el tubo y filtre. El filtrado vuélvalo a colocar en agua hirviendo por 10 min. hasta que aparezca un nuevo precipitado. De acuerdo a los resultados, verá que esta reacción puede detectar monosacáridos y disacáridos en mezcla.

Reacción de Seliwanoff

1. Coloque en su gradilla 5 tubos de ensaye y numérelos.
2. Agregue 0.5 mL del azúcar a cada.
3. Agregue 2.5 mL del reactivo de Seliwanoff a cada tubo.
4. Coloque los tubos al mismo tiempo en el baño de agua.
5. Observe la aparición del color y el tiempo. Aquel tubo que sea positivo será el que contiene cetoheptosas.
6. Anote sus resultados en la hoja de datos.

Registro de Resultados

Reacción de Fehling

Tubo	Reaccion +/-	Tiempo

Reacción de Barfoed

Tubo	Reacción +/-	Tiempo

Reacción de Seliwanoff

Tubo	Reacción +/-	Tiempo

Cuestionario

1. Podría usar la prueba de Seliwanoff para distinguir sacarosa de fructosa? Por qué si o por qué no?
2. Si tengo tres frascos, uno de glucosa, otro de manosa y otro con fructosa. A los tres les añado hidróxido de sodio 0.05N. Qué obtengo como producto en cada uno de los tres tubos y por qué?
3. En el laboratorio había un frasco rotulado lactosa+fructosa y otro rotulado con glucosa+ribosa, pero las etiquetas se cayeron y ahora no se sabe cual frasco tiene cual mezcla. Qué se puede hacer para etiquetarlos correctamente?
4. Escriba el fundamento de las reacciones de Fehling, Barfoed y Seliwanoff.

Bibliografía

Procedimiento tomado y modificado de: Eva Irma Véjar Rivera. Prácticas de Bioquímica Descriptiva. (2010). Colección textos académicos #51. Universidad de Sonora. México

Hidrólisis del almidón

Laboratorio de Química

Conceptos a revisar:

Polisacárido, Celulosa y almidón
Complejo yodo-almidón

Introducción

Los polisacáridos son polímeros de carbohidratos sencillos unidos por enlaces glucosídicos. De sus entidades que lo componen, muchos de ellos se mantienen como no reductores y solo el residuo terminal, si se mantiene de forma reducida. Entre los homopolisacáridos importantes para las plantas existen dos, una de ellas es la celulosa y el segundo es el almidón. Los almidones se presentan como reserva de carbohidratos principalmente en tubérculos como la papa, semillas, rizomas y frutas. Se almacena en forma de granos esféricos u ovalados. Se encuentra conformado por una mezcla de moléculas de amilosa y amilopectina. Ambas son poblaciones de moléculas de diferentes tamaños.

