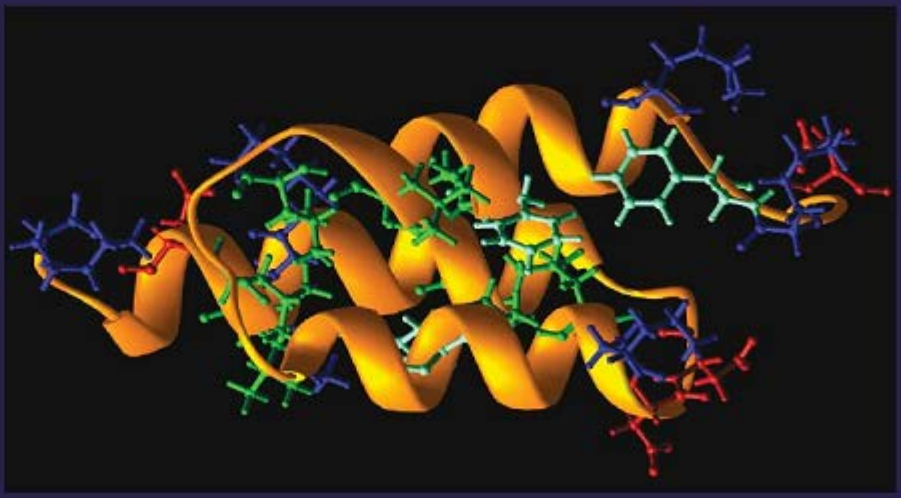
GUÍAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA PARA LA CARRERA DE QUÍMICA

colección **notas de clase** colección **notas de clase** colección **notas de clase**

Elizabeth López Rico
Cecilia Anzola Velasco



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Guías de laboratorio de Bioquímica para la carrera de Química

Guías de laboratorio de Bioquímica para la carrera de Química

Elizabeth López Rico y Cecilia Anzola Velasco
Profesoras asociadas
Departamento de Química, Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

© Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química

© Elizabeth López Rico
© Cecilia Anzola Velasco

Primera edición, 2005. ISBN 978-958-761-501-0
Segunda edición, 2013. ISBN 978-958-761-556-2

RECTOR
Ignacio Mantilla Prada
DECANO FACULTAD DE CIENCIAS
Jesús Sigifredo Valencia
VICEDECANO DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
Jaime Aguirre Ceballos
VICEDECANO ACADÉMICO
Giovanny Garavito
DIRECTOR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Mauricio Maldonado

EDICIÓN
Magdalena Arango
Coordinación de Publicaciones
DISEÑO Y ARMADA
Diego Villate González
PORTADA
Andrea Kratzer Moreno

Impreso en Bogotá D. C., Colombia

Derechos reservados. Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización explícita del titular de los derechos patrimoniales.

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

López Rico, María Elizabeth, 1948-
Guía de laboratorio de bioquímica para la carrera de química / Elizabeth López Rico y Cecilia Anzola Velasco. -- Bogotá : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 2013
196 páginas : ilustraciones – (Notas de clase)

Incluye referencias bibliográficas

ISBN : 978-958-761-556-2

1. Bioquímica 2. Bioquímica - Manuales de laboratorio 3. Bioquímica - Experimentos 4. Enzimas - Análisis 5. Lípidos 6. Hidratos de carbono 7. Biomoleculas
I. Anzola Velasco, Cecilia, 1947- II. Título

CDD-21 572.078 / 2013

Presentación de la segunda edición

La segunda edición de las GUIAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA PARA LA CARRERA DE QUIMICA surge de la necesidad de mejorar, corregir y actualizar el texto, así como del beneficio del año sabático concedido a la profesora Cecilia Anzola V.

Algunos de los cambios son el resultado de la experiencia en el laboratorio y de las sugerencias de estudiantes y profesores que han usado las guías de laboratorio.

El propósito de la segunda edición es el mismo que el de la primera, ofrecer a los estudiantes de Química una selección de técnicas y experimentos para que aborden el aprendizaje de la Bioquímica experimental y el trabajo con muestras y moléculas biológicas.

En esta edición se unificó la presentación de cada capítulo de la siguiente manera:

Objetivos - en cada experimento se incluyen los objetivos de carácter general y específicos que se deben obtener, así como las destrezas y habilidades en la experimentación bioquímica que el estudiante debe lograr.

Fundamento teórico - se incluye solamente un resumen de los conceptos más importantes, con el fin de limitar el texto solo a lo necesario, para que la práctica sea desarrollada adecuadamente. Si el estudiante lo desea podrá profundizar o ampliar en un texto de bioquímica.

Procedimiento - esta sección comprende un procedimiento detallado para cada una de las actividades a realizar y se acompaña, cuando es pertinente, de un diagrama o esquema que permite visualizar la práctica en su conjunto.

La mayor parte de las prácticas se rediseñaron para disminuir el consumo de reactivos, sin que esto signifique pérdida de la calidad de los resultados.
Cálculos y expresión de resultados - en esta sección se le indica al estudiante la forma en que debe procesar, presentar y analizar los datos y las gráficas que debe elaborar a partir de los datos obtenidos en el experimento.

Se hace énfasis en la necesidad de comparar los resultados con los valores establecidos en la literatura para moléculas, muestras o fluidos biológicos.
Cuestionario - al final de cada experimento se incluye una serie de preguntas que tienen que ver con el desarrollo de la práctica y otras que pretenden ampliar el contexto y aplicación , derivados de los conceptos en los que se basa el experimento.

Referencias Bibliográficas - cada experimento termina con una lista de referencias que amplían el fundamento teórico y/o las técnicas experimentales relacionadas. En esta edición se incluyen además algunas direcciones electrónicas pertinentes.

Materiales y reactivos - se presenta una lista completa de los materiales, equipos y reactivos necesarios para el desarrollo de cada experimento. Adicionalmente se incluye la preparación de algunos reactivos, con las indicaciones sobre las cantidades a preparar y detalles útiles para que el reactivo quede bien preparado.

Informe - constituye una guía útil para la presentación del informe, asignando espacios a cada ítem y a cada dato que debe ser consignado. También se presenta un modelo para el diseño de las tablas de datos y de resultados. Es importante destacar que en el informe de laboratorio debe tener mayor peso lo atinente al desarrollo de la práctica, el análisis de datos y conclusiones y menor énfasis en los aspectos teóricos y que no se deben repetir los detalles del procedimiento.

Desde la publicación de la primera edición se realizaron cambios importantes en la estructura curricular de la carrera de Química, con la inclusión de un curso de Biología, la incorporación de un Laboratorio Avanzado de Bioquímica y las asignaturas optativas: Microbiología, Biología Molecular y Bioquímica Analítica. De esta manera los estudiantes llegan al laboratorio de bioquímica con conocimientos amplios sobre los seres vivos, aprendidos en el curso de biología. Por otra parte, el laboratorio avanzado y las asignaturas optativas constituyen un nuevo horizonte para profundizar y avanzar en el campo de la Bioquímica, durante su formación profesional en Química.

La Maestría en Bioquímica y el recientemente creado programa de Doctorado, ofrecen también a quienes les interese este campo, la ruta y oportunidad para continuar los estudios superiores en la Universidad Nacional. Para un país como Colombia, pleno de recursos naturales pero con serios problemas en la salud, alimentación, medio ambiente, etc, el conocimiento y aprovechamiento racional de esos recursos están a la espera de una masa crítica de profesionales e investigadores que contribuyan al desarrollo científico y material, en beneficio de los colombianos.

En los años recientes, con la vinculación al área de Bioquímica de nuevos profesores con doctorado, se han reforzado algunos de los campos de investigación tradicionales del área y se han abierto otras temáticas. A continuación se presenta el nombre de los docentes, el año de su vinculación y el campo de trabajo:

Marta Lucía Serrano (2010) – aspectos bioquímicos del cáncer; Harold Ardila (2008) - interacción hospedero-patógeno; Pedro Britto (2006) – microbiología ambiental; Edgar Reyes (2006) - proteínas y bioinformática; Maria Helena Ramírez (2005) – Biología molecular y proteínas recombinantes; ; Carlos Yesid Soto (2005) – microbiología y biología molecular; Nohora Vega (2005) – bioquímica de proteínas; Adriana Umaña (2004) – hormonas; Claudia Rubiano (2003) – biología molecular y bioinformática.

Finalmente debemos registrar con tristeza que, en su dinámica la vida nos recordó que somos seres pasajeros y nos privó de la amistad, talento, creatividad, experiencia y aportes de los profesores Gerardo Pérez Gómez y Luis Osses Bassaure, quienes fallecieron en los años 2010 y 2011 respectivamente, en el ejercicio pleno de su actividad docente e investigativa y después de liderar durante muchos años el trabajo en proteínas y membranas y contribuir a la consolidación y progreso del área de Bioquímica en el Departamento de Química.

Agradecimientos
Deseamos expresar nuestra gratitud a los profesores Sixta Tulia Martínez P. y Carlos Yesid Soto O. por sus sugerencias y revisión detallada del contenido de la segunda edición. De igual manera, nuestro reconocimiento para todos los estudiantes de posgrado que, en calidad de Asistentes Docentes, han colaborado a lo largo de estos años en el Laboratorio de Bioquímica.

También agradecemos a la Universidad Nacional de Colombia por brindarnos el apoyo y el tiempo para ejercer nuestra actividad docente y desarrollar nuestros intereses en investigación.

Elizabeth López Rico, Cecilia Anzola Velasco
Bogotá, agosto de 2013

Presentación de la primera edición

La Bioquímica se ocupa de estudiar y explicar el funcionamiento de los seres vivos y los procesos biológicos desde el punto de vista de la Química.

En sus inicios la Bioquímica se desprendió de la Química orgánica y como ciencia independiente ha logrado un desarrollo *muy notable*, tanto en el conocimiento teórico como en los métodos propios para la investigación.

Su relación con la química orgánica se entiende en el hecho de que las biomoléculas son moléculas orgánicas; los carbohidratos, los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y las vitaminas son los constituyentes mas importantes desde el punto de vista cuantitativo y funcional de las células y los seres vivos. De hecho un químico orgánico y premio nobel, el doctor Linus Pauling hizo contribuciones valiosas en relación con la estructura de las proteínas. Un biólogo y un físico, mundialmente conocidos como Watson y Crick (James y Francis) sorprendieron en 1953 al mundo científico con su estructura del DNA, sobre la cual se basan nuevas disciplinas como la biología molecular, la ingeniería genética y las biotecnologías modernas. Así, la bioquímica guarda relación con otras ciencias como la fisiología, la nutrición, la biología celular y molecular, la genética, la patología y otras que se retroalimentan y refuerzan entre sí.

En el departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, la bioquímica se inició con el aporte y trabajo de Frans Y Noella Awauters, doctores de la Universidad Católica de Lovaina quienes vinieron a comienzos de los años sesenta a desarrollar investigación sobre β-lactoglobulina y Hemocianina de caracoles (*Limulus polifemus*). Los doctores Awauters permanecieron en la Universidad Nacional dos años, lo cual sirvió para establecer relaciones académicas con el ministerio de cultura belga y con la Universidad de Lovaina y para sembrar las primeras semillas y despertar el interés de dos químicos jóvenes que viajaron a adelantar su doctorado en Bélgica: los profesores Virginia Montes de Gómez y Gerardo Pérez.

De otra parte, la misión de Nebraska que vino a la Universidad Nacional a final de la década de los sesenta, puso en contacto a los doctores Don H Bushman y Jeannette de Cárdenas con estudiantes de la carrera de química, quienes recibieron sus enseñanzas y adelantaron algunos trabajos de

grado bajo su orientación. A partir de 1987 la vinculación y apoyo del Seminario Internacional de la Universidad de Uppsala, Suecia, ha sido crucial para el desarrollo de las investigaciones en hormonas y para la capacitación de algunos docentes del área.

Inicialmente los cursos de bioquímica se ofrecieron como electivas y a partir de 1968 se incorporaron al plan de estudios de la carrera de química dos asignaturas teóricas (bioquímica I y II) y un curso de laboratorio.

A los doctores Bushman y Cárdenas se unió el profesor Arturo Gil, químico farmacéutico de la Universidad Nacional, quien obtuvo su doctorado en la Universidad de Gainesville (EEUU). Ellos tuvieron a su cargo la docencia de bioquímica para la carrera de química.

Desde sus inicios los profesores del área de bioquímica se interesaron por su capacitación de posgrado: esto permitió que en los pasados 35 años se consolidara un grupo dinámico, que ha mantenido una participación activa en la docencia y en la generación y avance del conocimiento bioquímico. El progreso y el trabajo del grupo puede reconocerse en las numerosas publicaciones, y en las tesis y trabajos de grado realizados por estudiantes de diversas carreras (química, farmacia, biología, ingeniería química, agronomía, veterinaria y odontología) y de los programas de maestría y doctorado, bajo la orientación de los profesores del área.

La investigación en bioquímica, en el Departamento de Química, cubre temas diversos como proteínas, hormonas, interacción hospedero-patógeno, biofísica de membranas, enfermedades parasitarias del trópico, tecnología de enzimas, alimentos funcionales y fijación biológica de nitrógeno. El grupo ha mantenido vínculos con instituciones oficiales y privadas del país tales como Instituto Nacional de Salud, Instituto Colombiano Agropecuario, Corpoica, Instituto de Inmunología, Cenicafé, y el Centro Internacional de Física, entre otros.

Actualmente, el área es responsable por la docencia en bioquímica para las carreras de química, farmacia, biología, zootecnia, medicina veterinaria, agronomía, odontología, enfermería y terapia física. También los profesores de bioquímica colaboran con los programas de posgrado en ciencia y tecnología de alimentos y en agronomía.

El presente libro, *Guía de Laboratorio de bioquímica para la Carrera de Química*, recoge la experiencia y contribuciones de muchos de los profesores del área. Algunas de las practicas de laboratorio son producto directo de las investigaciones en proteínas y de los trabajos de grado; otras se han desarrollado a partir de la literatura científica.

Este texto presenta de manera organizada una selección de prácticas que ilustran los métodos y las técnicas de laboratorio que se emplean en la experimentación bioquímica. Las prácticas se han mejorado, organizado y adaptado a sesiones de siete horas en el séptimo semestre de la carrera de química de la Universidad Nacional. Están diseñadas de tal manera que su ejecución le de al estudiante las bases y las habilidades para trabajar, purificar y de terminar las actividades biológicas de algunas biomoléculas, además las practicas le dan al estudiante la oportunidad de hacer un ejercicio integrador con otras asignaturas como la analítica, la orgánica y la fisicoquímica. Así, la bioquímica representa para un químico la posibilidad de hacer aportes desde la química en numerosos campos de aplicación e investigación, como en estudios del medio ambiente, agrícolas, nutrición, medicina, alimentos, biotecnología etc.

Sea esta la oportunidad para rendir un homenaje y reconocimiento al trabajo y dedicación a los profesores de bioquímica que ya no nos acompañan: Virginia Montes de Gómez y Evelio Paredes. A quienes se retiraron en busca de nuevos horizontes: Guillermo Ramírez y Fernando Acevedo. A los pioneros: Arturo Gil, Gerardo Pérez, Norma de Sambuccetti, Myriam Sánchez de Gómez, Moisés Wasserman, Ana Silvia Bermúdez, Martha Lucía Pabón y María Inés Silva. A quienes se vincularon un poco más tarde, Stella de Rodríguez, Yolanda Navarro, Sixta Tulia Martínez, Guillermo Sanabria, Luis Osses, Laura Ortiz y Humberto Zamora. A la profesora Patricia Restrepo por su acercamiento y trabajo en bioquímica a pesar de pertenecer formalmente a otra área, y finalmente a nuestra profesora mas joven Claudia Rubiano.

Gracias a los profesores que tuvieron la paciencia de revisar los manuscritos y a todos los estudiantes que son la razón de ser de nuestro trabajo docente.

Elizabeth López Rico, Cecilia Anzola Velasco
Bogotá, junio 28 de 2004

Contenido

Recomendaciones generales 15
Seguridad en el laboratorio de Bioquímica 15
1. Elementos de seguridad personal. 15
2. Preparación y manejo de reactivos 15
3. Manipulación de muestras biológicas 16
4. Manejo de instrumentos y equipos de laboratorio 16
5. Disposición responsable de desechos y residuos 16
Aprovechamiento del trabajo en el laboratorio. 17

Práctica N° 1
Extracción e hidrólisis del almidón 19
Objetivos. 19
Fundamento teórico 19
Hidrólisis enzimática 21
Hidrólisis ácida 22
Análisis cromatográfico de carbohidratos. 23
Método de Kjeldahl 23
Procedimiento experimental 25
Experimentos. 25
Cálculos y resultados 29
Cuestionario. 30
Referencias bibliográficas 30
Materiales y reactivos 32
Materiales 32
Reactivos 32
Informe. 34

Práctica N° 2
Aminoácidos: curvas de titulación y separación por intercambio iónico 39
Objetivos. 39
Fundamento teórico 39
Cromatografía de intercambio iónico. 40
Propiedades generales de las resinas de intercambio iónico 43
Procedimiento experimental 44
Experimentos. 44
Cálculos y resultados 45

Cuestionario. 46
Referencias bibliográficas 46
Materiales y reactivos 47
Materiales 47
Reactivos 47
Informe. 49

Práctica N° 3
Extracción de DNA y estudio de algunas propiedades 55
Objetivos. 55
Fundamento teórico 55
Propiedades del DNA 57
Aislamiento del DNA 58
Procedimiento experimental 59
Experimentos. 59
Cálculos y resultados 62
Cuestionario. 63
Referencias bibliográficas 63
Materiales y reactivos 64
Materiales 64
Reactivos 64
Informe. 65

Práctica N° 4
Estudio cinético de las fosfatasas 69
Objetivos. 69
Fundamento teórico 69
Generalidades 69
Actividad enzimática 73
A. Fosfatasa alcalina 77
Procedimiento experimental 77
Experimentos. 77
Cálculos y resultados 83
Cuestionario 85
Referencias bibliográficas 85
Materiales y reactivos 86
Materiales 86
Reactivos 86
Informe. 88
B. Fosfatasa ácida 95
Procedimiento experimental 95
Experimentos. 95
Cálculos y resultados 101
Cuestionario 102

Referencias bibliográficas 103
Materiales y reactivos 104
Materiales 104
Reactivos 104
Informe. 106

Práctica N° 5
Inhibidores de tripsina 113
Objetivos. 113
Fundamento teórico 113
Tripsina. 114
Procedimiento experimental 115
Experimentos. 115
Cálculos y resultados 118
Pruebas de inhibición. 118
Estudio cinético de la tripsina 118
Efecto del calentamiento sobre la actividad
de los inhibidores de tripsina 119
Cuestionario. 119
Referencias bibliográficas 119
Materiales y reactivos 120
Materiales 120
Reactivos 121
Informe. 123

Práctica N° 6
Extracción y caracterización de lípidos presentes en la yema de huevo .129
Objetivos. 129
Fundamento teórico 129
Procedimiento experimental 132
Experimentos. 134
Cálculos y resultados 137
Cuestionario 137
Referencias bibliográficas 138
Materiales y reactivos 139
Materiales 139
Reactivos 139
Informe. 141

Práctica N° 7
Técnicas de análisis de proteínas 147
Objetivos. 147
Fundamento teórico 147
Método de Biuret. 148

Método de Kjeldahl 149
Método de absorción en el UV 150
Método de Bradford 151
Procedimiento experimental 152
Experimentos 152
Cálculos y resultados 157
Cuestionario. 158
Referencias bibliográficas 159
Materiales y reactivos 160
Materiales 160
Reactivos 160
Informe. 162

Práctica N° 8
Purificación de proteínas 171
Objetivos. 171
Fundamento teórico 171
Separación de las proteínas 172
Cromatografía de afinidad 177
Electroforesis 178
Determinación de proteínas por absorción en el ultravioleta . . . 180
Procedimiento experimental 181
Experimentos 181
Cálculos y resultados 185
Cuestionario. 186
Referencias bibliográficas 186
Materiales y reactivos 187
Materiales 187
Reactivos 188
Informe. 191

Recomendaciones generales

Seguridad en el laboratorio de Bioquímica

A continuación se presentan algunas normas básicas que el alumno debe conocer y acatar para su seguridad y la de los demás dentro del laboratorio, a fin de que tome conciencia de que, con las precauciones debidas, el primer beneficiado será él mismo al disminuir considerablemente la posibilidad de sufrir y ocasionar accidentes.