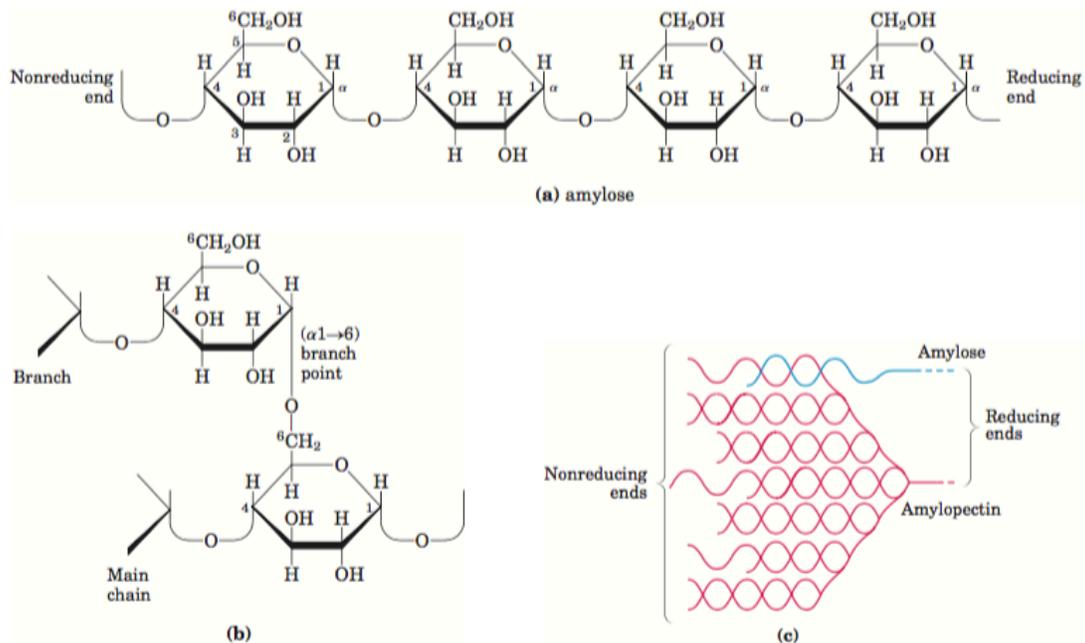


Figura 1. Estructura del almidón. (a) se representa la amilosa. (b) se representa la amilopectina y en (c) se representa la red de gránulos de almidón. *Esquema tomado de Lehninger, Principle of Biochemistry, 2000.*

Objetivos de la práctica

- Obtener almidón en granos a partir de papa
- Observar los granos de almidón al microscopio
- Observar de la reversibilidad del complejo yodo-almidón
- Medir la hidrólisis ácida del almidón

Material por equipo de 4-5 personas

11 Tubos de ensayo de 13x100

Pinzas para tubos de ensaye
Gradilla
Papa de tamaño mediano (Provista por el alumno)
Pelador de papa (Provista por el alumno)
Rayador de queso (Provista por el alumno)
Placa con pozos 1/dos equipos.
Gasa doble
Vidrio de reloj
pipeta serológica
Pro-pipeta
Micropipeta de 1000 μ L
Puntas para micropipeta de 1000 μ L
Vaso de Precipitado de 250 ml, 1L.

Sustancias

Reactivo de Fehling, solución A y solución B
Solución de Yodo
Solución de lugol

Equipo

Baño de agua caliente 90° C

Procedimiento

OBTENCION DEL ALMIDON

1. Pese la papa al inicio de la práctica, pele la papa y ráyela con un rayador de queso, de manera que la pulpa fina que se obtenga caiga en el vaso de precipitado de 600 mL. (esto debe realizarse con rapidez para evitar la oxidación de la pulpa).
2. Agregue agua destilada a la pulpa, mas o menos el doble de su volumen y agite fuertemente, por unos minutos utilizando una varilla de vidrio.
3. Con la gasa doble, o con un pañuelo de tejido no muy cerrado, filtre apretando si es necesario hacia el vaso de precipitados de 250 mL. La parte gruesa que queda en el filtro y que es fundamentalmente celulosa, se descarta.
4. Deje unos minuto a que el filtrado se asiente. Una vez asentado, descarte el agua sobrenadante y lave el almidón, agregando nuevamente suficiente cantidad de agua destilada y agitando por unos minutos. Se deja asentar. La operación se puede repetir una vez mas para obtener un almidón limpio.
5. Decante finalmente, lo más posible de agua y extienda el almidón en un vidrio de reloj mediano (previamente pesado, para registrar el peso del vidrio de reloj). Llévelo a la "ESTUFA" a 60°C, por media hora. Ya seco, pese el vidrio de reloj con el almidón y registre el peso.
Lo que se ha obtenido en esta parte son los GRANOS DE ALMIDON.

OBSERVACION AL MICROSCOPIO

1. De una suspensión del almidón de aproximadamente el 2% en agua destilada. (0.5g en 25 mL de agua). sirva en un vaso de precipitado alrededor de 5 mL.
2. Coloque sobre la plancha térmica y caliente un poco, teniendo cuidado que no llegue a ebullición.
3. Con el agitador tome una gota de la suspensión y colóquela en el centro de un portaobjetos, añada una gota de lugol.

4. Ponga el cubreobjetos sobre la preparación y presione ligeramente para eliminar el exceso de agua. Seque los bordes con un poco de toalla absorbente.
5. Observe la preparación al microscopio con el objetivo seco y débil. Dibuje algunos granos que observe.
6. Por otro lado, coloque una rebanada delgada de la papa en un porta objetos, tiña con lugol y ponga un cubreobjetos, finalmente observe al microscopio.

COMPLEJO YODO-ALMIDON

1. Pipetee 0.5 mL de la solución de almidón soluble al 1% a un tubo de ensaye de 13x100.
2. Agregue 3 gotas de solución de yodo 0.1N, si el color del complejo es tenue, agregue una gota más. El color del complejo debe ser de un morado oscuro.
3. Prenda la lámpara de alcohol. Tome el tubo de ensaye con pinzas y páselo lentamente y repetidamente sobre la llama, teniendo cuidado de que la boca del tubo apunte hacia no haya nadie.
4. Anote el tiempo requerido para la desaparición del color. Lleve el tubo al agua corriente y anote el tiempo requerido para que aparezca nuevamente el color. Lo que acaba de pasar es la reversibilidad del complejo yodo-almidón.
Anote sus resultados .

HIDRÓLISIS ACIDA DEL ALMIDON

1. Coloque en su gradilla 10 tubos de ensaye de 13x100 y numérelos.
En un vaso de precipitados de 50 mL coloque 30 mL de una solución de almidón 1.5%. Añada 15 gotas de ácido clorhídrico concentrado y agite suavemente.
2. Con una pipeta tome 200 uL de ella y coloque en la placa del pozo #1 y 2 mL al tubo 1.
3. Ponga a calentar la solución y anote el tiempo en que la solución comienza a hervir. En ese momento tome 200 uL y colóquela en el pozo #2 y 2 mL en el tubo dos.
4. A los dos minutos exacto de haber comenzado a hervir la solución; repita la operación de tomar 200 uL y colóquela en el pozo #3 y 2 mL en el tubo 3. Repetir la operación hasta cumplir los 10 pozos y tubos.
5. A continuación, en la serie de tubos obtenidos da cada 2 min., agregue uno a uno 0.5 mL del reactivo A y 0.5 mL del reactivo B de Fehling.
6. Ponga sus tubos en un baño de agua caliente. Espere 5 min. Saque los tubos y ordene de acuerdo a su numeración. Observe el grado de reducción por la cantidad de precipitado de óxido cuproso de color rojo ladrillo en cada tubo. Esta reacción es la hidrólisis ácida del almidón.
7. En los pozos revele con unas gotas de yodo.
Anote sus resultados.

Obtención del almidón

Peso en gramos la papa entera: _____ del almidón que se obtuvo: _____
Calcule el rendimiento de almidón en porcentaje: _____

Observación al microscopio

Objetivo utilizado: _____



Objetivo utilizado: _____



Complejo yodo-almidón

Tiempo requerido para decolorar la solución: _____

Tiempo requerido para reaparecer la coloración de la solución: _____

Hidrólisis ácida del almidón

Pozo	color del complejo (+) o (-)	Tubo	Precipitado (+) o (-)
1	_____	1	_____
2	_____	2	_____
3	_____	3	_____
4	_____	4	_____
5	_____	5	_____
6	_____	6	_____
7	_____	7	_____
8	_____	8	_____
9	_____	9	_____
10	_____	10	_____

Cuestionario

1. ¿Para que se agrega solución de lugol a la preparación del almidón cuando se va a observar al microscopio?
2. ¿Qué otras maneras hay de hidrolizar al almidón? Explique con detalle?
3. ¿En qué condiciones el almidón daría la prueba de Fehling positiva?