1. Elementos de seguridad personal

Para asistir al laboratorio los estudiantes deben utilizar: blusa blanca de laboratorio para proteger la ropa; guantes y gafas de seguridad para proteger las manos y los ojos durante la realización del experimento, y pera de caucho o pipeteador de cremallera para el manejo de líquidos. Se recomienda disponer de una toalla de tela y papel absorbente para limpiar derrames de reactivos y soluciones y, en otros casos, para manipular el material de vidrio que esté caliente. Está terminantemente prohibido pipetear con la boca: se debe usar la pera de caucho o el pipeteador de cremallera.

En el laboratorio no está permitido fumar o consumir alimentos y bebidas ni utilizar dispositivos electrónicos (radios, i-pods, celulares) que pueden distraer al estudiante, para así evitar al máximo la ocurrencia de accidentes. Se aconseja no usar corbata ni bufandas en el laboratorio y recogerse el pelo, si se lleva largo, por ser elementos muy susceptibles de enredarse y ocasionar accidentes.

2. Preparación y manejo de reactivos

Muchas de las sustancias químicas que se emplean en el laboratorio tienen características indeseables, como corrosividad, toxicidad, inflamabilidad, por lo que se deben manejar con cuidado, evitando el contacto con la piel y su ingestión accidental por el mal uso de pipetas, así como el uso de mecheros y llamas. Es necesario prestar especial atención durante el manejo de: ácidos, como clorhídrico, acético, sulfúrico; bases, como hidróxido de sodio o de potasio; solventes orgánicos, como cloroformo, éter, acetona, y monómeros, como la acrilamida y la bis-acrilamida usadas para la elec-

troforesis. Es conveniente que estos reactivos se manipulen en cabina de seguridad.

En cada práctica se incluye el procedimiento para la preparación de reactivos y se indican las cantidades a preparar y las formas de almacenamiento, para evitar contaminación y desperdicio de reactivos. Es imperativo rotular de manera clara y precisa cada una de las soluciones preparadas, para que no haya confusiones y pérdidas de reactivos.

3. Manipulación de muestras biológicas

El empleo de muestras biológicas en la experimentación bioquímica impone cuidados adicionales que tienen que ver con lo que se llama genéricamente bioseguridad, que en palabras simples significa evitar el contagio de enfermedades por el uso o disposición de muestras tales como sangre, saliva, órganos y tejidos biológicos. Una precaución básica es la utilización de guantes durante su manipulación. Los residuos que se generen de esta manipulación se deben colocar en dispositivos adecuados para que posteriormente sean recogidos por los transportadores de desechos biológicos.

Por otra parte, la naturaleza de las muestras biológicas las hace propensas a sufrir cambios por acción de enzimas y/o contaminación por microorganismos, lo que se minimiza procesándolas rápidamente en el laboratorio y, de ser necesario, almacenándolas por tiempos cortos, bien sea refrigeradas o congeladas o bajo atmósferas inertes.

4. Manejo de instrumentos y equipos de laboratorio

En los laboratorios de docencia e investigación en bioquímica hay una serie de equipos básicos, como micropipetas, balanzas, pHmetros, centrífugas, planchas de calentamiento, termostatos, estufas, espectrofotómetros, agitadores magnéticos y mecánicos, que se deben utilizar con las debidas precauciones y siguiendo las instrucciones de uso dadas por el manual del instrumento o por el profesor. En el laboratorio también se encuentran pipetas y material de vidrio que deben manejarse cuidadosamente para evitar que se rompan y causen heridas.

5. Disposición responsable de desechos y residuos

Los desechos o residuos que se generen durante el experimento se deben disponer de manera segura para el experimentador y para el medio ambiente, de acuerdo con las normas que para ello ha establecido la Universidad Nacional de Colombia, a través de la oficina de Gestión ambiental (tel. 3165000 ext. 18550). La clasificación adoptada para facilitar el traslado

interno de residuos químicos desde las unidades generadoras hacia el almacenamiento temporal es:

Tipo 1: residuos acuosos sin metales pesados
Tipo 2: residuos orgánicos que no contienen halógenos ni nitrógeno
Tipo 3: residuos orgánicos que contienen halógenos y nitrógeno
Tipo 4: residuos con características especiales: producción en grandes volúmenes (más de 100 L), posibilidad de reciclaje, alta toxicidad
Tipo 5: residuos acuosos con metales pesados.

Con este propósito en el laboratorio se encuentran recipientes para la disposición de residuos líquidos, clasificados de acuerdo al tipo de residuo y al tratamiento posterior requerido. Las soluciones ácidas o básicas se deben neutralizar antes de verterlas en el frasco para su disposición final. Los residuos sólidos se deben recoger en su totalidad y depositar en las canecas del laboratorio.

Aprovechamiento del trabajo en el laboratorio

Para lograr el máximo provecho del laboratorio, en términos de aprendizaje, es indispensable la lectura previa del capítulo correspondiente a la práctica que se va a realizar. Con esto se asegura que haya claridad en los objetivos y un uso racional del tiempo y de los materiales y las muestras. Las actividades se han planificado cuidadosamente, se explican con detalle y se deben realizar de acuerdo con la guía y en el orden recomendado.

El estudiante debe tener un cuaderno de laboratorio para registrar los datos y las observaciones que se vayan obteniendo en el curso del experimento; estos datos serán la base para la elaboración del informe del laboratorio y por tanto el cuidado y la precisión en el registro de los datos es clave para evitar confusión y errores. Como norma, al final de la práctica el estudiante debe dejar copia de los datos a los profesores.

Durante el desarrollo del experimento se debe mantener el orden en el sitio de trabajo, limpiando de inmediato cualquier derrame y retirando el material que ya se haya utilizado.

Todo el trabajo realizado en el laboratorio se resume en un informe, en el que el estudiante contrasta si se cumplieron los objetivos, procesa los datos, elabora las gráficas y analiza y discute el procedimiento seguido y los resultados logrados. Se espera además que el estudiante elabore en él las

conclusiones derivadas del experimento. Adicionalmente, y con el fin de ampliar, aplicar y consolidar los conocimientos, en cada práctica se incluye un cuestionario que debe ser respondido y anexado al informe. El formato que se incluye al final de cada práctica es una guía para facilitar la presentación del informe.

Práctica N° 1
Extracción e hidrólisis del almidón

Objetivos

Extraer almidón de una muestra vegetal y comparar los resultados de su hidrólisis ácida y enzimática.

La práctica comprende las siguientes actividades:
- Extracción del almidón de harina de trigo
- Hidrólisis del almidón con HCl y α-amilasa salival
- Determinación del grado de hidrólisis, a través del análisis colorimétrico de la glucosa liberada
- Caracterización de los productos de hidrólisis por cromatografía en sílica gel
- Determinación del contenido de gluten por el método de micro-Kjeldahl.

Fundamento teórico

El almidón es un homopolisacárido de reserva producido por las plantas. Mientras que las plantas verdes producen almidón como producto final de la fotosíntesis, los cereales (trigo, arroz, maíz, sorgo) se destacan por un alto contenido de almidón en sus semillas. Estos cereales, junto con otros cultivos como papa, yuca, en los que el almidón se almacena en un tubérculo, proporcionan la mayor parte de las calorías que la humanidad consume.

A diferencia de la celulosa, los almidones no son moléculas simples sino mezclas de dos polisacáridos estructuralmente diferentes: la amilosa y la amilopectina.

La amilosa es un polímero lineal cuyos residuos de glucosa están unidos mediante enlaces α-1,4; poseen un extremo no reductor y otro reductor y su peso molecular varía entre algunos miles y 150.000 Da. La amilosa da una coloración azul en presencia de yodo (prueba de Lugol), por la capacidad del yoduro para ocupar una posición en el interior de una espiral de unidades de glucosa, formada cuando la amilosa se suspende en agua.

La amilopectina es una molécula ramificada que, además de los enlaces glicosídicos α-1,4, presenta enlaces α-1,6. Su peso molecular varía ampliamente y puede ser de 500.000 Da o más. La amilopectina da un color púrpura o rojo en presencia del yodo.

El almidón puede hidrolizarse por acción de amilasas (producidas en plantas, bacterias y animales) o por ácidos inorgánicos.

Los almidones naturales pueden separarse en dos fracciones al hervir el almidón en butanol acuoso y dejar enfriar la suspensión. La porción precipitada se denomina amilosa, o fracción de almidón insoluble. La porción suspendida se llama amilopectina, o fracción de almidón soluble.

El almidón soluble se obtiene también tratando previamente el almidón con HCl diluido y frío. La solución de almidón soluble tiene un escaso poder reductor frente al reactivo de Fehling y da color azul intenso con el reactivo de Lugol. El calentamiento con solución de KOH 5% da color amarillo fuerte, mientras que el almidón ordinario no produce color y las dextrinas dan un color marrón.

Las dextrinas de buena calidad se pueden preparar por calentamiento del almidón, previamente embebido en una pequeña cantidad de HNO_3 diluido y luego secado a 110-115 °C. El producto se conoce como dextrina blanca y puede contener 15% de almidón soluble; el resto se compone en gran parte de eritrodextrina. Las dextrinas amarillas, obtenidas por calentamiento del almidón a 150-250 °C sin adición previa de ácido, están hidrolizadas de forma más completa y, a diferencia de la variedad blanca, contienen cantidades apreciables de maltosa, sustancia que puede detectarse y determinarse con la prueba de Fehling.

El almidón se obtiene en especial de cereales, como maíz, trigo, arroz, sorgo, y de tubérculos, como batata, yuca, papa, a través de procesos que involucran la separación de la fibra y la proteína. El almidón no modificado, o almidón nativo, se comercializa en seco y se elabora en diferentes calidades para consumo humano e industrial.

Los almidones modificados, a los que se les ha alterado una o varias propiedades químicas, pueden obtenerse mediante distintos procesos, como gelatinización, fluidización por ácidos, eterificación, esterificación, enlaces cruzados y oxidación. Estos almidones modificados presentan más propiedades funcionales que los nativos, por lo que en general tienen más usos en la industria, como agentes estabilizadores, emulsionantes, humectantes, espesantes, etc., en productos con distintos pH, sales, sólidos, lípidos. Es decir, que se cuenta con un almidón modificado para cada necesidad.

Los almidones, bien sean nativos o modificados, se utilizan ampliamente en la industria de alimentos: por ejemplo, la harina de trigo que se obtiene por molienda del trigo se emplea para elaborar productos de panificación o para obtener sémola y semolina, materias primas en la elaboración de pastas alimenticias. La harina de trigo contiene un elevado porcentaje de carbohidratos (75,1%), proteínas (10,4%) y un bajo porcentaje de grasa (0,5%). Además tiene minerales, como calcio, fósforo, hierro, y trazas de algunas vitaminas, como niacina, riboflavina y tiamina. La producción de almidón de trigo es importante en Australia y en la Comunidad Económica Europea.

Las proteínas del trigo se clasifican como: proteínas solubles, que comprenden las albúminas y las globulinas (6-12% y 5-12% del total de proteínas, respectivamente), solubles en agua y en sales diluidas, y las proteínas de gluten insolubles, conformadas por gliadinas y gluteninas. Estas proteínas son más abundantes que las solubles y muy importantes por su capacidad para formar el gluten, que es el complejo elástico y cohesivo que se crea cuando la harina de trigo se mezcla con agua y se amasa.

Las ventajas del almidón de trigo para la panificación, si se comparan con las del de arroz, maíz y papa, se atribuyen a varios factores, entre ellos el área y las características de la superficie del gránulo, que contribuyen durante el amasado a la formación de un enlace fuerte con las proteínas del gluten. Las propiedades de gelatinización, determinadas por factores como el tamaño molecular de la amilosa y de la amilopectina y las proporciones relativas de estos dos componentes, también influyen en la calidad de la harina de trigo.

Hidrólisis enzimática

La α-amilasa, presente en el tracto digestivo de los animales (en la saliva y el jugo pancreático), hidroliza la cadena lineal de la amilosa atacando los enlaces α-1,4 al azar a lo largo de la cadena, produciendo una mezcla de maltosa y glucosa. La ß-amilasa, una enzima de origen vegetal presente en la malta de cebada, rompe en forma ordenada la cadena, comenzando por el extremo no reductor de la amilosa, para producir unidades de maltosa.

La amilopectina también es atacada por estas enzimas, pero los enlaces glicosídicos α-1,4 próximos al punto de ramificación de la amilopectina y el mismo enlace α-1,6 no se hidrolizan. Una enzima desramificante individual, la α-1,6-glucosidasa, hidroliza el enlace en el punto de ramificación. En consecuencia, por la acción combinada de la α-amilasa y la α-1,6-glucosidasa se hidroliza la amilopectina hasta obtener una mezcla de glucosa y maltosa.

En las células animales el glucógeno es un polisacárido de reserva, que se acumula en las células hepáticas y musculares. Estructuralmente el glucógeno es

una molécula de poliglucosa ramificada similar a la amilopectina del almidón, pero con mayor número de ramificaciones, ya que posee puntos de ramificación cada 8-10 unidades de glucosa. Esta molécula es degradada dentro de la célula por acción de la glucógeno fosforilasa y también puede ser hidrolizada por las α- y ß-amilasas, para formar glucosa, maltosa y dextrina límite.

El hombre puede digerir el almidón, a diferencia de la celulosa, por la presencia de α-amilasa salival y pancreática en las secreciones digestivas. Por acción combinada con otras enzimas digestivas, tales como maltasa y enzimas desramificantes, el almidón se degrada por completo a D-glucosa, que se absorbe y metaboliza.

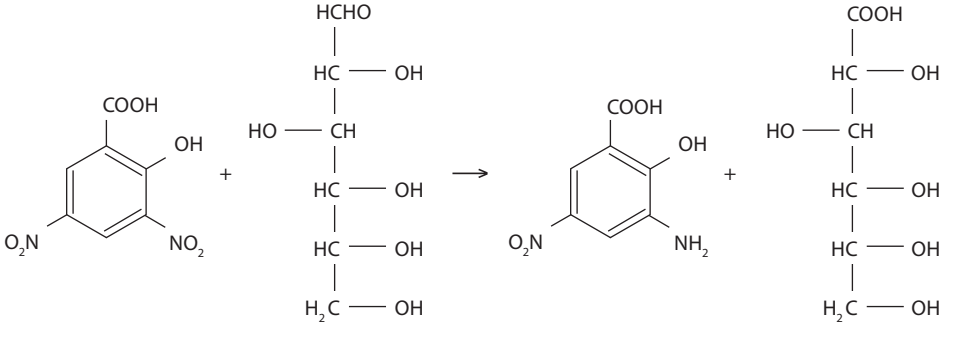
En años recientes, uno de los usos del almidón con mayor crecimiento es la producción de jarabe de fructosa a partir del almidón nativo, empleado como edulcorante de las bebidas carbonatadas. Su proceso de manufactura utiliza tres enzimas claves: una α-amilasa termoestable que hidroliza el almidón a 105 °C y produce maltodextrinas, para luego obtener un jarabe de glucosa, por acción de la amiloglucosidasa. Con este jarabe, la glucosa isomerasa produce fructosa, un azúcar con un poder edulcorante superior al de la sacarosa.

En la industria el método preferido para la hidrólisis del almidón es el enzimático, pues produce menos reacciones secundarias que la hidrólisis ácida.

Hidrólisis ácida

En la hidrólisis ácida del almidón hay un rompimiento al azar de los enlaces glicosídicos a la temperatura de ebullición, con la formación intermedia de oligosacáridos, que se convierten finalmente en glucosa.

La detección de la glucosa liberada en la hidrólisis ácida o enzimática puede llevarse a cabo a través de la reacción colorimétrica con el reactivo 3,5-dinitro salicilato, que en presencia de glucosa da origen al 3-amino-5-nitrosalicilato, compuesto coloreado que absorbe a 540 nm, de acuerdo con la reacción siguiente:



Análisis cromatográfico de carbohidratos

En el análisis cromatográfico de los carbohidratos se deben tener en cuenta sus propiedades, principalmente su solubilidad. Los azúcares, ya que tienen muchos grupos hidroxilo, son solubles en agua y su coeficiente de reparto está notablemente a favor de la fase acuosa. Esto permite su separación por cromatografía de reparto, es decir, a través de una fase estacionaria que retenga agua, como la celulosa o el papel, y de eluyentes de carácter polar.

Los valores de la relación de frentes (Rf) de los azúcares decrecen con el número de hidroxilos y con el peso molecular, de manera que el Rf de las pentosas es menor que el de las hexosas y que el de los disacáridos.

En los métodos cromatográficos hay migración del eluyente a través de la fase estacionaria; el eluyente asciende por capilaridad, constituyendo la fase móvil, la cual al pasar por la muestra la disuelve, y al continuar su ascenso efectúa la migración diferencial de los constituyentes de la mezcla en la fase estacionaria, de acuerdo a interacciones tales como reparto, adsorción, etc.

Las sustancias que pueden interferir en el análisis cromatográfico, como es el caso de sales inorgánicas en más del 5% y proteínas en más del 2%, deben eliminarse del extracto pues afectan los valores de Rf al producir manchas alargadas y, en consecuencia, dificultan o impiden la identificación de los carbohidratos a través de la comparación de sus valores de Rf con los de los patrones.

Método de Kjeldahl

En 1883 el investigador danés Johann Kjeldahl desarrolló el método más usado en la actualidad para el análisis de proteínas. Este método, diseñado para la determinación de nitrógeno orgánico total, puede aplicarse al análisis de proteína bruta o de proteína verdadera de una muestra sólida o líquida. La proteína bruta incluye todos los compuestos nitrogenados presentes, proteicos y no proteicos.

Los resultados de los análisis por Kjeldahl se expresan como proteína bruta, multiplicando el porcentaje de nitrógeno en la muestra por 6,25. Esta conversión se basa en el hecho de que el contenido promedio de nitrógeno de muchas proteínas es 16%. Aunque este promedio puede no ser válido para proteínas específicas purificadas, es lo suficientemente exacto para la mayoría de proteínas.

Para determinar la proteína verdadera en un extracto proteico, hay que separarla por precipitación con ácido tricloroacético al 10%; en el sobrenadante que queda, se analiza el nitrógeno no proteico. La diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno no proteico es la fracción de nitrógeno correspondiente a la proteína verdadera.