Bibliografía

Procedimiento tomado y modificado de: Eva Irma Véjar Rivera. Prácticas de Bioquímica Descriptiva. (2010). Colección textos académicos #51. Universidad de Sonora. México.

Determinación de lípidos totales de diferentes órganos de pollo y cuantificación de colesterol

Laboratorio de Química

Conceptos a revisar:

Clasificación de lípidos, solubilidad de lípidos.

Introducción

Los lípidos son constituyentes importantes de las membranas biológicas y por su naturaleza hidrofóbica son solubles en solventes orgánicos como éter, cloroformo y etanol absoluto. Se mejora la solubilidad mientras el solvente sea menos polar y con mayor cadena hidrofóbica. La distribución de los lípidos en los diferentes órganos está en correlación con la función que desempeña en el organismo. Así, el cerebro será el órgano que más lípidos posee que todos los demás órganos. En ocasiones, de acuerdo al metabolismo que realizan así como sus funciones, será la cantidad de lípido como constituyente.

Los grupos funcionales de algunos lípidos pueden reaccionar con soluciones y/o reactivos inorgánicos como bases, ácidos o anhídridos, y pueden formar compuestos coloridos producto de las reacciones químicas. Esto ofrece una ventaja ya que el desarrollo del color es directamente proporcional a la cantidad del producto. De esta manera se desarrolló el Método de Liebermann-Burchard para la cuantificación de colesterol, desde 1885, retomado muchos años después por Kenny en 1952. Su vigencia continúa hoy en día y sus aplicaciones en la cuantificación de colesterol en suero siguen patentes.

Objetivo

Extraer lípidos totales en diferentes muestras de órganos de pollo y cuantificar colesterol en los extractos.

Materiales por grupo

Muestras de tejido de pollo: corazón, hígado, músculo, cerebro, pulmones y riñones.

ESTOS ORGANOS SE OBTENDRÁN AL MENOS 1 DÍA ANTES DE LA PRÁCTICA.

1 Celda de cuarzo.

Materiales por equipo de 4-5 personas

1 mango con navaja de bisturí.

Papel aluminio

5 Pistilos para homogenar en microtubos

2 pipetas de 5 ml

2 propipetas

1 parrilla de calentamiento

2 vaso de precipitados de 1 lt

2 tubos de 15 ml de vidrio.

1 gradilla metálica.

1 termómetro de mercurio.

1 flotadores para microtubos.

1 micropipeta de 1 ml

1 micropipeta de 100 μ l

Baño agua en vaso de precipitados de 1 litro

Sustancias

50 ml de cloroformo:etanol absoluto, 2:1, frío por equipo.

Cloroformo enfriado previamente en hielo.

Anhídrido Acético.

H₂SO₄ concentrado.

Solución de colesterol: 0.0547 g en 10 ml de cloroformo.

Equipo

Espectrofotómetro UV-Vis

Procedimiento:

Tomar fragmentos de tejido de aproximadamente 0.5 cm³ de cada uno y pesarlos.

1. Homogenado de los órganos de estudio.

Agregar 700 µl del solvente cloroformo:etanol frío a cada tubo de microcentrífuga con el fragmento de tejido en su interior.

Realizar el homogenado de cada uno de los órganos en el tubo de microcentrífuga con ayuda del pistilo de plástico, hasta lograr la mayor destrucción del tejido.

Cerrar los microtubos.

2. Evaporación del solvente y concentración de los lípidos.

Centrifugar todos los extractos a 3000 rpm durante 5 min.

Pesar nuevos microtubos y registrar los pesos de cada uno

Pasar los sobrenadantes a los tubos nuevos y limpios QUE DEBIERON SER PESADOS PREVIAMENTE.

Tener el baño maría preparado, pasar los sobrenadantes o extractos de lípidos del paso anterior, en los tubos a evaporar en el baño maría sobre un flotador de tubos.

Dejar secar totalmente el solvente.

3. Determinación de los lípidos.

Pesar cada uno de los tubos después del paso de evaporación y registrar el cambio en peso. Ese será el contenido de lípidos totales.

4. Determinación de colesterol

Preparar un baño maría con la parrilla de calentamiento y el vaso de precipitados con agua, para tenerlo a 37° C.

Agregar 1 ml de cloroformo frío a cada uno de los tubos de microcentrífuga con el extracto de lípidos totales obtenidos y no calientes. Agitar suavemente moviendo el tubo para resuspender y disolver los lípidos. Agregar 0.2 ml de anhídrido acético a cada tubo, mezclar suavemente y dejar reposar 3 min. Cuidar porque la reacción sube aproximadamente 2° C.

Enseguida agregar 0.02 ml de H₂SO₄ concentrado. Cuidar porque la reacción sube aproximadamente 8° C. Mezclar y dejar reposar en el baño a 37° C para el desarrollo del color durante 30 min. Cuidar de la luz.

Preparar el tubo de colesterol de concentración conocida de la siguiente manera:

Pesar 0.0547 g de colesterol y disolverlo en 10 ml de cloroformo. Posteriormente preparar la solución de trabajo de colesterol, diluyendo 1:50 con cloroformo. Esta solución contendrá en 1 ml = 250 mg/100ml de colesterol.

Meter a reaccionar 1 ml de la dilución 1:50 como en los pasos anteriores de las muestras con 0.2 ml de anhídrido acético, reposar 3 min, enfriar y agregar 0.02 ml de H₂SO₄. Mezclar y dejar reposar en baño maría a 37° C durante 30 min.

Leer la cantidad de color en un espectrofotómetro a 430 nm.

Registro de resultados

Calcular en base a la lectura del tubo de trabajo de colesterol, la cantidad contenida de cada uno de los extractos.

Preparar un cuadro ó gráfica con los datos de las cantidades de colesterol obtenidas.

Discusión

Cómo se explica las diferencias en las cantidades totales de los lípidos y de colesterol extraídos, de acuerdo al metabolismo que llevan a cabo.

Conclusiones

Anota tus conclusiones de los resultados y que importancia tiene la práctica (aplicaciones).

Cuestionario

1. ¿Cuál es el principio de la reacción de Liebermann-Burchard?

Bibliografía

Nath M.C., Chakravorty M.K. Chowdhury S.R. (1946). Liebermann-Burchard reaction for steroids. Nature 157:103-104.

Práctica tomada y optimizada de: Manual de prácticas de laboratorio de Investigación Biológica II. Universidad Simón Bolívar. 2010.

Separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en papel.

Conceptos a revisar:

Clasificación de aminoácidos, solubilidad y polaridad de los aminoácidos.

Principios de la cromatografía en papel, ¿Qué es la ninhidrina?, ¿Qué es Rf?.

Introducción

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes que se requieren separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (**fase estacionaria, F.E.**) mientras que la otra (**fase móvil, F.M.**) se mueve en una dirección definida.¹

Existen diferentes modalidades de cromatografía, una de ellas es en gas. Sin embargo, las diversas técnicas para la separación de mezclas se fundamentan en la química de las moléculas que presentan afinidades diferentes de las sustancias del medio móvil (ya sea gas o líquido) y el medio estacionario (papel, gelatina, alúmina o sílice) a través del cual tienen que circular.

Objetivo

Realizar una cromatografía de aminoácidos en papel y identificar aminoácidos de una mezcla

Material por grupo

Solución de aminoácidos 50 mM:

Aspártico, Leucina, triptófano y glicina.

Solución de hidróxido de amónico

Solución de ninhidrina al 0.05%.

Mezcla problema de aminoácidos.

Material por equipo de 4-5 personas

Papel Whatman para cromatografía.