Para la determinación de nitrógeno presente en la muestra es necesario realizar la digestión del compuesto hasta CO_2 e iones NH_4^+, por tratamiento en caliente con ácido sulfúrico concentrado en presencia de mezcla catalizadora. Si se trata de determinar el nitrógeno en compuestos con enlaces N-N, NO y NO_2, se deben tratar previamente con agentes reductores para convertirlos en grupos amino.

La concentración del amonio producido se determina agregando un exceso de álcali a la solución, con lo cual se desplazan los iones de bisulfato amónico a la forma de hidróxido de amonio. Este último se arrastra por destilación con vapor de agua en un sistema cerrado y se absorbe en una solución de ácido bórico. El borato ácido de amonio producido se titula con una solución de ácido fuerte (HCl) de concentración conocida.

El método es reproducible y requiere que el contenido de proteína de la muestra sea mayor a 3 mg/mL, para muestras líquidas, o mayor a 3 mg/g, para muestras sólidas.

El método de Kjeldahl se recomienda para determinar proteína en mezclas crudas y relativamente grandes, pero no es aconsejable cuando se trata de un número grande de muestras de proteína soluble relativamente pura, ya que en general es dispendioso y consumidor de tiempo.

Las reacciones que ocurren durante todo el proceso son:

a. Digestión:

$$\text{N orgánico} + H_2SO_4 \xrightarrow[\text{calor}]{\text{catalizador}} NH_4HSO_4 + CO_2 + SO_2 + SO_3$$

b. Destilación:

$$NH_4HSO_4 + NaOH \longrightarrow NH_4OH + NaHSO_4$$

c. Absorción:

$$NH_4OH + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4H_2BO_3 + H_2O$$

d. Titulación:

$$NH_4H_2BO_3 + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_3BO_3$$

Procedimiento experimental

Experimentos

Extracción del almidón

Pese 0,5 g de harina de trigo en un vidrio de reloj o en un vaso pequeño. Agregue a la harina 1 o 2 gotas de agua, humecte y amase con la yema de los dedos para formar una bolita. Coloque la masa formada en un embudo, sin papel de filtro, y con una bureta o una pipeta Pasteur agregue lentamente agua para lavar el almidón; recoja las aguas de lavado en un vaso de precipitados y continúe el lavado hasta que no se extraiga más almidón. El material residual constituye el gluten, que es de color gris oscuro. Mida el volumen de las aguas de lavado que contienen el almidón. Homogenice, tome una alícuota de 20 mL y llévela a sequedad a 100 °C. Deje enfriar y pese. Calcule el porcentaje de almidón presente en la harina.

A partir de este almidón prepare una solución de concentración 20 mg/mL (solución problema), para realizarle hidrólisis ácida y enzimática.

Cuantificación del gluten por el método de Kjeldahl (técnica micro)

Existen diferentes métodos para analizar el contenido de proteínas en una muestra, sin embargo, como la proteína del gluten es insoluble, su determinación sólo puede hacerse por la técnica de Kjeldahl.

Pase el residuo del gluten a un vidrio de reloj previamente pesado y séquelo en la estufa a 100 °C. Determine el peso total del gluten y también, el contenido de proteína total por el método de micro-Kjeldahl, de acuerdo con los pasos siguientes:

Digestión

En un balón Kjeldahl coloque en su orden lo siguiente:

1. Muestra de gluten exactamente pesada: 45-50 mg (haga duplicado)
2. Mezcla catalizadora: aproximadamente 100 mg
3. H_2SO_4 concentrado: 30-40 gotas
4. En otro balón prepare el blanco, colocando la mezcla catalizadora y el H_2SO_4.
5. Lleve los dos balones al digestor, ubicado en la campana de extracción. Caliente al principio suavemente durante unos 5 min, con el fin de eliminar por evaporación la mayor parte de la humedad que acompaña a la muestra. Suba gradualmente el calor hasta una temperatura tal que los vapores de SO_3 (vapores irritantes producidos por descomposición del H_2SO_4) no lleguen sino a la mitad del cuello del

balón de digestión. Mantenga estas condiciones aproximadamente por 1 h, hasta obtener una solución de color verde esmeralda. Deje enfriar los balones.

Destilación y absorción

En la figura 1.1 se muestra el aparato de destilación. Al balón generador de vapor agréguele agua destilada y perlas de vidrio o pedazos de porcelana, para regular la ebullición. Opere el generador de vapor hasta alcanzar un flujo de vapor constante, lo que se consigue regulando el calor. Entre tanto, la llave de doble paso debe conducir el vapor al vertedero.

Al balón de digestión agréguele con cuidado un poco de agua destilada y agítelo para disolver la suspensión. Si el balón de digestión no tiene boca esmerilada, transfiera cuantitativamente esta mezcla al balón de destilación con boca esmerilada. Lave unas tres veces el balón de digestión, con pequeñas porciones de agua destilada, y agregue esta agua de lavado al balón de destilación. A continuación abra la llave de entrada de agua al refrigerante, para evitar pérdida de amoniaco. En un erlenmeyer de 125 mL, adicione 15 mL de ácido bórico al 4% y 3 gotas de indicador de Taschiro: la solución se torna rojiza. Coloque el erlenmeyer debajo del refrigerante, de modo que la punta del tubo interior quede sumergida en el ácido bórico (figura 1.1).

Coloque el balón de destilación que contiene la mezcla digerida, en el extremo del tubo que conduce el vapor, asegurándose de que quede perfectamente ajustado, para prevenir escapes.

Levante la tapa del embudo que contiene NaOH del 50% para permitir el paso lento de aproximadamente 5 mL de la solución. Asegúrese de que

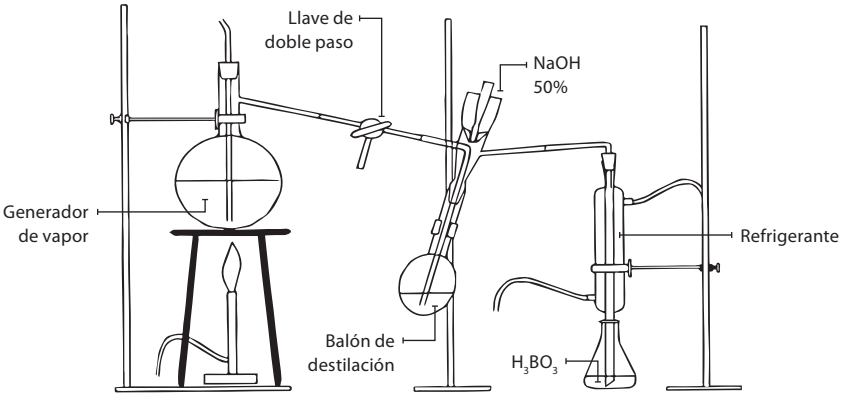


Figura 1.1 Equipo de destilación para el método de Kjeldahl.

quede un poco del líquido en el fondo del embudo para que actúe como sello. Tape rápidamente el embudo y opere la llave de doble paso para que el vapor penetre al balón de destilación, el mismo al que se le acaba de agregar la soda concentrada.

Contabilice 5-10 min a partir del momento en que empiecen a condensarse los vapores de NH_3 en la parte superior del refrigerante, lo que se reconoce cuando la solución de ácido bórico vira a azul. Transcurrido este tiempo, baje el erlenmeyer de modo que el extremo del tubo interior del refrigerante quede por encima del nivel del líquido en el erlenmeyer. Espere 3 min más para que el refrigerante escurra y se lave.

Lave la punta del refrigerante con el frasco lavador y reciba esta agua de lavado en el erlenmeyer. Proceda a la titulación.

Adicionalmente, retire el balón de destilación y deje pasar el vapor para efectos de lavado. Opere en seguida la llave de doble paso para dirigir el vapor hacia el vertedero. Lave el extremo del tubo que conduce el vapor al balón de destilación, con el fin de dejarlo limpio para la próxima destilación.

Titulación

Titule la solución del erlenmeyer correspondiente al blanco con HCl 0,010 N valorado, hasta que alcance la misma coloración que tenía antes de recibir el destilado. Luego, titule uno a uno los demás erlenmeyers provenientes de la destilación hasta que obtenga una coloración final en cada uno igual a la alcanzada con el blanco.

Preparación del extracto enzimático

Enjuáguese la boca con agua destilada o suero fisiológico y descarte este líquido. Recoja 3 mL de saliva en un vaso de precipitados y adicione 3 mL de buffer fosfatos y mezcle. Esta solución es el extracto enzimático (EE). Coloque 1 mL de este extracto en un tubo de ensayo y caliéntelo cuidadosamente hasta que hierva. Esta solución es el extracto enzimático hervido (EE hervido).

Realice una prueba preliminar para estimar la actividad del extracto enzimático, de la siguiente manera: coloque 0,5 mL de solución patrón de almidón en un tubo de ensayo y agregue 0,5 mL del extracto enzimático. Mezcle bien y deje en reposo a temperatura ambiente 3 min. A continuación agregue 2 gotas de reactivo de Lugol (yodo-yoduro de potasio) y observe la coloración. Una coloración azul oscura es prueba positiva para almidón, lo que indicaría actividad débil de la amilasa en saliva. En este caso es necesario adicionar mayor cantidad de extracto enzimático o cambiarlo por saliva de otro donante y hacerle la prueba preliminar.

Hidrólisis enzimática

Rotule 10 tubos de ensayo y añada los reactivos en el orden que se indica en la tabla siguiente, mezclando bien después de cada adición.

Patrón: almidón soluble 20 mg/mL

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solución patrón (mL)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Solución problema (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
H_2O destilada (mL)	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,5-dinitrosalicilato (mL)	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto enzimático (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Extracto enzimático hervido (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-

Contabilice el tiempo de hidrólisis desde el momento en que adiciona la enzima:

Tiempo de hidrólisis (min)	-	-	2	4	6	8	10	25	25	25

Deje los tubos a temperatura ambiente. Al completar el tiempo de hidrólisis de cada tubo, retire un alícuota de 0,3 mL y recíbala sobre 0,3 mL de ácido tricloroacético al 10%, esta muestra se utilizará para la cromatografía. Al resto del hidrolizado adiciónele inmediatamente 1 mL de 3,5-dinitrosalicilato, para detener la reacción enzimática.

A continuación, coloque los 9 tubos en baño de maría con agua en ebullición durante 5 min con el fin de desarrollar el color. Retírelos, enfríelos y llévelos a un volumen de 5 mL con agua destilada. Mezcle y mida la absorbancia (Abs) en cada tubo a 540 nm. Si los valores de absorbancia son muy altos, diluya con agua las soluciones en todos los tubos hasta un volumen final de 10 mL. Lea de nuevo la absorbancia. En caso de que algún tubo presente un color amarillo claro, agregue una gota de NaOH concentrado.

Hidrólisis ácida

Rotule 9 tubos y agregue en su orden las cantidades de reactivos indicadas en la siguiente tabla:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución patrón (mL)	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-
Solución problema (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
Agua destilada (mL)	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
NaOH 2,4 N (mL)	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-

Coloque los tubos en baño de maría con agua en ebullición. Agregue:

HCl 4 N (mL)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

Controle el tiempo de hidrólisis de cada tubo:

Tiempo de hidrólisis (min)	0	0	2	4	6	8	10	25	25

Al completar el tiempo de hidrólisis a los tubos del N° 2 al N° 8 adicióneles inmediatamente 1,5 mL de NaOH 2,4 N para suspender la hidrólisis ácida.

De los 9 tubos neutralizados a los diferentes tiempos, retire 0,3 mL de cada uno para la cromatografía y al resto de la solución agregue 1 mL de 3,5-dinitrosalicilato. Caliente todos los tubos en baño de maría con agua en ebullición durante 5 min, para el desarrollo de color. Enfríelos y llévelos a un volumen final de 5 mL con agua destilada. Mida la absorbancia de cada tubo a 540 nm. Si los valores de absorbancia son muy altos, diluya la solución en todos los tubos, con agua, hasta un volumen final de 10 mL. Lea nuevamente la absorbancia. En caso de que algún tubo presente un color amarillo claro, agregue una gota de NaOH concentrado.

Cromatografía en placa de sílica gel

Antes de iniciar la práctica, sature la cámara de cromatografía con 100 mL de mezcla de solventes: n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1). Inicialmente adicione el n-butanol y el agua, mezcle y espere 15 min; añada entonces el ácido acético y mezcle.

Con las diferentes muestras de la hidrólisis ácida y enzimática (de los tiempos de hidrólisis 0, 2, 25 min y la muestra problema) realice una cromatografía en placa, utilizando patrones de carbohidratos (almidón, dextrina, maltosa, glucosa al 5% en agua) para comparar. Aplique suficiente muestra, dejando secar entre una aplicación y otra (aproximadamente 10 aplicaciones). Una vez corrida la cromatografía, deje secar y revele con solución de antrona 0,01% en H_2SO_4 y lleve la placa a la estufa a 100 °C. Marque las manchas reveladas y mida las distancias de migración.

Cálculos y resultados

Presente un informe de sus resultados, según el formato que aparece al final de esta práctica.

Calcule el porcentaje de almidón y de proteína en la muestra de harina de trigo.

Calcule el porcentaje de hidrólisis en cada tubo, tomando como 100% de hidrólisis el valor de la absorbancia del tubo N° 7 de la hidrólisis ácida.

Haga las gráficas 1.1a y 1.1b, del porcentaje de hidrólisis vs. tiempo, tanto para la hidrólisis ácida (a) como para la enzimática (b), en una misma hoja de papel.

Calcule el Rf en cada una de las muestras y en los patrones de carbohidratos.

Interprete sus resultados.

Cuestionario

1. ¿Cómo se lleva a cabo la biosíntesis del almidón? Escriba las reacciones.
2. ¿Qué utilidad tiene el almidón a nivel industrial?
3. ¿Qué es la gelatinización del almidón y qué métodos se utilizan para su determinación?
4. ¿En qué consiste la retrogradación del almidón?
5. ¿Qué alteraciones sufre el almidón al calentarlo con agua?
6. ¿Qué se conoce como *snowflake* y qué aplicaciones tiene?
7. ¿Qué métodos pueden emplearse para analizar el almidón? Explique uno de ellos.

Referencias bibliográficas

Badui, S. 1996. *Química de los alimentos*. 3ª ed. México D.F.: Alhambra Mexicana. pp. 97-103.

Bailey, M.J. 1988. A note on use of dinitrosalicilic acid (DNS) for determining the products of enzymatic reaction. *Applied microbiology and biotechnology* 29: 494-496.

Cobana, M. y R. Antezaba. 2007. Procesos de extracción del almidón de yuca por vía seca. *Revista Boliviana de Química* 24: 77-83.

Dilek, K. y A.B. Osbek. 2004. α-amylase inactivation during corn hydrolysis process. *Process Biochemistry* 39: 1877-1892.

Docentes, Área de productos naturales, farmacognosia y fitoquímica. s.f. Proceso de extracción de almidón de tubérculos. Guías de laboratorio de Fitoquímica. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Extracciondealmidon.blogspot.com; consulta: febrero de 2012.

Herrera, C.H., N. Bolaños y G. Lutz. 2003. *Química de alimentos. Manual de laboratorio.* 1ª ed. Universidad de Costa Rica. p. 7.

Hoover, R. y Y. Zhou. 2003. *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α-amilase and resistant starch formation in legumes. A review. *Carbohydrate Polymers* 54: 401-417.

Kock, H. y H. Roper. 1988. New industrial product for starch. *Starch* 2: 121-131.

Konsula, Z. y M. Liakopolou-Kyriakides. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an alfa-amilase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* 39: 1745-1749.

Letang, C., M.F. Samson, T.M. Lasserre *et al*. 2002. Production of starch with very low protein content from soft and hard wheat flours by jet milling and air classification. *Cereal Chemistry* 79(4): 535-543.

Liu, Q. 2002. A study of enzymatic hydrolysis of starch in potato pulp. *Food chemistry and toxicology* 67: 2113-2117.

Mathews, K., K.E. van Holde y K.G Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. España: Pearson, Addison Wesley. pp. 332-336.

Mazzeo, M.M., G.A. Alzate y M. Marin. 2008. Obtención del almidón a partir de residuos poscosecha del plátano dominico hartón. *Vector* 3: 57-69.

McMurry, J. 2008. *Química orgánica*. 7ª ed. México D.F.: Cengage Learning. pp. 1000-1001.

Polaina, J. 2004. Estructura función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. En: Flores-Herrera, O., H. Riveros, A. Sosa-Peinado *et al*. (eds.). *Mensaje bioquímico.* Vol. XXVIII. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 61-76. En: http://bq.unam.mx/mensajebioquimico.

Productos de Maíz S.A. 1997. El almidón de maíz en la industria de alimentos. *La alimentación latinoamericana* (218): 36-38.

Sherma, J. y B. Fried (eds.). 2003. *Handbook of thin-layer chromatography*. Chromatographic Science Series 89. 3ª ed. Nueva York: Marcel Dekker. pp. 52-56.

Tester, R.F. y X. Karkalas. 2006. Hydrolyisis of native starches with amilases. Review. *Animal Feed Science and Technology* 130(1-2): 39-54.

Vásquez-Contreras, E. Hidrólisis de polisacáridos. Bioquímica y biología molecular en línea. Universidad Autónoma de México. En: http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.html; consulta: abril de 2012.

Young, S., I. Nieto y M. Barrera. 1986. Guías de laboratorio de Análisis orgánico II. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Zahia, N. y G. Chuzel. 1993. Functional properties of native and modified starches alternatives for new industrial uses. Simposio Carbohidratos. Quito, Ecuador. Octubre de 1993. p. 21.

Zossi, B.S., M.E. Navarro, N. Sorol *et al*. 2008. Comparación de dos metodologías de determinación de almidón en azúcar. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* 85: 9-19.

Materiales y reactivos

Materiales

Vasos de precipitados
Tubos de ensayo
Pipetas y micropipetas
Plancha de calentamiento
Aspersor para revelado
Embudo
Bureta
Vidrio de reloj
Cámara de cromatografía
Estufa
Equipo de micro-Kjeldahl

Reactivos

Extracción del almidón

- NaOH 2,4 N: Pese 9,6 g de NaOH y disuélvalos en 100 mL de agua destilada.
- HCl 4 N: Mida 33,4 mL de HCl concentrado y llévelos a un volumen de 100 mL.
- Patrón de almidón soluble, 20 mg/mL: En un balón aforado prepare 25 mL de la solución patrón. Caliente esta solución evitando que llegue a la ebullición.
- Buffer fosfatos 0,02 M, $CaCl_2$ 5 mM y pH 7,0: Disuelva 0,55 g de $Na_2HPO_4.2H_2O$; 0,12 g de $NaH_2PO_4.2H_2O$ y 55 mg de $CaCl_2$ en 100 mL de agua destilada. Mida el pH.
- Solución de 3,5-dinitrosalicilato: Disuelva 5 g de 3,5-dinitro salicilato por calentamiento en 100 mL de NaOH 0,2 N; adicione 250 mL de agua y 150 g de tartrato de sodio y potasio y lleve a 500 mL con agua destilada.
- Eluyente para cromatografía: Butanol-ácido acético-agua 4:1:1. Mezcle inicialmente el butanol con el agua y espere 15 min; adicione el ácido acético.
- Patrones de carbohidratos al 5% en agua: Prepare 5 mL de cada uno de los patrones: glucosa, maltosa, dextrina, almidón, y guárdelos en el congelador.
- Solución reveladora: Prepare una solución de antrona 0,01% en H_2SO_4. Este reactivo puede guardarse en frasco oscuro en la nevera por 2 semanas.