Lápiz y regla.

Micropipeta y puntas para micropipeta.

Equipo

Cámara de cromatografía.

Procedimiento

Determinación de aminoácidos por cromatografía

Cuando se trabaja la cromatografía de papel, se debe tener mucho cuidado en el manejo del papel, es necesario el uso de guantes desechables para no imprimir huellas digitales en el papel, que por la grasa que tienen, dificultaría el libre flujo de solventes y solutos.

1. En un papel Whatman 1, con medidas 200 x 200 mm. con lápiz, trace una línea horizontal a dos centímetros de uno de los bordes del papel, que será el inferior. En esa línea marque 4-5 puntos equidistantes a 1.5 o 2 cm.

2. Cargue la mezcla problema en la posición 1 depositando 15 uL de ella en dos ocasiones esperando que seque la muestra entre cada depósito. En las siguientes posiciones coloque las muestras de aminoácidos conocidos uno en cada punto señalados en el papel, y trate de dejar la muestra homogéneamente, la expansión de la marca de la muestra no debe ser mayor de medio centímetro de diámetro.

1. Universidad de Alcalá. Biomodel, Cromatografía.

3. Con sumo cuidado, coloque el papel en la cámara, cuando y de la manera que el instructor se lo indique.

4. Se deja ascender el solvente hasta que alcance la parte superior de la tira de papel.

5. Saque de la cámara el papel, e inmediatamente trace con un lápiz una línea hasta donde llegó el solvente. Deje secar el papel, al aire libre.

Revelado de las muestras en el papel

1. Una vez seco el papel, cuélguelo de algún soporte conveniente, cubra la parte posterior con algún cartón, y rocíelo con el revelador preparado por el instructor. No debe quedar ni muy mojado, ni insuficientemente húmedo.

2. Marque con lápiz las manchas reveladas en sus centros y calcule sus Rfs.

3. Calcule los Rfs de sus muestras y espere a que sus compañeros terminen, para poder determinar los aminoácidos que tienen presentes las mezclas problema.

Cromatografía:

Rf de aminoácidos:

Mancha y aminoácido 1 Rf = _____

Mancha y aminoácido 2 Rf = _____

Mancha y aminoácido 3 Rf = _____

Mancha y aminoácido 4 Rf = _____

Rf1 de la mezcla problema: _____ Rf2. _____

Con los datos de Rfs de los aminoácidos estándar de sus compañeros logró identificar los aminoácidos de las manchas de su problema?

Cuestionario

1. Qué función desempeña la celulosa del papel en este sistema de cromatografía?
- 2.Cuál es la fase móvil y cual la estacionaria en esta cromatografía?
3. Defina bien el concepto de Rf y su utilidad?
4. Qué se puede hacer cuando, en un sistema de cromatografía, dos compuestos no se pueden separar por tener idénticos Rfs?

Bibliografía

Práctica tomada y adaptada de: Jesús V. Jorrín Novo, Ma Nieves Abril Díaz, José A. Bárcena Ruiz. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba, Argentina.

Extracción, cuantificación de proteínas.

Laboratorio de Química

Conceptos a revisar:

Métodos para cuantificar proteínas por espectrofotometría.

Principio de los métodos para cuantificar proteínas.

Introducción

Las proteínas son la expresión final de cualquier gen. De manera genérica las proteínas se clasifican de acuerdo con diferentes criterios: naturaleza química, función celular y su localización celular, entre otras. Existen proteínas específicas que caracterizan a cualquier órgano y en conjunto son las que mantienen las propiedades e identidades de las células de determinados órganos. Por ejemplo, las neuronas del sistema nervioso central, estarán expresando proteínas de membrana conocidas como receptores de neurotransmisores que no son expresadas en hepatocitos o células del hígado. Esto quiere decir que una cantidad de proteínas totales de un órgano es diferente a otro órgano dando una "huella" proteica que lo identifica.