Método de Kjeldahl

- Mezcla catalizadora Sysoev: Mezcle 25 g de K_2SO_4; 6,25 g de $CuSO_4$; 1,89 g de $KMnO_4$ y 0,125 g de selenio. Macere completamente hasta obtener una mezcla homogénea.
- Solución acuosa de ácido bórico al 4%
- H_2SO_4 concentrado
- NaOH 50%
- HCl 0,010 N valorado
- Indicador de Tashiro: Mezcle un volumen de rojo de metilo (0,2% en etanol) con 5 volúmenes de verde de bromocresol (0,2% en etanol).

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 1
Extracción e hidrólisis del almidón

Objetivos

Fundamento teórico y reacciones

Hidrólisis ácida

Hidrólisis enzimática

Reacción de glucosa con 3,5-dinitro salicilato

Cromatografía de azúcares

Tabla de datos y resultados

Peso de harina _____

Peso del almidón _____ % de almidón _____

Peso del gluten _____ % de proteína _____

Muestra de cálculos:

Hidrólisis ácida

Anexar gráfica 1.1a (% de hidrólisis vs. tiempo)

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7
Tiempo de reacción (min)	0	0	2	4	6	8	10	25
Abs 540 nm								
% de hidrólisis								

Muestra de cálculos:

Hidrólisis enzimática

Anexar gráfica 1.1b (% hidrólisis vs. tiempo)

Nombre de la enzima _____

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo de reacción (min)	0	0	2	4	6	8	10	25	25*
Abs 540 nm									
% hidrólisis**									

*Extracto enzimático calentado a ebullición
**El 100% de hidrólisis corresponde al valor de absorción del tubo N° 7 de hidrólisis ácida.

Muestra de cálculos:

Cromatografía de azúcares

Anexar cromatogramas

Fase estacionaria _____ Fase móvil _____

Revelador _____

Patrones _____

Rf calculados	Patrones	Muestras

Discusión de resultados y conclusiones

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 2
Aminoácidos: curvas de titulación y separación por intercambio iónico

Objetivos

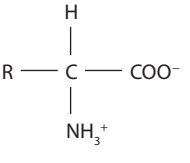
Comprobar el carácter anfotérico de los aminoácidos y determinar los valores de pK de los grupos ionizables, calcular el punto isoeléctrico y separar una mezcla de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico.

La práctica comprende las siguientes actividades:

- Realización de las curvas de titulación para un aminoácido polar y uno no polar
- Separación de una mezcla de histidina, ácido aspártico y lisina, sobre una resina de intercambio catiónico
- Seguimiento de la separación, a través de reacción con ninhidrina, para detectar la presencia de los aminoácidos.

Fundamento teórico

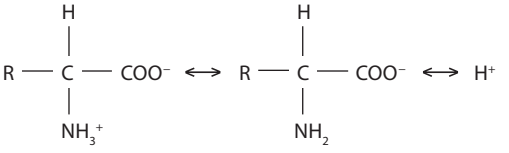
Los veinte aminoácidos (aa) que forman las proteínas son L-aa y α-aa. Tienen una estructura común caracterizada por la presencia de un grupo amino, un grupo carboxilo y un hidrógeno sobre el mismo átomo de carbono, llamado carbono α. A su vez, los veinte aminoácidos se diferencian por la naturaleza del cuarto sustituyente, llamado en general R.



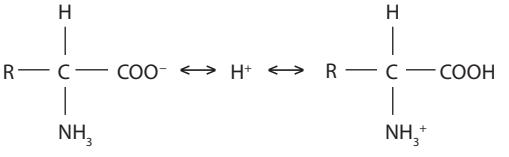
Como los aminoácidos poseen un grupo amino y uno carboxilo, deben reaccionar con ácidos y álcalis. Estos compuestos se conocen como sustancias anfotéricas.

En soluciones de pH neutro, los aminoácidos existen como zwitteriones (iones dipolares), en los que el grupo carboxilo está disociado y el grupo amino está protonado.

El zwitterión puede actuar como un ácido (donor de protones):



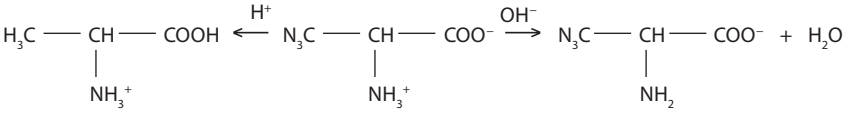
o como una base (aceptor de protones):



Los aminoácidos tienen curvas de titulación características, y de ellas se pueden obtener los valores de pK de cada uno de los grupos ionizables.

El comportamiento anfótero de cada uno de los aminoácidos y sus valores de punto isoeléctrico (pI) son consecuencia de su estructura particular, ya que también contribuyen a la carga los grupos ionizables de la cadena lateral R. Esto se refleja en la curva de titulación.

Para un aminoácido como la alanina, las fórmulas siguientes representan las reacciones de ionización que ocurren en el proceso de titulación:



Cromatografía de intercambio iónico

Es un método de separación de compuestos sobre una matriz insoluble que contiene iones fácilmente intercambiables con los iones del medio que los rodea.

Un intercambiador es un material (resina) insoluble que contiene grupos cargados unidos químicamente y iones móviles intercambiables (contraiones que mantienen la neutralidad eléctrica).

El intercambio ocurre de manera reversible con otro ión de la misma carga, sin que se afecte la matriz, o soporte.

El intercambio se puede representar por la ecuación:

$$R{-}I_{sólido} + A{-}I^*_{solución} \longleftrightarrow R{-}I^*_{sólido} + A{-}I_{solución}$$

donde I es el ión móvil intercambiable, o contraión; A, el anión e I* es el ión que va a realizar el intercambio.

$$^{-}I_{sólido} + I^*_{solución} \longleftrightarrow {}^{-}I^*_{sólido} + I_{solución}$$

$$K_I^{I^*} = [^{-}I^*]\,[I] \;/\; [^{-}I]\,[I^*]$$

donde $K_I^{I^*}$ se define como el coeficiente de selectividad: si es >1, muestra preferencia por I* y si es <1, muestra preferencia por I.

Un intercambiador aniónico tiene grupos funcionales positivos y contraiones negativos, por lo tanto es un cambiador de iones negativos (aniones).

Un intercambiador catiónico tiene grupos funcionales negativos y contraiones positivos, por lo tanto es un cambiador de iones positivos (cationes).

La capacidad de un intercambiador se define cuantitativamente por su habilidad para recibir iones intercambiables.

La capacidad total es la cantidad de cargas y grupos potencialmente intercambiables por gramo de resina seca. La capacidad aprovechable es la que se obtiene bajo condiciones experimentales específicas.

Los intercambiadores son en esencia ácidos o bases insolubles, preferiblemente de carácter monofuncional. Los más importantes corresponden a tres tipos químicos:

1. Resinas aniónicas y catiónicas de poliestireno
2. Resinas catiónicas de ácido poliacrílico
3. Resinas aniónicas y catiónicas basadas en polisacáridos (celulosa, dextranos).

En estos materiales la insolubilidad se logra por entrecruzamiento del polímero lineal, y a continuación los grupos básicos o acídicos se introducen por reacción química. Los grupos funcionales más comunes y las características que confieren a las resinas se resumen así:

Resina	Grupos	Características
Catiónica	$-SO_3H$, $-CH_2SO_3H$	Intercambio catiónico fuerte
	$-COOH$, $-PO_3H_2$	Intercambio catiónico débil
Aniónica	Amonio cuaternario	Intercambio aniónico fuerte
	$-NH_2$, $-NHR$, $-NR_1R_2$	Intercambio aniónico débil

1. Resinas aniónicas y catiónicas de poliestireno

Es el grupo más importante de resinas de intercambio iónico y se basa en la introducción de grupos ácidos o básicos en el copolímero estireno-divinilbenceno después de la polimerización. El grado de entrecruzamiento puede variar en el copolímero y también, la cantidad de divinilbenceno utilizado.

Por sulfonación directa se obtiene un intercambiador catiónico fuerte, un producto que es insoluble en solventes comunes, muy estable químicamente y contiene un ácido sulfónico por cada residuo aromático, con una capacidad promedio de 4,5 meq/g de resina seca, dependiendo del entrecruzamiento.

Los nombres comerciales más comunes para estas resinas son: Dowex 50, Amberlita IR-120, Zeo-Carb 225, Duolita C-20. La capacidad de intercambio es más o menos constante a pH superior a 2.

Las resinas catiónicas también pueden obtenerse por introducción de ácido fosfórico a la matriz de poliestireno, formando un intercambiador débil, con pK aparentes de 2-3 y 7-8. La máxima capacidad de cambio es 6-7 meq/g. Se comercializan con los nombres de Duolita C-63 y Nalcita X-219.

Con grupos $–CH_3COO^-$ también se obtiene un intercambiador catiónico débil.

Los intercambiadores aniónicos se logran introduciendo en la matriz de poliestireno el grupo $(CH_3)_3–N^+–CH_2^-$. Pueden tener valores de pK aparente superiores a 13. La capacidad de intercambio está entre 3 y 4 meq/g. Los productos comerciales más comunes son: Amberlita IRA-401 y 410, Dowex 1 y 2, Duolita A-40 y A-42.

Si se introduce una amina primaria o secundaria, se obtiene un intercambiador aniónico débil, con valores de pK aparente de 7-9 y capacidad de intercambio de 5-8 meq/g. Se comercializan con los nombres de Dowex 3, Amberlita IR-45 y Duolita A-14.

2. Resinas catiónicas de ácido poliacrílico

Se preparan por polimerización de ácido metacrílico con divinilbenceno, poseen una acidez carboxílica débil y tienen mayor capacidad de intercambio que las resinas de poliestireno. Su estabilidad química y térmica es muy alta.

Los grupos hidroxilo de estas resinas son ionizados parcialmente a pH menor de 8, por lo que su mayor capacidad de intercambio se presenta a valores de pH relativamente altos. Su capacidad de intercambio es 10 meq/g.

Algunas denominaciones comerciales para estas resinas de ácido poliacrílico son Amberlita IRC-50 y Zeo-Carb 226.

3. Resinas iónicas basadas en polisacáridos

Los más importantes son los intercambiadores a base de celulosa, dextranos (Sephadex) y agarosa, disponibles comercialmente en varias formas.

Los grupos que por lo general se introducen a los intercambiadores iónicos de celulosa son:

Grupos	Resina	Tipo de resina
$-CH_2COOH$, carboximetil	CM-celulosa	Catiónica
$(CH_3-CH_2)_2\ N-(CH_2)^-$, dietilaminoetil	DEAE-celulosa	Aniónica
$-CH_2-PO_3H_2$, fosfoetil	PE-celulosa	Catiónica
$-CH_2-SO_3H$, sulfoetil	SE-celulosa	Catiónica

Los grupos que generalmente se introducen sobre el dextrano son:

Grupos	Resina	Tipo de resina
$(CH_3-CH_2)_2N^+-CH-CH_2-$, dietilaminoetil	DEAE-Sephadex	Aniónica
$-C_2H_4\ N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$, dietil-2-hidroxipropil-aminoetil	QAE-Sephadex	Aniónica
$-CH_2-COOH$, carboximetil	CM-Sephadex	Catiónica
$-C_3H_6SO_3H$, sulfopropil	SP-Sephadex	Catiónica

El Sephadex es más reticulado que la celulosa y se le puede introducir un mayor número de grupos. Estas resinas son insolubles en todos los solventes, estables en agua, soluciones salinas, ácidos y bases débiles. Las soluciones ácidas fuertes pueden hidrolizar sus enlaces glicosídicos.

Propiedades generales de las resinas de intercambio iónico

- Hinchamiento: Depende del entrecruzamiento, la fuerza iónica y el pH.
- Capacidad de intercambio: Depende de la porosidad, la fuerza iónica y el pH.
- Estabilidad: A fuerza iónica alta, la resina se compacta, disminuye de tamaño. A fuerza iónica baja, la resina se hincha. La capacidad depende del pH y de la carga que tengan los grupos. En cuanto a la estabilidad, es mayor para las resinas aniónicas y catiónicas fuertes que para las débiles.

Para seleccionar un intercambiador se debe tener en cuenta:

- La matriz, según la carga de las moléculas que se desean separar
- La capacidad

- La accesibilidad de los grupos
- El buffer
- Las condiciones de elución: gradientes de pH, gradientes de fuerza iónica
- El desplazamiento.

Procedimiento experimental

Experimentos

Curvas de titulación

En un vaso de precipitados de 100 mL adicione 10 mL de la solución de aminoácido 0,1 M. Calibre el pHmetro y determine el pH inicial de la solución. Con una bureta agregue HCl 0,1 M, adicionando cada vez 0,5 mL, y determine el pH después de cada adición. Continúe agregando ácido hasta pH 1,5, aproximadamente. Registre los valores de pH y de ácido adicionado (mL).

Lave el electrodo con agua destilada y titule de la misma manera otros 10 mL de la solución de aminoácido, agregando NaOH 0,1 M hasta pH 12,5.

La titulación se debe hacer con un aminoácido polar y con otro no polar.

A partir de las curvas de titulación determine los valores de pK y calcule los puntos isoeléctricos (pI).

Separación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico

Preparación de la columna

La resina AG-50W-XB es una resina sulfónica de poliestireno, de intercambio catiónico (BioRad Laboratories). Según disponibilidad, puede usarse también Amberlita IRC-50, grado analítico, de 14-52 mallas (Hopkins & Williams Ltd.). En un vaso de precipitados suspenda 10 g de la resina en HCl 0,1 N, agite por varios minutos y deje sedimentar. Descarte el HCl y lave varias veces la resina con agua destilada. Suspenda la resina lavada en tres volúmenes de buffer citrato pH 3,5. Agite por varios minutos y deje sedimentar. Mida con papel indicador el pH del sobrenadante y si es el mismo que el del buffer, la resina está lista para ser usada. Si es necesario, repita el lavado con el buffer.

Empaque la columna con la resina suspendida en el buffer y deje que el líquido baje hasta quedar justamente encima del nivel de la resina. Cierre

la llave de la columna y equilibre la resina, pasando unos 50 mL de buffer citrato. Nunca deje secar la columna.

Aplicación de la muestra y separación

Abra la llave de la columna y deje que el nivel del líquido llegue al mismo nivel de la resina. Cierre la llave y aplique 0,9 mL de la mezcla de aminoácidos (ácido aspártico, histidina y lisina). Deje que la muestra entre a la resina. Lave las paredes de la columna con pequeñas porciones de buffer citrato. Cierre la columna y espere 10 min para que ocurra el intercambio. Eluya con el mismo buffer, recogiendo 20 fracciones de 2 mL en tubos de ensayo pequeños y rotulados. El flujo en la columna debe ser 1 mL/min, aproximadamente.

Cierre la columna. Con una pipeta Pasteur retire el buffer citrato que está encima de la resina y cámbielo por buffer fosfato pH 8,0. Eluya con este buffer, recogiendo otras 20 fracciones de 2 mL.

Una vez más cambie el buffer por buffer fosfato pH 11,5. Proceda como antes y recoja 20 fracciones de 2 mL.

A cada una de las fracciones recogidas hágale la prueba de ninhidrina.

Prueba de ninhidrina

En tubos de ensayo pequeños debidamente rotulados, de modo que resistan calentamiento hasta ebullición, mida:

Muestra de cada fracción, 0,5 mL, y ninhidrina, 0,5 mL. Caliente los tubos por 15 min en baño de maría. Retire los tubos y enfríelos a temperatura ambiente.

Agregue 2 mL de agua y mézclelos de inmediato. Lea la absorbancia (Abs) a 570 nm.

Para cada grupo de muestras prepare un blanco con el respectivo buffer de elución.

Nota: El pH de las muestras debe ser cercano a 5. Si es necesario agregue unas pocas gotas de ácido, álcali o de buffer acetato 4 M, pH 5,0.

Cálculos y resultados

Presente un informe con sus resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

Haga las siguientes gráficas:

- Gráficas 2.1a y 2.1b. Perfil de titulación de los aminoácidos: pH vs. meq de HCl y de NaOH agregados, para cada aminoácido. (En la misma gráfica se incluyen las gráficas de los dos aminoácidos, a y b).
- Gráfica 2.2. Perfil de elución: absorbancia vs. número de la fracción. (En la misma gráfica se incluyen los tres eluyentes, indicando en qué fracción se hizo el cambio de eluyente).

De las gráficas 2.1a y 2.1b determine el valor de pK y calcule el pI para cada aminoácido.

Escriba la reacción con ninhidrina.

Interprete los resultados.

Cuestionario

1. ¿En qué orden eluyen los aminoácidos de la columna y por qué?
2. El pH intracelular y el de la sangre son cercanos a 7,4. A ese pH, ¿los aminoácidos son un buen buffer? Explique su respuesta.
3. ¿Qué resultado hubiera obtenido si la titulación de los aminoácidos se hubiera hecho en presencia de formaldehído?
4. Describa la preparación de 2 L de buffer de lisina 0,1 M y de pH 9,5, a partir de clorhidrato de lisina y KOH 1 M. Muestre los cálculos y la utilización de la ecuación de Henderson-Hasselbach.
5. En un campo eléctrico, ¿en qué dirección se moverán los compuestos: ácido aspártico, aspartil glicina, lisil alanina, cisteinil tirosina a pH 1,5; 4,0; 7,0; 10,5 y 13,0?
6. ¿Qué instrumentos se utilizan actualmente para el análisis de mezclas de aminoácidos, y cuál es el fundamento de la separación?

Referencias bibliográficas

Ascencio, C. 2012. *Fisiología de la nutrición*. México D.F.: McGraw Hill. pp. 6-7.

Freifeldes, D. 2003. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. España: Editorial Reverté. pp. 87, 177.

Harris, D.C. 2009. *Análisis químico cualitativo*. 3ª ed. Editorial Iberoamericana. pp. 203, 245-246.

_____. 2007. *Análisis químico cuantitativo*. 3ª ed. España: Editorial Reverté. pp. 641-679.

Mathews, C.K., K.E. van Holde y K.G. Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Pearson, Addison Wesley. p. 141.
Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H Freeman and Co. p. 75.
Stryer, L., J.L. Tymoczko y J.M. Bers. 2006. *Bioquímica*. 6ª ed. Editorial Reverté. p. 1250.
Voet, D., J.G. Voet y C.W. Pratt. 2006. *Bioquímica.* 3ª ed. John Wiley & Sons. pp. 77-92.
http://212.128.130.23/educommons/ciencias-biosanitarias/bioquímica-pH-equilibrios-acido-2013-base/contenidos/4/20curvas/20titulacion/20de/20aminoacidos.pdf; consulta: febrero de 2013.

Materiales y reactivos

Materiales

Guantes de cirugía ajustables (para evitar manchas en la piel con el reactivo de ninhidrina)
Columna para cromatografía (15 cm × 1 cm)
Colorímetro
Vasos de precipitados
Buretas
Agitador magnético
pHmetro
Pipetas
Lana de vidrio
Tubos de ensayo pequeños
Erlenmeyers y vasos de precipitados
Papel indicador universal

Reactivos

- NaOH 0,10 N titulado
- HCl 0,10 N titulado
- Resina de intercambio catiónico
- Metil cellosolve (etilenglicol monometil éter)
- Soluciones de aminoácidos 0,1 M: Se emplean para las curvas de titulación. Prepare 100 mL de cada uno, en agua destilada, pesando la cantidad requerida según los aminoácidos elegidos (uno polar y otro no polar).
- Mezcla de aminoácidos para el intercambio iónico: Disuelva 10 mg de cada uno de los aminoácidos (histidina, aspártico y lisina) en 5 mL de buffer citrato. Aplique 0,9 mL a la columna. Guarde en el congelador la solución restante.

- Buffer citrato 0,1 M, pH 3,5: Peso molecular del ácido cítrico, 192 g/mol. Pese 5,76 g de ácido cítrico, disuelva en 250 mL de agua desionizada y ajuste el pH a 3,5 agregando NaOH. Complete un volumen de 300 mL con agua.
- Buffer fosfato de sodio 0,0 M, pH 8,0: Peso molecular del fosfato disódico anhidro, 141, 96 g/mol. Pese 8,52 g de fosfato disódico, disuelva en 150 mL de agua desionizada y ajuste el pH a 8,0 agregando HCl. Complete a 200 mL con agua.
- Buffer fosfato de sodio 0,4 M, pH 11,5: Peso molecular del fosfato trisódico de sodio, 165 g/mol. Pese 13,2 g de fosfato trisódico y disuélvalos en 150 mL de agua desionizada. Ajuste el pH a 11,5 agregando HCl. Complete a 200 mL con agua.
- Buffer acetato 4 M, pH 5,0: Peso molecular del acetato de sodio, 82 g/mol y del ácido acético, 60 g/mol, PK_a 4,75. Para 250 mL, pese 0,64 moles de sal (52,48 g) y 0,355 moles de ácido (21,3 g); disuelva la sal en agua destilada, mezcle con el ácido, complete a volumen y controle el pH. Ajústelo a pH 5,0, si es necesario.
- Reactivo de ninhidrina: Para 100 mL, disuelva 8 mg de $SnCl_2.2H_2O$ en 50 mL de buffer acetato 4 M, pH 5,0. A esta solución agregue 2,0 g de ninhidrina disuelta en 50 mL de metil cellosolve. Guarde en frasco oscuro.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 2
Aminoácidos: curvas de titulación y separación por intercambio iónico

Objetivos

Fundamento teórico y reacciones

Cromatografía de intercambio iónico

Reacción de ninhidrina

Tablas de datos y resultados

Curvas de titulación

Anexar gráficas 2.1a y 2.1b

a. Nombre del aminoácido titulado _____

Volumen y concentración de la alícuota _____

Normalidad del HCl _____ Normalidad del NaOH _____

HCl (mL)	HCl (meq)	pH	NaOH (mL)	NaOH (meq)	pH

pk_a _____ pI_a _____

b. Nombre del aminoácido titulado _____

Volumen y concentración de la alícuota _____

Normalidad del HCl _____ Normalidad del NaOH _____

HCl (mL)	HCl (meq)	pH

NaOH (mL)	NaOH (meq)	pH

pk_b _____ pI_b _____

Muestra de cálculos:

Cromatografía de intercambio iónico

Anexar gráfica 2.2

Resina utilizada _____ Tamaño de la columna ___ cm × ___ cm

Volumen de resina empacada ____ mL

Composición de la muestra aplicada _____

Volumen de muestra aplicada ____ mL

Elución con _____ Velocidad de flujo ____ mL/min

Fracción N°	Abs 570 nm	Fracción N°	Abs 570 nm	Fracción N°	Abs 570 nm

Elución con _____ Velocidad de flujo ____ mL/min

Fracción N°	Abs 570 nm	Fracción N°	Abs 570 nm	Fracción N°	Abs 570 nm

Elución con _____ Velocidad de flujo ____ mL/min

Fracción N°	Abs 570 nm	Fracción N°	Abs 570 nm	Fracción N°	Abs 570 nm

Reacción con la ninhidrina:

Discusión de resultados y conclusiones

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 3
Extracción de DNA y estudio de algunas propiedades

Objetivos

Extraer y cuantificar el ácido desoxirribonucléico (DNA, siglas en inglés) DNA a partir de células de levadura y observar el efecto de la variación del pH, el calor, el formaldehído, el NaCl y el dimetil sulfóxido (DMSO) sobre sus propiedades.

La práctica comprende las siguientes actividades:

- Obtención del DNA a partir de células de levadura
- Estudio del efecto del pH sobre el DNA de doble hélice
- Estudio del efecto del calor sobre el DNA
- Estudio del efecto del formaldehído y del NaCl
- Estudio del efecto del DMSO
- Cuantificación del DNA por absorción en el ultravioleta (UV).

Fundamento teórico

Todos los tejidos contienen DNA, pero no todos son una buena fuente preparativa. La presencia de enzimas, como la desoxirribonucleasa (DNAasa), la alta proporción de otros componentes, como proteínas y polisacáridos, y las uniones fuertes entre el DNA y las proteínas hacen difícil obtener DNA en su forma nativa.

Aislar DNA también se complica por la presencia de otras clases de ácidos nucleicos, como mRNA, tRNA y rRNA.

Las asociaciones moleculares que los diversos tipos de ácidos nucleicos forman con las proteínas varían de un organismo a otro y de un sitio celular a otro. Ninguna técnica de aislamiento es adecuada para todos los tipos de ácidos nucleicos.

Es posible extraer RNA y DNA de células, fracciones subcelulares o virus teniendo en cuenta las siguientes propiedades:

DNA	RNA
Insoluble en soluciones diluidas de NaCl	Soluble en soluciones diluidas de NaCl
Soluble en soluciones concentradas de NaCl	
Insoluble en alcohol	Insoluble en alcohol
Puede ser disociado de las proteínas por tratamiento con un detergente o un fenol	Puede ser disociado de las proteínas por tratamiento con un detergente o un fenol

Con frecuencia se usan las diferentes solubilidades del RNA y del DNA en soluciones salinas para separarlos. Luego los componentes individuales de una mezcla de RNA o DNA pueden aislarse por métodos cromatográficos (intercambio iónico, tamiz molecular, afinidad), por electroforesis y por ultracentrifugación en gradiente de densidad.

Además está la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, una herramienta muy selectiva para aislar un ácido nucleico específico.

El aislamiento de DNA original intacto es un problema complejo, ya que es difícil recuperar las moléculas en su estado nativo. La mayor parte del DNA tiene un tamaño molecular tal que basta con una ruptura química o enzimática en un nucleótido de cada 1000 para suprimirle la función y la estructura macromolecular.

Sin embargo, muchos problemas de regulación metabólica, diferenciación, genética, biología molecular se estudian con técnicas que requieren que el DNA sea obtenido con menos de una ruptura por 10.000 nucleótidos.

Para aislar ácidos nucleicos en estado natural se requiere eliminar de manera muy cuidadosa las enzimas hidrolíticas, evitar la contaminación bacteriana y además emplear procedimientos o técnicas químicas y físicas poco agresivas, ya que las moléculas de DNA pueden sufrir ruptura por fuerzas mecánicas de fricción, como las que se generan durante la homogenización y la emulsificación.

La pureza del producto se puede determinar mediante medidas de viscosidad, dependendientes del tamaño de las moléculas, o por métodos analíticos o espectrofotométricos. Las buenas preparaciones, no degradadas, muestran viscosidades altas, constancia de la viscosidad durante el reposo y estabilidad de la viscosidad al calor.

El DNA y el RNA absorben eficientemente luz ultravioleta (UV), de tal manera que la absorbancia (Abs) al UV constituye un método preciso, rápido y no destructivo para determinar concentraciones tan bajas como 2,5 μg/mL. Las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos tienen un máximo de

absorción a 260 nm. Usando una celda de 1 cm de paso de luz, el coeficiente de extinción del DNA a esta longitud de onda es 20, para una solución de 1 mg/mL.

Con base en este coeficiente de extinción, la absorbancia a 260 nm, en una cubeta de cuarzo de 1 cm, de una solución de 50 μg/ml de DNA de doble hélice es igual a 1.

Las proteínas tienen máxima absorbancia a 280 nm, debido principalmente a los residuos de aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, la relación Abs 260 nm/Abs 280 nm es una medida de la pureza de la preparación de DNA y debe tener un valor de 1,65 a 1,85. Un valor más bajo sugiere contaminación con proteína.

Propiedades del DNA

Algunas veces el DNA que se ha obtenido de forma cuidadosa contiene moléculas tan largas que no pueden usarse las técnicas normales de viscosimetría y sedimentación para determinar su peso molecular. Se deben emplear concentraciones muy bajas de DNA y viscosímetros de bajo esfuerzo cortante especialmente diseñados. Sin embargo, la viscosimetría de rutina permite hacer un análisis cualitativo del índice y la velocidad de degradación del DNA.

La rotación óptica y el desplazamiento hipercrómico después de disociar la doble hélice son medidas cuantitativas útiles para determinar la fracción del DNA que está en forma de doble hélice.

Los ácidos nucleicos tienen conformaciones ordenadas, entre las que prevalecen las estructuras helicoidales. Ciertos tratamientos alteran la estructura ordenada del DNA. Para ello, el calentamiento es muy eficaz y su efecto puede evaluarse midiendo la radiación ultravioleta que absorbe la solución. El incremento en la absorbancia por la desnaturalización del DNA se conoce como efecto hipercrómico.

La absorción UV aumenta porque se altera la conformación, se debilitan las fuerzas estabilizadoras, las dos cadenas comienzan a separarse, las bases purínicas y pirimidínicas quedan expuestas y más accesibles a la radiación incidente. Cuando la desnaturalización termina ya no se registran aumentos de absorción. La desnaturalización térmica de los ácidos nucleicos se llama licuefacción y la gráfica de Abs 260 nm vs. temperatura se denomina curva de licuefacción. El punto medio de la curva es Tm.

Si el sistema se enfría con rapidez, las cadenas permanecen separadas y es posible aislarlas. Pero si la temperatura desciende con lentitud hasta unos

20-30 °C por debajo de Tm y luego se mantiene ahí por cierto tiempo, la mayoría de las cadenas separadas se reasocian para volver a formar la doble hélice original.

El DNA también puede desnaturalizarse a pH por encima de 11,3, dado que se produce un cambio de carga de diversos sustituyentes en las bases nitrogenadas, con lo que se elimina la posibilidad de que esos grupos formen puentes de hidrógeno. Como herramienta experimental, a menudo se prefiere la desnaturalización alcalina a la desnaturalización por calor, para evitar la ruptura de enlaces fosfodiéster, que puede ocurrir a elevadas temperaturas.

También es posible inducir desnaturalización a bajas fuerzas iónicas, por causa de la repulsión entre grupos fosfato situados en hebras opuestas y cargados negativamente. Las sustancias que debilitan o rompen los puentes de hidrógeno y solubilizan bases tienen potencial desnaturalizante. Por ejemplo, la urea en concentración 1 M produce 50% de desnaturalización; el etanol 1,2 M, el metanol 3,5 M, la formamida 1,9 M, la propionamida 0,62 M y la etilurea 0,6 M causan este mismo grado de desnaturalización de 50%.

En algunos instrumentos es posible mantener la alta temperatura a la que funde el DNA, pero también es posible separar las hebras elevando el pH, agregando solventes orgánicos o modificando químicamente las bases.

Aislamiento del DNA

Las principales etapas para extraer DNA son: ruptura de las células por choque osmótico, por digestión enzimática o un método mecánico suave, seguido por aislamiento del núcleo, las mitocondrias u otras estructuras subcelulares que contienen DNA. Posteriormente las proteínas se disocian del DNA por acción de un detergente aniónico y/o sales concentradas. Con frecuencia se agregan agentes quelantes que remueven los metales polivalentes. El pH se ajusta a valores medianamente alcalinos, en los cuales las proteínas tienen baja interacción electrostática con el DNA.

La proteína liberada puede extraerse con fenol o precipitarse por desnaturalización con cloroformo y alcohol isoamílico. Después de repetidas extracciones de la proteína, se agrega etanol o propanol para separar la fase acuosa. La sal hidrofílica del DNA precipita en fibras, que pueden enrollarse en una varilla de vidrio y sacarse de la solución. En este punto, la mayoría del RNA queda en solución. Si se repite el procedimiento, se remueven más RNA, polisacáridos y otras impurezas. El tratamiento con ribonucleasa o la sedimentación en un gradiente de densidad sobre CsCl o Cs_2SO_4 son formas especialmente efectivas de remover trazas de RNA.

Todas las etapas de purificación deben realizarse de manera que se minimice la hidrólisis por: DNAasa (para ello, remover pronto las proteínas, mantener fría la solución y trabajar rápidamente en las primeras etapas), por hidrólisis química (evitar un pH inferior a 2 y una temperatura superior a 90 °C) y por esfuerzo cortante hidrodinámico (evitar pipetear el DNA a través de orificios capilares y agitarlo). Adicionalmente, se debe prevenir la desnaturalización, o separación de las hebras del DNA, por: repulsión electrostática, que puede ser importante si el DNA se expone a sales de concentración menor de 0.01 M; por calentamiento a temperatura superior a 70 °C o por cambio en la forma iónica de las bases (a pH inferiores a 3 o superiores a 10).

Procedimiento experimental

Experimentos

Extracción del DNA

Enfríe previamente un mortero en la nevera. Pese 2,5 g de células de levadura y 5 g de arena lavada. Colóquelos en el mortero y muela vigorosamente por lo menos durante 5 min.

Pase el sólido a un erlenmeyer con tapa y agregue 15 mL de la solución salina de EDTA, agite y enseguida agregue 1 mL de SDS. Ponga en un termostato a 60 °C durante 10 min.

Enfríe a temperatura ambiente, agregue 2,5 mL de perclorato de sodio sobresaturado (6 M), mezcle y luego agregue 20 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y agite magnética o mecánicamente por 15 min, tapando el erlenmeyer y sin calentarlo. Retire la barra magnética del erlenmeyer y transfiera toda la mezcla a tubos de centrífuga. Equilíbrelos por peso y centrifugue la emulsión a baja velocidad, 1.000 a 5.000 rpm, por 15 min.

Retire con cuidado la capa acuosa superior amarilla con una pipeta Pasteur, evitando el precipitado copioso que queda en la interfase. Coloque la fase acuosa en un erlenmeyer y agregue lentamente 35 mL de etanol sobre la solución. Mezcle suavemente con una varilla de vidrio y centrifugue a 2.500 rpm por 5 min. Descarte el líquido.

Disuelva el DNA en 4 mL de agua que contiene 0,2 mL de buffer EDTA salino. Mida el volumen final.

Lea la absorbancia a 260 nm. Si queda por fuera del rango de lectura, prepare con una alícuota de 0,2 mL diluciones seriadas de ×10, ×100, ×1000, para leer la absorción.

Solución *stock* N° 1 de DNA: Prepare 70 mL de una solución del DNA extraído, en NaCl 0,15%, que tenga una absorbancia a 260 nm de 1,0±0,3. Mídale también la absorción a 280 nm. La solución *stock* se puede congelar para utilizarla en ensayos posteriores de rendimiento y propiedades del DNA.

Solución *stock* N° 2 de DNA: Prepare 10 mL de una solución del DNA extraído, en buffer borato 0,05 M, pH 8,5, que tenga una absorción a 260 nm de 3,2. Esta solución se usará únicamente en el experimento sobre el efecto del DMSO. Mida también la absorción a 280 nm.

Efecto del pH

Rotule 6 tubos y agregue en cada uno:

Tubo	B	1	2	3	4	5
Solución stock N° 1 de DNA (mL)	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Buffer borato 0,05 M (mL)	3,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
pH del buffer	8,5	8,5	9,5	10,5	11,5	12,5

Mida la absorbancia a 260 nm, empleando el tubo B como blanco para ajustar el 0 de absorbancia.

Efecto del calentamiento y el enfriamiento rápido

Prepare 11 tubos y agregue en cada uno solución *stock* N° 1 de DNA y buffer de borato 0,05 M, pH 8,5, en las cantidades que se indican en la tabla siguiente. Caliente los tubos a las temperaturas señaladas.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solución *stock* N° 1 de DNA (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Buffer borato 0,05 M pH 8,5 (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Calentamiento por 15 min (°C)	20	37	60	70	80	82	84	86	88	90	92

Inmediatamente se cumpla el tiempo de calentamiento, pase el tubo a un baño de agua-hielo. Dele vuelta al tubo para lograr un enfriamiento rápido, hasta que alcance la temperatura ambiente. Mida la absorción a 260 nm.

Como blanco para ajustar el 0 de absorbancia, prepare un tubo con 1,5 mL de buffer borato 0,05 M, pH 8,5 y 1,5 mL de NaCl 0,15%.

Efecto del calor y el formaldehído

Prepare 11 tubos que contengan solución *stock* N° 1 de DNA y buffer borato con formaldehído en las cantidades que se indican en la tabla siguiente. Caliente a las temperaturas señaladas y enfríe rápidamente. Lea la absorción a 260 nm.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solución *stock* N° 1 de DNA (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Buffer borato 0,05 M, pH 8,5 y formaldehído 2% (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Calentamiento por 15 min (°C)	20	37	60	70	80	82	84	86	88	90	92

Inmediatamente se cumpla el tiempo de calentamiento, pase el tubo a un baño hielo-agua para lograr un enfriamiento rápido, hasta que alcance la temperatura ambiente, y lea la absorción a 260 nm. Como blanco para ajustar el 0 de absorbancia, prepare un tubo con 1,5 mL de buffer con formaldehído 2% y 1,5 mL de NaCl 0,15%.

Efecto del calor y formaldehído en sal 1 M

Prepare 11 tubos que contengan:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solución *stock* N° 1 de DNA (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Buffer borato 0,05 M, pH 8,5, formaldehído 2% y NaCl 1 M (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Calentamiento por 15 min (°C)	20	37	60	70	80	82	84	86	88	90	92

Inmediatamente se cumpla el tiempo de calentamiento, pase el tubo a un baño de agua-hielo para lograr un enfriamiento rápido. Retírelo y deje que alcance la temperatura ambiente. Lea la absorción a 260 nm, empleando como blanco para ajustar el 100% T un tubo que contenga 2 mL de NaCl 0,15% y 2 mL de buffer con formaldehído 2% y NaCl 0,15%.

Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO)

Use la solución *stock* N° 2 de DNA (Abs 260 nm = 3,2) en buffer borato 0,05 M, pH 8,5. Diluya las muestras como se indica en la tabla siguiente, agregando de último el DMSO.

El DMSO de calidad espectroscópica presenta absorción significativa a 280 nm y por lo tanto se deben preparar blancos apropiados (tubos con números impares en la tabla) para cada muestra de DNA (tubos con números pares en la tabla). Lea la absorción a 280 nm contra el blanco apropiado.