El uso de técnicas experimentales para el estudio de las proteínas, pasa por una serie de pasos. El primero de ellos es la extracción de proteínas. Generalmente, el medio o buffer de extracción se prepara de acuerdo con los intereses de estudio. Por ejemplo hay que considerar si se tratará de una evaluación enzimática o solo la evaluación de la presencia de proteínas tal cual por ejemplo, entre otros casos.

En resumen, en esta práctica se extraerán y cuantificará las proteínas presentes en unas muestras de tejido vegetal.

Objetivo

Extraer y cuantificar proteínas de diferentes muestras vegetales.

Material por grupo

Celda de cuarzo

Material por equipo de 4-5 personas

Muestras para extracción de prot:

Piña, papaya, fresa.

Gradilla para microtubos y microtubos de 1.5mL

Micropipetas de 1mL 100 y 10 μ L

Puntas para micropipetas

Vidrio de reloj

Bisturí

3 Pistilos para homogenar en microtubos

Sustancias

Reactivo de Bradford 100ml:

10mg de Azul Coomassie G-25 disolver en 5mL EtOH 95%. Agregar 10mL de ac. Fosfórico (al 85%) y aforar a 100ml. Proteger en fco. Ambar.

Solución de albumina de 0.1mg/mL

Solución salina 0.9%

Equipo

Espectrofotómetro UV-Vis

Procedimiento

Extracción de proteínas

1. Fragmentar cada muestra con bisturí sobre vidrio de reloj.
Pasar una porción de este tejido a un tubo de 1.5 mL (a la mitad de la región cónica del tubo) y agregar 500 μL de solución salina.
2. Introducir el pistilo y comenzar el homogenado del tejido en el interior del microtubo, hacerlo en frío la mayor parte.
3. Centrifugar los homogenados a 8000 rpm durante 5 min.
4. Tomar el sobrenadante de cada uno y pasarlo a un tubo limpio y mantener en frío.
5. Preparar dos diluciones del extracto proteico: 1:10 y 1:100 en un volumen final de 500 μL de sol salina.

Preparar los extractos de acuerdo al siguiente cuadro:

Concentración	Muestras (μL)	Agua (μL)	Bradford (μL)
1:10	5	47.5	500
1:10	50	25	500
1:100	5	47.5	500
1:100	50	25	500

6. Agitar bien el contenido de los tubos, dejarlos reposar 10 min.
7. Leer la absorbancia de cada uno a 595 nm.
8. Guardar los extractos en congelación a -20°C para utilizarlos en la siguiente sesión.

Preparar la curva patrón

1. Para la preparación de la curva patrón de albúmina, de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ disuelta en agua de acuerdo al siguiente cuadro por duplicado.

Concentración alb (μg)	Estandar alb (μL)	Agua (μL)	Bradford (mL)
1	1	99	1
2	2	98	1
4	4	96	1
8	8	92	1
16	16	84	1
32	32	68	1
BLANCO	-	100	1

2. Agitar bien el contenido de los tubos, dejarlos reposar 10 min.
3. Leer la absorbancia de cada uno a 595 nm. Sacar el promedio de lecturas de cada concentración de albúmina.

4. Elaborar la gráfica lineal de absorbancia vs concentración de albúmina utilizando los promedios.

Resultados

Reportar los resultados de la práctica, elaborando la gráfica de la curva patrón de albúmina en Excel. Calcular la ecuación de la gráfica. Despejar de la ecuación. Interpolar de esa manera las concentraciones de proteínas de los promedios de los diferentes volúmenes de las diluciones, de los extractos de los tejidos.

Mencionar aplicaciones de estas pruebas.

Conclusiones

Escribe brevemente las conclusiones de la práctica.

Cuestionario

1. ¿Qué otro método existe para la cuantificación de proteínas y cual es su principio?

Referencia bibliográfica

1. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch* 1976; 72:248-254.