Tubo	DMSO (%)	DNA (mL)	Buffer borato 0,05 M (mL)	Agua (mL)	DMSO (mL)
1	0	-	0,6	2,4	-
2	0	0,6	-	2,4	-
3	20	-	0.6	1,.8	0,6
4	20	0,6	-	1,8	0,.6
5	40	-	0,6	1,2	1,2

Tubo	DMSO (%)	DNA (mL)	Buffer borato 0,05 M (mL)	Agua (mL)	DMSO (mL)
6	40	0,6	-	1,2	1,2
7	50	-	0,6	0,9	1,5
8	50	0,6	-	0,9	1,5
9	60	-	0,6	0,6	1,8
10	60	0,6	-	0,6	1,8
11	70	-	0,6	0,3	2,1
12	70	0,6	-	0,3	2,1
13	80	-	0,6	-	2,4
14	80	0,6	-	-	2,4

Cálculos y resultados

Presente un informe de sus resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

Calcule la concentración de DNA:

$$\text{DNA (µg/mL)} = \text{Abs}_{260\,\text{nm}} \times \text{factor de dilución} \times \frac{50\ \text{µg DNA/mL}}{1\ \text{unidad Abs}_{260\,\text{nm}}}$$

Calcule la cantidad de DNA obtenido:

$$\text{µg DNA recuperado} = \text{DNA (µg/mL)} \times \text{volumen total (mL)}$$

Calcule la pureza del DNA:

$$\text{Pureza del DNA} = \text{Abs}_{260\,\text{nm}}/\text{Abs}_{280\,\text{nm}}$$

Haga las siguientes tablas:

- Tabla 3.1. Efecto del pH: absorbancia, pH
- Tabla 3.2. Efecto del calentamiento y el enfriamiento rápido: absorbancia, temperatura
- Tabla 3.3. Efecto del calor y el formaldehído: absorbancia, temperatura
- Tabla 3.4. Efecto del calor y el formaldehído en sal 1 M: absorbancia, temperatura
- Tabla 3.5. Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO): absorbancia, concentración de DMSO

Haga las gráficas de absorción vs. parámetro variado en cada experimento, todas en la misma hoja de papel para poder compararlas:

- Gráfica 3.1. Efecto del pH: Abs 260 nm vs. pH, ver tabla 3.1
- Gráfica 3.2. Efecto del calentamiento y el enfriamiento rápido: Abs 260 nm vs. temperatura, ver tabla 3.2
- Gráfica 3.3. Efecto del calor y formaldehído: Abs 260 nm vs. temperatura, ver tabla 3.3
- Gráfica 3.4. Efecto del calor y formaldehído en sal 1 M: Abs 260 nm vs. temperatura, ver tabla 3.4
- Gráfica 3.5. Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO): Abs 260 nm vs. % DMSO, ver tabla 3.5

Interprete sus resultados.

Cuestionario

1. Defina:
   a. Efecto hipercrómico
   b. Tm. Calcule Tm para el DNA
   c. Desnaturalización del DNA
   d. Renaturalización del DNA
2. ¿Cuál DNA tiene mayor Tm: el DNA de *Sarcina lutea* con GC=63% o el DNA de timo de ternero con GC=41%?
3. ¿Cuál es el propósito de las siguientes sustancias en el aislamiento del DNA: dodecilsulfato sódico (SDS, siglas en inglés), cloroformo, alcohol isoamílico, perclorato de sodio, EDTA?
4. ¿Cómo se prepara un DNA plasmídico?
5. ¿Cómo se puede purificar el DNA de un extracto de levadura?
6. ¿Cómo se pueden concentrar muestras de DNA?
7. ¿En qué se basa la técnica de microarreglos del DNA y qué utilidad tiene?

Referencias bibliográficas

Brown, T. 2010. *Gene cloning and DNA analysis. An introduction*. 6ª ed. Chapman Hall. pp. 15, 26, 226.

Campell, M.K. y S.O. Farrell. 2009. *Bioquímica*. 6ª ed. México: Cengage Learning. pp. 235-260.

Holm, C., D.W. Meeks-Wagner, W.L. Fangman *et al*. 1986. A rapid efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene* 42(2): 169-173.

Mathews, C.K., K.E. van Holde y K.G. Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Pearson, Addison Wesley. pp. 95-131.

Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H. Freeman and Co. pp. 306-338.

Polaina, J. y A.C. Adam. 1991. A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucleic acids research* 19(19): 5443. En: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc./articles/pmc328919/

Wilcockson, J. 1973. The use of sodium perchlorate in protein deproteinization during the preparation of nucleic acid. *Biochemical Journal* 135(3): 559-561.

Zeugin, J.A. y J.L. Hartley. 1985. Ethanol precipitation of DNA. *Focus* 7(4): 1-2. En: www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/focus.Par.56415.File.dat/Focus+Volume+7+Issue+4.PDF; consulta: febrero de 2013.

Zubay, G., W. Parson, y D. Vance. 1995. *Principles of biochemistry. Molecular genetics.* Vol. 3. Brown Publishers. pp. 124-129.

Materiales y reactivos

Materiales

Mortero pre-enfriado
Erlenmeyer con tapa
Arena lavada
Termostato
Centrífuga
Tubos para centrífuga
Espectrofotómetro UV

Reactivos

- Células de levadura
- Mezcla cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 v/v
- Etanol frío
- DMSO, calidad espectroscópica
- Solución salina de EDTA: Pese 3,72 g de EDTA, 0,4 g NaOH y ajuste el pH a 8,0. Agregue 1 g de NaCl. Complete con agua a 100 mL.
- SDS 25%: Pese 1 g, disuelva, complete a 4 mL con agua.
- Perclorato de potasio 6 M (sobresaturado): Pese 16,62 g de perclorato de K, disuelva y complete con agua a 20 mL.
- Buffer borato 0,05 M: Mida 6,25 mL de bórax saturado (4 M) y diluya con agua hasta 500 mL (pH 9,09). A partir de esta solución, prepare 20 mL de cada solución en el rango 9,5-12,5 agregando base para ajustar el pH. Ajuste el resto de la solución a pH 8,5.
- Buffer borato 0,05 M, pH 8,5, con formaldehído 2%
- Buffer borato 0,05 M, pH 8,5, con formaldehído 2% y NaCl 1 M
- NaCl 0,15%: Pese 150 mg de NaCl y complete con agua a 100 mL.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 3 Extracción de DNA y estudio de algunas propiedades

Objetivos

Fundamento teórico

Estructura del DNA

Extracción del DNA

Tablas de datos y resultados

Extracción del DNA

Peso de levadura _____

Volumen del extracto inicial de DNA _____

Absorbancia	Extracto inicial	Dilución		
		×10	×100	×1000
260 nm				
280 nm				

Concentración del DNA

Concentración =

% rendimiento =

Pureza =

Propiedades del DNA

Tabla 3.1 Efecto del pH

Anexar gráfica 3.1

Tubo	B	1	2	3	4	5
pH						
Abs 260 nm						

Tabla 3.2 Efecto del calentamiento y el enfriamiento rápido
Anexar gráfica 3.2

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura (°C)											
Abs 260 nm											

Tabla 3.3 Efecto del calor y el formaldehído
Anexar gráfica 3.3

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura (°C)											
Abs 260 nm											

Tabla 3.4 Efecto del calor, el formaldehído y el cloruro de sodio
Anexar gráfica 3.4

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura (°C)											
Abs 260 nm											

Tabla 3.5 Efecto del DMSO
Anexar gráfica 3.5

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
DMSO (%)	0	20	40	50	60	70	80
Abs 280 nm							

Discusión de resultados y conclusiones

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 4
Estudio cinético de las fosfatasas

Objetivos

Aprender los procedimientos básicos en enzimología, el diseño experimental y el análisis de datos para el estudio cinético de las enzimas.

La práctica comprende las siguientes actividades:

- Obtención de un extracto crudo, bien sea de fosfatasa alcalina (práctica 4A), a partir del intestino delgado de rata, o de fosfatasa ácida (práctica 4B), a partir de germen de trigo
- Determinación de la actividad enzimática, midiendo la cantidad de fósforo liberado a partir de β-glicerofosfato de sodio empleado como sustrato
- Determinación del tiempo óptimo de reacción, o de incubación, y medición de la velocidad inicial
- Determinación del efecto de la temperatura, el pH, la concentración de enzima y la concentración de sustrato en la velocidad de reacción
- Determinación del efecto de un inhibidor en la velocidad de reacción
- Determinación de los principales parámetros cinéticos, bien sea para la fosfatasa alcalina o para la fosfatasa ácida.

Fundamento teórico

Generalidades

Las fosfatasas ácidas (EC.3.1.3.2) y las fosfatasas alcalinas (EC. 3.1.3.1) son un grupo de enzimas de amplia distribución en la naturaleza. Su especificidad también es amplia, aunque se presentan algunas diferencias según el origen de las enzimas.

Todas actúan sobre monoésteres de ácido ortofosfórico, tanto alifáticos como aromáticos, por ejemplo, glicerol-1-fosfato y glicerol-2-fosfato, y aromáticos, como el 4-fenilfosfato. No actúan sobre diésteres o triésteres de fosfato.

La fosfatasa alcalina purificada de diversas fuentes también puede hidrolizar fosfocreatina, fosfato inorgánico y polifosfatos, como el ATP. Recibe el

nombre sistemático de monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa y la reacción general que cataliza se representa así:

$$\text{monoéster ortofosfórico} + H_2O \longrightarrow \text{alcohol} + \text{ortofosfato}$$

Las fosfatasas son específicas para el fosfato de la molécula, de manera que la ruptura ocurre cerca del átomo de fósforo:

$$C - O - \underset{\uparrow}{P}$$

En el caso de la fosfatasa alcalina de mamíferos y bacterias se ha demostrado que un residuo de serina se fosforila. La secuencia de aminoácidos alrededor de la serina fosforilada es: treonina, ácido aspártico, serina, alanina. La enzima tiene unidos iones Zn^{++}, que son esenciales para la actividad. La actividad se puede abolir y restablecer por la remoción y adición de iones Zn^{++}, respectivamente.

De los 33 residuos de serina que contiene la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*, sólo uno en particular reacciona con el fosfato, y la serina-fosfato parece estar en el sitio activo de la enzima.

Por otra parte, se ha propuesto que el residuo de serina hace un ataque sobre el átomo de fósforo, el que se vuelve más deficiente en electrones por el Zn^{++} ligado a la enzima, acomplejado por las cargas negativas del grupo fosfato. El mecanismo de la reacción no se ha aclarado del todo y se cree que inicialmente ocurre lo que muestra la figura 4.1.

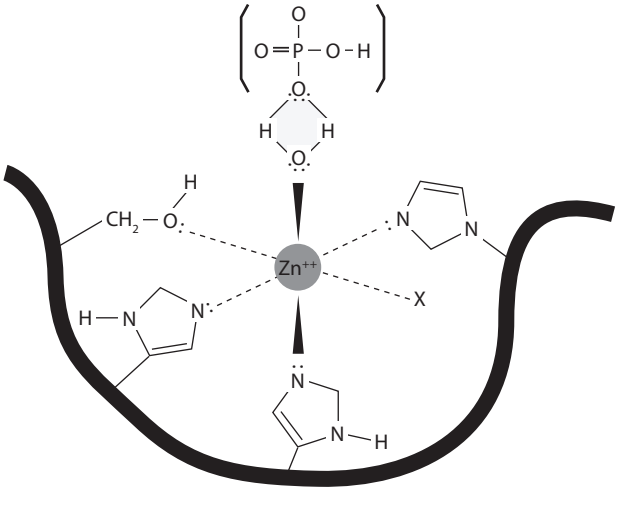


Figura 4.1 Esquema del posible mecanismo de reacción de la fosfatasa alcalina.

Tres residuos de histidina se ligan al metal. Un residuo activo de serina está coordinado con el metal y hay un puente de agua entre el fosfato y el metal. Entonces, de acuerdo con el modelo, el metal sirve como templete, en el cual la serina, el fosfato y el agua se ligan en una proximidad adecuada para permitir la hidrólisis del fosfato y su transferencia a la serina. El Zn^{++} incrementa la acidez de los protones del agua, permitiendo la protonación del fosfato y la posterior ruptura del enlace fosfoéster. El agua puede cumplir dos funciones: donar un protón al fosfato e hidrolizar la fosfoserina en la etapa final de la reacción.

Las fosfatasas alcalinas de los humanos conforman una familia de glicoproteínas de membrana que hidrolizan una variedad de ésteres monofosfato, a pH alto. Se presentan en isoformas y en diferentes niveles en varios tejidos, como hígado, hueso, riñón, placenta y mucosa intestinal.

La determinación de fosfatasa alcalina en suero es de interés en el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares, en enfermedades óseas asociadas con un incremento en la actividad de los osteoblastos, así como de pulmones, intestino, próstata y riñones.

La fosfatasa alcalina intestinal de adulto y la fetal humanas se han purificado por cromatografía de inmunoafinidad con un anticuerpo monoclonal. Su peso molecular se estimó en 170.000 y 140.000 Da, respectivamente. Ambas enzimas constan de dos subunidades.

La fosfatasa alcalina de *E. coli* pesa 80.000 Da y consta de dos subunidades de 40.000 Da cada una. La enzima de *bacterium Bacillus licheniformis* pesa 121.000 Da y consta de 4 subunidades de 26.000 Da. La enzima de hígado de buey y de leche de vaca pesan 190.000 Da y no tienen subunidades.

En ratas la mayor actividad de fosfatasa alcalina se encuentra en los riñones. La enzima también está presente en hígado, bazo, músculo esquelético, páncreas, cerebro, sangre y mucosa intestinal.

Los datos cinéticos disponibles para la fosfatasa alcalina son difíciles de comparar, ya que los valores de V_m y K_m son función de la pureza de la enzima, de la concentración en la mezcla de reacción, del tipo de buffer empleado, del pH de la mezcla de reacción y de la naturaleza y concentración del metal activador. Además, el pH óptimo obtenido con una enzima en particular es función del tipo de sustrato usado.

La fosfatasa alcalina es inhibida por el ortofosfato, así como por la L-fenilalanina, el L-triptófano y la L-cisteína.

En biología molecular, la fosfatasa alcalina se usa comúnmente para remover el fosfato 5'terminal de los ácidos nucleicos (DNA o RNA). El 5'OH libre puede ser fosforilado con polinucleótido kinasa y ATP^{32} para producir ácidos nucleicos marcados radioactivamente en el extremo. También se usa la fosfatasa alcalina para remover los grupos 5'fosfato de los fragmentos de DNA o de los vectores, para prevenir la recircularización durante experimentos de clonación.

A diferencia de la enzima obtenida de fuentes bacterianas, la de intestino de ternero se puede inactivar por calentamiento: a 85 °C por 15 min, la inactivación es completa para concentraciones de fosfatasa alcalina de 0,1 unidades o menos. Esta propiedad permite que la siguiente etapa en una serie de manipulaciones se pueda realizar inmediatamente, sin requerir una extracción con fenol para remover la fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina de leche es una glicoproteína, con masa molecular de 187 kDa y pI en el rango de 5,4-6,0. Los procedimientos de pasteurización inactivan esta enzima, por lo que la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en leche se ha vuelto una práctica común para propósitos regulatorios y de control de calidad, ya que si la enzima está activa indica una pasteurización inadecuada.

En cuanto a las fosfatasas ácidas, se trata de enzimas hidrolíticas de localización lisosómica, pertenecientes al grupo de las fosfomonoestearasas. Las distintas isoenzimas se diferencian entre sí por su pH óptimo, peso molecular y requerimientos de activadores e inhibidores.

Estas fosfatasas ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores, como el germen de trigo, y son responsables de la mineralización del fósforo orgánico del suelo y de la liberación de fósforo inorgánico, necesario para plantas y microorganismos.

La fosfatasa ácida está presente en grandes cantidades en el tejido prostático de humanos adultos y en mucha menor concentración en huesos, hígado, riñones, estómago, plaquetas y eritrocitos. Los niveles de fosfatasa ácida en suero se incrementan significativamente, en valores hasta 30 veces superiores al normal, en presencia de carcinoma de próstata que haya hecho metástasis; en caso contrario los valores se encuentran sólo ligeramente elevados, por lo que la determinación en suero tiene un gran valor diagnóstico en los casos de cáncer de próstata. También se encuentran actividades elevadas de la enzima en: algunas enfermedades hematológicas, como leucemia mielocítica; enfermedades óseas, como carcinomas; enfermedades hepáticas, como hepatitis e ictericia, y en varios tipos de cáncer.

La enzima prostática es fuertemente inhibida por los iones tartrato. Esta característica es útil para diferenciar entre la actividad total de las fosfatasas ácidas y la de la isoenzima de la próstata.

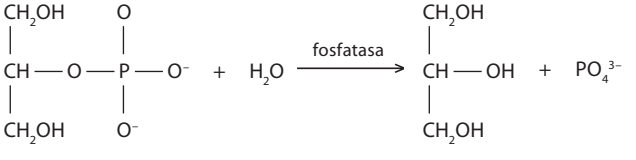
Actividad enzimática

Las enzimas son generalmente moléculas proteicas que tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas. Por su naturaleza proteica son inestables y pueden ser desnaturalizadas por cambios en el medio. Como la desnaturalización altera las propiedades biológicas de las proteínas, la actividad de las enzimas se afecta por muchas variables, como temperatura, pH, concentración de sustrato y de enzima y la presencia de inhibidores. Las condiciones óptimas varían de una enzima a otra. Cuando se trabaja con enzimas es necesario mantener el pH y la temperatura adecuados, lo que se logra mediante el empleo de buffer y de termostatos.

Hay dos formas generales de seguir el curso de una reacción enzimática:

1. Medir la cantidad de sustrato que "desaparece"
2. Determinar la cantidad de producto formado.

Entonces, el primer requerimiento para estudiar una enzima es disponer de un método cuantitativo conveniente para medir su actividad. Para las fosfatasas alcalina o ácida, objeto de esta práctica, la determinación de la actividad se fundamenta en la cuantificación del fosfato liberado por la enzima, a través del método de Fiske-Subbarow:



PO_4^{3-} + ácido molíbdico ⟶ ácido fosfomolíbdico

ácido fosfomolíbdico + ácido ascórbico ⟶ óxidos de molibdeno (color azul)

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μmol de β-glicerofosfato de sodio por minuto a 37 °C y pH 9,6.

La velocidad inicial de una reacción enzimática depende de los siguientes factores:

- Concentración de sustrato: Para una cantidad fija de enzima, la velocidad de reacción aumenta cuando se incrementa la concentración

de sustrato, hasta alcanzar un valor límite cuando la velocidad ya no aumenta más. En esta condición, la enzima se encuentra saturada con el sustrato y se ha llegado a la velocidad máxima.

- Concentración de enzima: En presencia de un exceso de sustrato, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de enzima. Algunas enzimas son inhibidas por los productos de la reacción.
- pH: La concentración de protones en el medio influye en la actividad de las enzimas, pues se afectan los grupos ionizables en la enzima y en el sustrato (si los hay). Por lo general las enzimas son activas en un rango limitado de pH. El valor que permite lograr la mayor velocidad se conoce como pH óptimo. Se debe tener en cuenta que este valor puede variar con la temperatura, el buffer usado y la presencia de activadores o de inhibidores.
- Temperatura: Las reacciones enzimáticas se afectan por el calor, como se afecta en general cualquier reacción química. Es decir, un aumento en la temperatura se refleja en un aumento en la velocidad de reacción. No obstante, la naturaleza proteica de las enzimas hace que ellas sufran desnaturalización a altas temperaturas, lo que conlleva una pérdida de la actividad y por lo tanto una disminución en la velocidad de reacción. La temperatura óptima es la resultante de estos dos efectos y es la que permite lograr la máxima velocidad. La temperatura óptima puede variar con el tiempo de reacción. Si la incubación es de unos pocos segundos, la temperatura óptima puede ser tan alta como 60 o 70 °C.
- Productos de la reacción: La acumulación de productos retarda la actividad de algunas enzimas. Esto puede deberse a la combinación del producto con el sitio activo de la enzima, impidiéndole combinarse con el sustrato, o a que se promueve la reacción inversa con una disminución en la velocidad global de reacción.

Medida de la velocidad de reacción

Las curvas de progreso de la mayoría de las reacciones enzimáticas muestran una caída de la velocidad con el tiempo, lo que se explica por alguna de las siguientes razones: los productos de la reacción pueden inhibir la enzima; el grado de saturación de la enzima con el sustrato disminuye a medida que la reacción transcurre, porque disminuye la concentración de sustrato; la reacción inversa puede volverse más importante a medida que la concentración de productos aumenta; la enzima (o la coenzima) puede sufrir alguna inactivación por efecto de la temperatura o del pH de reacción, por inestabilidad. Varias de estas causas pueden operar a un mismo tiempo.

Por estas razones, en el estudio de la actividad enzimática se emplean medidas de velocidad inicial, ya que sólo al inicio de la reacción, cuando las causas antes mencionadas no han tenido tiempo de operar, se conocen con exactitud las condiciones.

Para obtener la velocidad inicial sólo es necesario determinar la primera parte de la curva de progreso de la reacción y dibujar la tangente en el origen. En general las curvas son prácticamente líneas rectas siempre que la cantidad de cambio no exceda el 20% del total. La cantidad de sustrato transformado en un período de tiempo desde el comienzo de la reacción es una medida de la velocidad sólo si este límite no se sobrepasa.

A continuación se ilustra el significado de velocidad inicial, en contraste con velocidad expresada como "cantidad de cambio en un cierto tiempo".

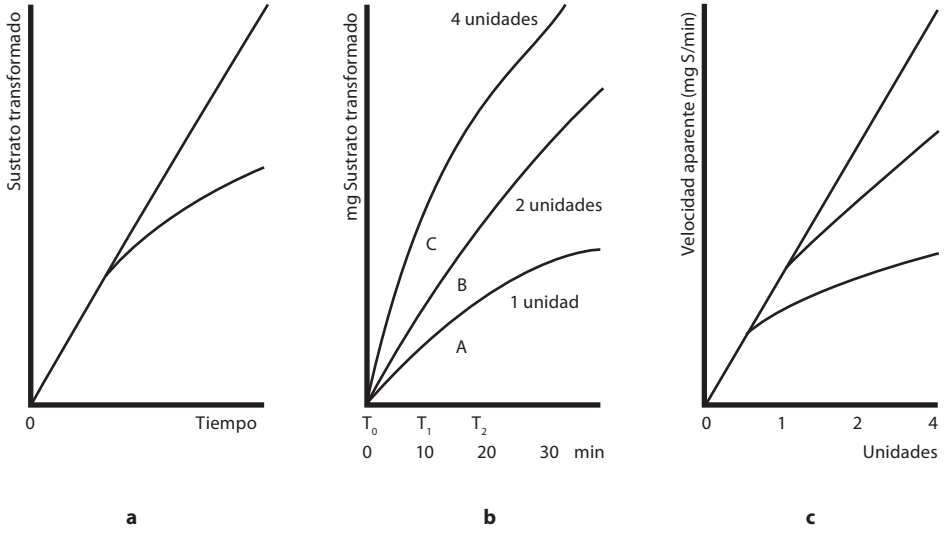


Figura 4.2 Curvas de progreso de la reacción enzimática: a) curva de progreso típica; b) curva de progreso con tres cantidades diferentes de enzima y c) velocidad aparente derivada de la figura b, a tres tiempos diferentes, graficada contra cantidad de enzima.

La curva de progreso en la figura 4.2b puede representar experimentos a tres pH diferentes o con tres sustratos diferentes o con cantidades diferentes de enzima o de coenzima.

Por simplicidad, se supone que representan curvas obtenidas con diferentes cantidades de enzima y que las curvas A, B, y C fueron obtenidas con 1, 2 y 4 unidades de enzima, respectivamente. Si las velocidades iniciales en el tiempo 0 (T_0) se grafican contra la cantidad de enzima, como en la figura 4.2c, se obtiene una línea recta que muestra que la velocidad es proporcional a la cantidad de enzima. Sin embargo, la cantidad de sustrato transformado al tiempo T_2 está lejos de ser proporcional a la cantidad de enzima, y las velocidades aparentes obtenidas de dividir estos valores por el tiempo T_2 dan un resultado falso, como se muestra en la figura 4.2c.

Aislamiento de las enzimas

Las enzimas se encuentran en la naturaleza en mezclas complejas, por lo general en las células, que contienen cientos de enzimas diferentes. Para estudiar adecuadamente las propiedades y el comportamiento de una enzima, ésta debe estar pura. Sin embargo, en algunos casos, con el uso de técnicas muy específicas, es posible estudiar una enzima aunque esté impura.

Escogido el método para medir la actividad, es importante investigar cuáles son las fuentes más abundantes de la enzima, a menos que haya razones para utilizar una fuente específica. Como se indicó antes, para la fosfatasa alcalina la cantidad varía en los diversos tejidos.

Seleccionado el material de partida, es necesario obtener la enzima en solución. Para este propósito es usual romper la membrana celular o la pared celular, si se trata de tejidos vegetales o microorganismos, lo que se puede lograr por: métodos químicos, con detergentes o solventes; enzimáticos, con lisozima; físicos, con ultrasonido, o mecánicos, con homogenizador o por molienda con arena. El extracto se puede preparar con agua, solución salina o con un buffer. El extracto crudo contiene la enzima y numerosas sustancias de alto y bajo peso molecular. Las moléculas pequeñas se pueden remover por diálisis o por filtración por gel, dejando en solución las moléculas grandes, que son en su mayoría proteínas, aunque también pueden estar presentes algunos polisacáridos.

Los procesos de purificación consisten en una serie de fraccionamientos, por los cuales la enzima se separa de las otras proteínas presentes. La purificación se fundamenta en las diferencias en solubilidad, tamaño, carga y actividad biológica de las proteínas.

En esta práctica se trabajará bien sea con extractos crudos de las fosfatasas alcalina o ácida. El tema de la purificación de proteínas es objeto de otra práctica de laboratorio.

La actividad de las enzimas se expresa en unidades de actividad, definidas como los micromoles de sustrato transformados por minuto en las condiciones del ensayo.

En los procesos de purificación es usual emplear como referencia la actividad específica, que se define como unidades de actividad por miligramo de proteína. A medida que aumenta la pureza de la enzima, debe aumentar la actividad específica.

A. Fosfatasa alcalina

Procedimiento experimental

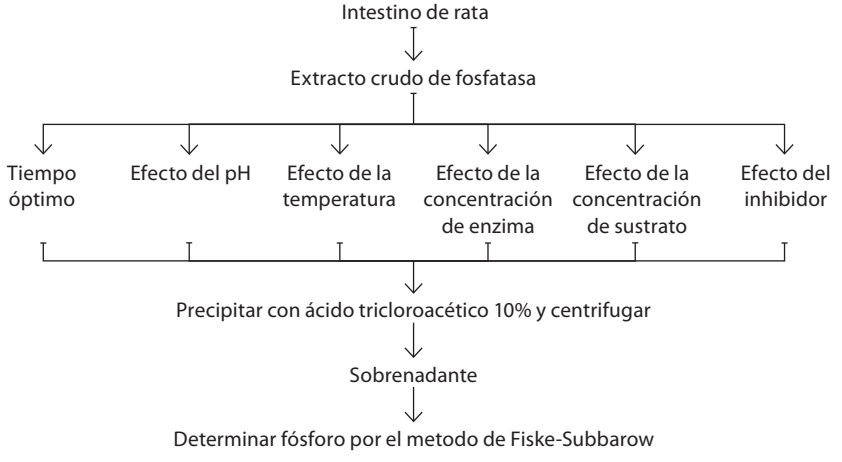


Figura 4.3 Esquema del procedimiento.

Experimentos

1. Extracción de la fosfatasa alcalina

Retire el intestino delgado de la rata y lávelo con agua corriente, insertando una pipeta entre el tubo de caucho de la llave y el intestino. Deje correr el agua, presionando suavemente el tejido hasta que salga limpia. Coloque el intestino sobre una placa de vidrio y con ayuda de una espátula o cuchillo raspe la mucosa, hasta que las paredes del tejido se vean transparentes. Ponga la mucosa extraída en un mortero, adicione 5 mL de agua y una porción pequeña de arena lavada; macere durante 3 min y luego adicione 5 mL de glicerol y 15 mL de agua. Mezcle bien y centrifugue a 2.500×g durante 30 s. El sobrenadante debe tener apariencia turbia y constituye el extracto crudo de fosfatasa alcalina que se utilizará en la práctica. Manténgalo sobre hielo.

Alternativamente, el extracto se puede obtener rompiendo las células por ultrasonido. Para ello, la mucosa separada del intestino se mezcla con 20 mL de agua y 2 mL de glicerol y se somete a ultrasonido, 6 pulsos de 15 s, a 200 W. Luego se procede a centrifugar, igual que en el procedimiento anterior. En la experimentación con enzimas es necesario utilizar blancos que sirvan de control. Por lo general se usan un blanco de buffer (BB), un blanco de enzima (BE) y un blanco de sustrato (BS). Todos los blancos de enzima se

deben trabajar con una muestra del extracto crudo que se ha dializado para retirar el fosfato que está presente en todo tipo de células. Pida este extracto dializado al profesor.

2. Método de Fiske-Subbarow

Este es un método colorimétrico basado en la reacción del fósforo con ácido molíbdico para dar ácido fosfomolíbdico. Luego, este ácido reacciona con un reductor en medio ácido (ácido ascórbico), formando una mezcla de óxidos de molibdeno, de color azul. Ver la reacción en el fundamento teórico.

Curva de calibración de fósforo inorgánico

En 6 tubos de ensayo ponga los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5
Patrón de fósforo 0,04 mg/mL (mL)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Agua (mL)	4,0	3,9	3,8	3,7	3,6	3,5
Ácido molíbdico (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Agite bien y deje en reposo durante 3 min. Agregue:

Ácido ascórbico (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Agite las soluciones en todos los tubos, deje en reposo durante 10 min para que se desarrolle el color. Determine la absorbancia a 660 nm en el colorímetro, ajustando el 0 de absorbancia con el tubo B.

3. Efecto de la concentración de la enzima en la velocidad de reacción

Sustrato: Solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Buffer: Solución buffer de bórax 0,1 M, pH 9,6
Temperatura: 37 °C
Tiempo de reacción: 10 min
Enzima: Extracto enzimático crudo

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Buffer (mL)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Sustrato (mL)	-	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agua (mL)	0,8	0,4	0,4	0,35	0,30	0,20	0,10	-

Coloque los tubos en un baño termostatado a 37 °C durante 3 min y agregue a intervalos de 30 s:

Enzima (mL)	-	-	0,4	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, duplique los volúmenes de enzima. Consulte con el profesor.

Mezcle bien y deje en el baño termostatado 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ácido tricloroacético (ATA) 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g durante 5 min.

Reserve el sobrenadante de todos los tubos para el siguiente paso, la determinación de la concentración de fósforo inorgánico, y el tubo BB para ajustar con él el 0 de absorbancia.

4. Determinación de la cantidad de fósforo producido por acción de la fosfatasa alcalina

En todos los casos la mezcla de reacción se prepara como se indica a continuación, agregando los reactivos en el orden indicado:

Sobrenadante de la reacción enzimática (mL)	1,0
Agua destilada (mL)	1,0
Ácido molíbdico (mL)	0,5

Agite bien y deje en reposo 3 min. Agregue:

Ácido ascórbico (mL)	0,5

Mezcle bien, deje en reposo 10 min y lea la absorbancia a 660 nm.

Los valores de absorbancia se interpolan en la curva de calibración para determinar la cantidad de fósforo.

5. Curva de progreso para la reacción de la fosfatasa alcalina y determinación del tiempo óptimo de incubación

Los extractos enzimáticos tienen actividades variables, algunos pueden resultar muy activos, mientras que otros pueden tener baja actividad. Además, las enzimas, en extractos crudos o purificadas, pueden perder actividad durante el almacenamiento.

Por lo tanto, es necesario determinar cuál es el tiempo de reacción conveniente para obtener una cantidad de fósforo tal que se obtengan por colorimetría valores de absorbancia entre 0,100 y 0,700 y además, que correspondan a la parte recta de la curva de progreso de la reacción (figura 4.2a).

Sustrato: Solución de β-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Buffer: Solución buffer de bórax 0,1 M

Enzima: Extracto enzimático crudo
Tiempo de reacción: variable
Temperatura: 37 °C

Prepare las siguientes mezclas de reacción:

Tubo	BB	BS	BE	1 (2 min)	2 (5 min)	3 (10 min)	4 (15 min)	5 (25 min)
Buffer bórax 0,1 M pH 9,6 (mL)	1,2	1,2	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
β-glicerofosfato de sodio 0,1 M (mL)	0,4	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agua (mL)	0,4	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Coloque los tubos en un termostato por 3 min, a 37 °C y agregue:

Extracto enzimático (mL)	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Agite bien e incube a 37 °C durante:

Tiempo de reacción (min)	25	25	25	2	5	10	15	25

Agite bien, y mantenga los tubos a 37 °C durante el tiempo indicado en el rótulo. Controle los tiempos rigurosamente con un cronómetro. Cumplido cada tiempo, retire el tubo respectivo y adicione 2 mL de ATA 10% y mezcle para suspender la reacción.

Centrifugue los 8 tubos a 2.500×g durante 5 min y determine en el sobrenadante la cantidad de fósforo producido, utilizando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

De acuerdo con los resultados, se debe decidir cuál será el tiempo de incubación (tiempo de reacción en minutos) que se empleará en el resto de la práctica.

Nota: Para no extender demasiado la práctica y alcanzar a realizar todos los experimentos, en lo posible se debe trabajar con un tiempo de 10 min, tiempo que debe estar en la parte lineal de la curva de progreso.

6. Efecto del pH. Determinación del pH óptimo

Sustrato: Solución de β-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Buffer: Soluciones buffer de bórax 0,1 M con diferentes pH
Enzima: Extracto enzimático crudo
Tiempo de reacción: 10 min

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6
Sustrato (mL)	-	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Buffer (mL)	2,0	1,6	1,8	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
pH del buffer	9,6	9,6	9,6	8,4	8,8	9,2	9,6	10,0	10,4

Coloque los tubos en el termostato a 37 °C durante 3 min y enseguida, a intervalos de 30 s, agregue:

Enzima (mL)	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, aumente la cantidad de enzima, Consulte con el profesor.

Mezcle el contenido de cada tubo e incube en el termostato a 37 °C durante 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ATA 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g durante 5 min.

El precipitado obtenido se descarta, y en el sobrenadante de todos los tubos se determina la concentración de fósforo inorgánico, empleando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

7. Efecto de la temperatura
Determinación de la temperatura óptima

Buffer: Solución buffer de bórax 0,1 M, pH 9,6
Sustrato: Solución de β-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Enzima: Extracto enzimático crudo
Tiempo de reacción: 10 min
Temperatura: La incubación se hace a diferentes temperaturas: 0 °C, agua-hielo; 18 °C, temperatura ambiente; 37 °C, con termostato; 60 °C, con termostato; 92 °C, agua en ebullición

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Buffer (mL)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Sustrato (mL)	-	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agua (mL)	0,6	0,2	0,4	-	-	-	-	-
Temperatura (°C)	37	37	37	0	18	37	60	92

Agite, coloque los tubos en los baños de agua a las temperaturas indicadas, durante 3 min. A intervalos de 30 s agregue:

Enzima (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, aumente la cantidad de enzima. Consulte con el profesor.

Agite y deje en incubación durante 10 min exactos. Al final adicione a todos los tubos 2 mL de ATA 10% y centrifugue a 2.500×g durante 5 min. Determine en el sobrenadante la cantidad de fósforo producida, utilizando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

8. Efecto de la concentración de sustrato Determinación de la constante de Michaelis (K_m)

Buffer: Solución buffer de bórax 0.1 M, pH óptimo definido en el numeral 6
Temperatura: Temperatura óptima definida en el numeral 7
Sustrato (S): Soluciones de β-glicerofosfato de sodio de diversas concentraciones en el rango 43-300 mM
Tiempo de reacción: 10 min
Enzima: Extracto enzimático crudo

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
Buffer (mL)	1,4	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Sustrato (mL)	-	0,8	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Concentración de S (mM)	-	300	-	43	50	60	75	100	150	300
Agua (mL)	0,6	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-

Coloque los tubos en el termostato a 37 °C durante 3 min. A intervalos de 30 s agregue:

Enzima (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, aumente la cantidad de enzima. Consulte con el profesor.

Incube durante 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ATA 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g durante 5 min.

El precipitado obtenido se descarta y en el sobrenadante de todos los tubos se determina la concentración de fósforo, utilizando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

9. Efecto de la presencia de un inhibidor en la velocidad de reacción

Buffer: Solución buffer de bórax 0,1 M, pH óptimo definido en el numeral 6
Temperatura: Temperatura óptima definida en el numeral 7
Tiempo de reacción: 10 min
Sustrato (S): Soluciones de β-glicerofosfato de sodio de diversas concentraciones en el rango 43-300 mM
Inhibidor: EDTA 2,5 mM
Enzima: Extracto enzimático crudo

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
Buffer (mL)	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Sustrato (mL)	-	0,8	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Concentración de S (mM)	-	300	-	43	50	60	75	100	150	300
Agua (mL)	1,0	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
Inhibidor (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Coloque los tubos en el termostato a 37 °C durante 3 min. A intervalos de 30 s agregue:

Enzima (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, aumente la cantidad de enzima. Consulte con el profesor.

Incube durante 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ATA 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g por 5 min. Determine en el sobrenadante la cantidad de fósforo producida, utilizando el tubo BB para ajustar 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

Cálculos y resultados

Presente un informe de sus resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

Calcule la absorbancia corregida, descontando para cada tubo lo correspondiente a los blancos (BS, blanco de sustrato, y BE, blanco de enzima). Cuando sea necesario se debe aplicar la ley de Beer, para descontar la parte proporcional de los blancos correspondiente a cada tubo (numerales 5, 8 y 9).

La absorbancia corregida se interpola en la curva de calibración de fósforo, con el fin de obtener la concentración en cada tubo. Se deben tener en cuenta las diluciones realizadas, para calcular la cantidad de fosfato generado en la mezcla de reacción.

La velocidad de reacción se determina como la cantidad de fósforo liberado por acción de la enzima en 1 mL de la mezcla de reacción en 1 min, es decir, se calcula el cociente de la concentración de fósforo en el tubo inicial y el tiempo de incubación.

Haga las siguientes tablas:

- Tabla 4.1A. Curva de calibración de fósforo: absorbancia, volumen de la solución patrón de fósforo, concentración de fósforo (mM de P).
- Tabla 4.2A. Determinación del tiempo de incubación: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), tiempo de incubación.
- Tabla 4.3A. Efecto del pH: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), pH.
- Tabla 4.4A. Efecto de la temperatura: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), temperatura.
- Tabla 4.5A. Efecto de la concentración de enzima: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), volumen de extracto enzimático.
- Tabla 4.6A. Efecto de la concentración de sustrato: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), inverso de la velocidad de reacción (1/v), concentración de sustrato en el tubo de reacción (mM), inverso de la concentración de sustrato (1/S).
- Tabla 4.7A. Efecto de la presencia de un inhibidor: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), inverso de la velocidad de reacción (1/v), concentración de sustrato en el tubo de reacción (mM), inverso de la concentración de sustrato (1/S).
- Tabla 4.8A. Resumen de los resultados de la práctica: pH óptimo, temperatura óptima, actividad del extracto enzimático (la pendiente de la gráfica 4.5A), tiempo óptimo, constante de Michaelis (K_m), velocidad máxima, velocidad máxima en presencia del inhibidor, constante de inhibición, tipo de inhibición.

Haga las siguientes gráficas:

- Gráfica 4.1A. Curva de calibración de fósforo: absorbancia vs. concentración de P (mM P), ver tabla 4.1A.
- Gráfica 4.2A. Determinación del tiempo óptimo: concentración de P (mM P) vs. tiempo (min), ver tabla 4.2A.
- Gráfica 4.3A. Efecto del pH en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) vs. pH, ver tabla 4.3A.
- Gráfica 4.4A. Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) vs. temperatura (°C), ver tabla 4.4A.
- Gráfica 4.5A. Efecto de la concentración de enzima en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) vs. volumen de extracto enzimático (mL), ver tabla 4.5A.
- Gráfica 4.6A. Efecto de la concentración de sustrato y de la presencia de un inhibidor en la velocidad de reacción: velocidad de reacción

(mM P/min) con y sin inhibidor vs. concentración de sustrato (mM), ver tablas 4.6A y 4.7A.

- Gráfica 4.7A. Gráfica de Lineweaver-Burk: 1/v vs. 1/S, ver tablas 4.6A y 4.7A.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las críticas que se hacen al método de Lineweaver-Burk propuesto en 1934?
2. ¿En qué consiste el método propuesto por Eisenthal y Cornish-Bowden?
3. ¿Mediante qué código se identifica la fosfatasa alcalina y qué indica cada número de su identificación?
4. ¿Qué parámetros pueden afectar la efectividad de una columna de inmunoafinidad? Explique.
5. ¿Por qué no es aconsejable el análisis en orina de la fosfatasa alcalina y de otras enzimas para la diagnosis genitourinaria?
6. En enfermedades pancreáticas y óseas ¿cómo se afectan los niveles de fosfatasa alcalina?
7. ¿Cómo se puede purificar la fosfatasa alcalina de la leche?
8. ¿Qué son anticuerpos policlonales y cómo se producen anticuerpos contra fosfatasa alcalina de leche? ¿Qué utilidad tienen?
9. ¿Con qué objeto se emplea fosfatasa alcalina en los métodos de ingeniería genética?

Referencias bibliográficas

Brenda. The comprehensive enzyme information system. http://www.brenda-enzymes.org/; consulta: enero de 2013.

Enzyme structures database. http:/www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes/; consulta: enero de 2013.

ExPASy. Enzyme nomenclature database. http:/www.expasy.org/enzyme/; consulta: enero de 2013.

Gonzalez, M.T., F. Posada, N.M. Riaño *et al.* 1994. Efecto de inhibidores de proteinasas sobre la actividad tripsina y quimotripsina de *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Cenicafé* 45(2): 51-59.

Holtz, K.M. 2000. Alternate modes of binding in two cristal structures of alkaline phosphatase inhibidor complex. *Protein Science* 9(5): 907-915.

Kaneko, J.J., J.W. Harvey y M.L. Bruss. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ª ed. Academic Press. pp. 241-284.

Lineweaver, H. y Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society* 56: 658-666.

Mathews, C.K., K.E van Holde y K.G. Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Pearson Addison Wesley. pp. 527-528.
Moss, D.W. 1992. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clinical Chemistry* 38(12): 2846-2892.
Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H Freeman and Co. pp. 191-232.
Stec, B. 2000. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *Journal of Molecular Biology* 299(5): 1303-1311.
Ranaldi, F., P. Vanni y E. Giachetti. 1999. What students must know about the determination of enzyme kinetic parameters. *Biochemical Education* 27: 87-91.
Vega-Warner, C., C-H. Wang, D.M. Smith *et al.* 1996. Milk alkaline phosphatase purification and production of polyclonal antibodies. *Journal of Food Science* 64: 601-605.
Vockley, J. y H. Harry. 1984. Purification of human adult and fetal intestinal alkaline phosphatases by monoclonal antibody immunoaffinity chromatography. *Biochemical Journal* 217: 535-541.

Materiales y reactivos

Materiales

Equipo de disección
Mortero
Arena lavada
Centrífuga
Baño de hielo
Vórtex
pHmetro
Termostato
Colorímetro
Pipetas y micropipetas
Tubos de ensayo
Vasos de precipitado
Gradillas
Cronómetro

Reactivos

- Intestino delgado de rata
- Glicerol

- Solución *stock* de fosfato: 0,2 mg P/mL. Pese 87,9 mg de KH_2PO_4 (RA), disuelva en 75 mL de agua, agregue 1 mL de solución de ácido sulfúrico 10 N y complete el volumen a 100 mL con agua.
- Solución patrón de fósforo de 0,04 mg P/mL (recién preparada): Diluya 2 mL de la solución *stock* hasta 10 mL con agua.
- Solución de ácido molíbdico: agregue 84 mL de H_2SO_4 concentrado (RA, libre de fosfatos y silicatos) sobre 300 mL de agua, agite y enfríe. Aparte disuelva 25 g de molibdato de amonio en agua. Luego mezcle las dos soluciones y complete hasta 1 L con agua. Verifique que los reactivos estén libres de fosfatos. Para cada práctica se requieren 35 mL de solución.
- Solución de ácido ascórbico 1,5 mg/mL (recién preparada): Prepare 50 mL.
- Solución de ácido tricloroacético (ATA) 10%
- Solución de EDTA (sal sódica) 10 mM: Esta solución se debe diluir a 2,5 mM. (PM 320,3 g)
- Solución de bórax saturado 0,4 M aproximadamente.
- Soluciones buffer de bórax 0,1 M y diversos pH: Controle y ajuste el pH de las soluciones.

pH	Bórax saturado	HCl 1N (mL)	NaOH 1N (mL)	Agua (mL)
8,4	12,5	1,0	-	36,50
8,8	12,5	0,5	-	37,00
9,2	12,5	-	-	37,50
9,6	12,5	-	0,75	36,75
10,0	12,5	-	1,50	36,00
10,4	12,5	-	2,25	35,25

- Solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,1 M (recién preparada): Prepare 25 mL (PM 216).
- Solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,3 M (recién preparada): Prepare 25 mL.
- Soluciones de ß-glicerofosfato de sodio, de diversas concentraciones: Prepárelas a partir de la solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,3 M.

Concentraciónde ß-glicerofosfato de Na (mM)	ß-glicerofosfatode Na 0,3 M (mL)	Agua (mL)
43	0,86	5,14
50	1,00	5,00
60	1,20	4,80
75	1,50	4,50
100	2,00	4,00
150	3,00	3,00
300	6,00	-

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 4A
Estudio cinético de la fosfatasa alcalina

Objetivos

Fundamento teórico y reacciones

Fosfatasa alcalina

Determinación de fósforo

Tablas de datos y resultados

Tabla 4.1A. Curva de calibración de fósforo

Anexar gráfica 4.1A (Abs 660 nm vs. concentración de P)

Concentración del patrón _____ mM P Masa molar del P = 31

Tubo	B	1	2	3	4	5
Volumen de patrón (mL)						
Concentración de P (mM)						
Abs 660 nm						

Muestra de cálculos:

Tabla 4.2A. Determinación del tiempo óptimo de incubación

Anexar gráfica 4.2A ([P] vs. tiempo)

Tiempo (min)	2	5	10	15	25
Abs 660 nm corregida					
[P] (mM)					

Velocidad inicial (pendiente en el origen) _____

Tiempo óptimo de reacción _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.3A. Efecto del pH

Anexar gráfica 4.3A (velocidad vs. pH)

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6
pH									
Abs 660 nm corregida									
[P] (mM)									
Velocidad (mM/min)									

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia.

pH óptimo _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.4A. Efecto de la temperatura

Anexar gráfica 4.4A (velocidad vs. temperatura)

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Temperatura (°C)								
Abs 660 nm corregida								
[P] (mM)								
Velocidad (mM/min)								

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia.

Temperatura óptima _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.5A. Efecto de la concentración de la enzima

Anexar gráfica 4.5A (velocidad vs. volumen de enzima)

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Volumen de enzima (mL)	-	-	0,4	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
Abs 660 nm corregida								
[P] mM								
Velocidad (mM/min)								

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia. Para BE la corrección es proporcional.

Actividad del extracto enzimático (pendiente de la gráfica) _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.6A. Efecto de la concentración de sustrato [S]

Anexar gráfica 4.6A (velocidad vs. concentración de S) y gráfica 4.7A (1/v vs. 1/[S])

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
[S] (mM)										
Abs 660 nm corregida										
[P] (mM)										
Velocidad (mM/min)										
1/[S]										
1/v										

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia. Para BS la corrección es proporcional.

K_m _____ V_m _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.7A. Efecto de la presencia de un inhibidor

Anexar gráfica 4.6A (velocidad vs. concentración de S) y gráfica 4.7A (1/v vs. 1/[S])**

Inhibidor _____ Concentración del inhibidor _____

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
[S] (mM)										
Abs 660 nm corregida										
[P] (mM)										
Velocidad (mM/min)										
1/[S]										
1/v										

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia. Para BS la corrección es proporcional.

**Estas gráficas se realizan en la misma hoja que las gráficas sin inhibidor

K_m _____ V_m _____

Muestra de cálculos:

Discusión de resultados y conclusiones

Tabla 4.8A. Resumen de resultados

Resultado	Valor obtenido	Valor citado en la literatura*
Tiempo óptimo		
pH óptimo		
Temperatura óptima		
Actividad del extracto		
K_m		
V_m		
Tipo de inhibición		

*Referencias bibliográficas:

Respuestas al cuestionario

B. Fosfatasa ácida

Procedimiento experimental

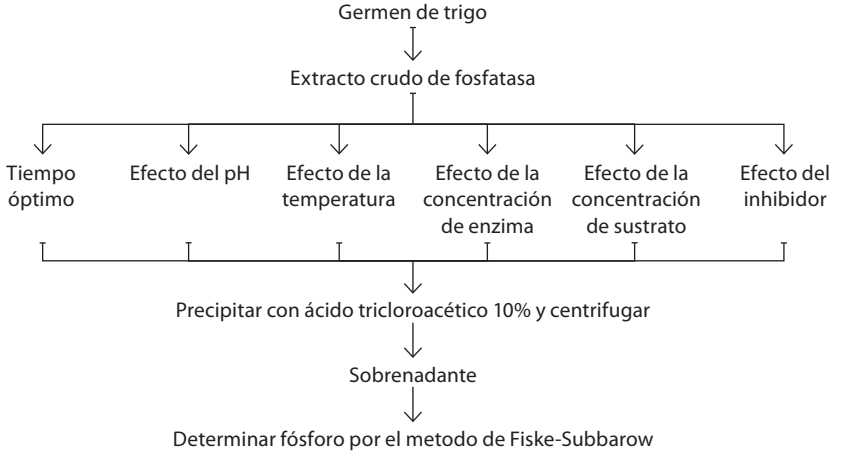


Figura 4.4 Esquema del procedimiento.

Experimentos

1. Extracción de la fosfatasa ácida

Pese 10 g de germen de trigo y agregue 50 mL de agua fría. Agite la mezcla hasta obtener una suspensión uniforme. Deje en reposo 30 min. Decante por 15 min y filtre el sobrenadante a través de algodón, para retirar la grasa. Descarte los residuos.

La solución constituye el extracto crudo de la fosfatasa ácida. Manténgalo sobre hielo.

En la experimentación con enzimas es necesario utilizar blancos que sirvan de control. Por lo general se usan un blanco de buffer (BB), un blanco de enzima (BE) y un blanco de sustrato (BS). Todos los blancos de enzima se deben trabajar con una muestra del extracto crudo que se ha dializado para retirar el fosfato que está presente en todo tipo de células. Pida este extracto dializado al profesor.

2. Método de Fiske-Subbarow

Este es un método colorimétrico basado en la reacción del fósforo con ácido molíbdico, para dar ácido fosfomolíbdico. Luego, este ácido reacciona

con un reductor en medio ácido (ácido ascórbico), formando una mezcla de óxidos de molibdeno, de color azul. Vea la reacción en el fundamento teórico.

Curva de calibración de fósforo inorgánico

En 6 tubos de ensayo mida los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5
Patrón de fósforo 0,04 mg/mL (mL)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Agua (mL)	4,0	3,9	3,8	3,7	3,6	3,5
Ácido molíbdico (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Agite bien y deje en reposo durante 3 min. Agregue:

Ácido ascórbico (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Agite las soluciones en todos los tubos, deje en reposo durante 10 min para que se desarrolle el color. Determine la absorbancia en el colorímetro a 660 nm, ajustando el 0 de absorbancia con el tubo B.

3. Efecto de la concentración de la enzima en la velocidad de reacción

Sustrato: Solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Buffer: Solución buffer citrato 0,1 M, pH 5,3
Temperatura: ? k `gc1rc
Tiempo de reacción: 10 min
Enzima: Extracto enzimático crudo

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Buffer (mL)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Sustrato (mL)	-	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agua (mL)	0,8	0,4	0,4	0,35	0,30	0,25	0,10	-

Mezcle bien los tubos y agregue a intervalos de 30 s:

Enzima (µL)	-	-	400	50	100	200	300	400

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, duplique los volúmenes de enzima. Consulte con el profesor.

Mezcle bien y deje a temperatura ambiente 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ácido tricloroacético (ATA) 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g durante 5 min.

Reserve el sobrenadante de todos los tubos para el siguiente paso, la determinación de la concentración de fósforo inorgánico, y el tubo BB, para ajustar con él el 0 de absorbancia.

4. Determinación de la cantidad de fósforo producido por acción de la fosfatasa ácida

En todos los casos la mezcla de reacción se prepara como se muestra a continuación, agregando los reactivos en el orden indicado:

Sobrenadante de la reacción enzimática (mL)	1,0
Agua destilada (mL)	1,0
Ácido molíbdico (mL)	0,5

Agitar bien y dejar en reposo 3 min. Añada:

Ácido ascórbico (mL)	0,5

Mezcle bien, deje en reposo 10 min y lea la absorbancia a 660 nm.

Los valores de absorbancia se interpolan en la curva de calibración para determinar la cantidad de fósforo.

5. Curva de progreso para la reacción de la fosfatasa ácida y determinación del tiempo óptimo de incubación

Los extractos enzimáticos tienen actividades variables, algunos pueden resultar muy activos, mientras que otros pueden tener baja actividad. Además, las enzimas, en extractos crudos o purificadas, pueden perder actividad durante el almacenamiento.

Por lo tanto, es necesario determinar cuál es el tiempo de reacción conveniente para obtener una cantidad de fósforo tal que se obtengan por colorimetría valores de absorbancia entre 0,2 y 0,7 y además, que correspondan a la parte recta de la curva de progreso de la reacción (figura 4.2a).

Sustrato: Solución de β-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Buffer: Solución buffer citrato 0,1 M, pH 5,3
Enzima: Extracto enzimático crudo
Tiempo de reacción: variable
Temperatura: ambiente

Prepare las siguientes mezclas de reacción:

Tubo	BB	BS	BE	1 (2 min)	2 (5 min)	3 (10 min)	4 (15 min)	5 (25 min)
Buffer citrato 0,1 M pH 5,3 (mL)	1,2	1,2	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
β-glicerofosfato de sodio 0,1 M (mL)	0,4	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agua (mL)	0,4	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Mezcle bien los tubos y agrégueles:

Extracto enzimático (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Agite bien e incube a temperatura ambiente durante:

Tiempo de reacción (min)	25	25	25	2	5	10	15	25

Agite bien y mantenga los tubos a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en el rótulo. Controle los tiempos rigurosamente con un cronómetro. Cumplido cada tiempo, retire el tubo respectivo y adicione 2 mL de ATA 10% y mezcle para suspender la reacción.

Centrifugue los 8 tubos a 2.500×g durante 5 min y determine en el sobrenadante la cantidad de fósforo producido, utilizando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

De acuerdo con los resultados, se debe decidir cuál será el tiempo de incubación (tiempo de reacción en minutos) que se empleará en el resto de la práctica.

Nota: Para no extender demasiado la práctica y alcanzar a realizar todos los experimentos, en lo posible se debe trabajar con un tiempo de 10 min, como tiempo óptimo de reacción.

6. Efecto del pH. Determinación del pH óptimo

Sustrato: Solución de β-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Buffer: Soluciones buffer citrato 0,1 M, con diferentes pH
Enzima: Extracto enzimático crudo
Tiempo de reacción: 10 min

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6
Sustrato (mL)	-	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Buffer (mL)	2,0	1,6	1,8	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
pH del buffer	5,3	5,3	5,3	3,0	4,0	5,0	5,3	5,6	6,2

Mezcle y enseguida, a intervalos de 30 s, agregue:

Enzima (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Nota: Si la actividad del extracto enzimático es baja, aumente la cantidad de enzima, Consulte con el profesor.

Mezcle el contenido de cada tubo y deje incubando incubando a temperatura ambiente durante 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ATA 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g durante 5 min.

El precipitado obtenido se descarta, y en el sobrenadante de todos los tubos se determina la concentración de fósforo inorgánico, empleando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

7. Efecto de la temperatura
Determinación de la temperatura óptima

Buffer: Solución buffer citrato 0,1 M, pH 5,3
Sustrato: Solución de β-glicerofosfato de sodio 0,1 M
Enzima: Extracto enzimático crudo
Tiempo de reacción: 10 min
Temperatura: La incubación se hace a diferentes temperaturas: 0 °C, agua-hielo 18 °C, temperatura ambiente; 37 °C, con termostato; 60 °C, con termostato; 92 °C, agua en ebullición

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Buffer (mL)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Sustrato (mL)	-	0,4	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agua (mL)	0,6	0,2	0,4	-	-	-	-	-
Temperatura (°C)	18	18	18	0	18	37	60	92

Agite, coloque los tubos en los baños de agua a las temperaturas indicadas, durante 3 min. A intervalos de 30 s agregue:

Enzima (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Agite y deje en incubación durante 10 min exactos. Al final adicione a todos los tubos 2 mL de ATA 10% y centrifugue a 2.500×g durante 5 min. Determine en el sobrenadante la cantidad de fósforo producida, utilizando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

8. Efecto de la concentración de sustrato
Determinación de la constante de Michaelis (K_m)

Buffer: Solución buffer citrato 0,1 M, pH 5,3
Temperatura: Ambiente

Sustrato (S): Soluciones de β-glicerofosfato de sodio de diversas concentraciones en el rango 43-300 mM
Tiempo de reacción: 10 min
Enzima: Extracto enzimático crudo

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
Buffer (mL)	1,4	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Sustrato (mL)	-	0,8	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Concentración de S (mM)	-	300	-	43	50	60	75	100	150	300
Agua (mL)	0,6	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-

Mezcle bien los tubos y enseguida agregue a intervalos de 30 s:

Enzima (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Incube a temperatura ambiente durante 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ATA 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g durante 5 min.

En el sobrenadante de todos los tubos se determina la concentración de fósforo, utilizando el tubo BB para ajustar el 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

9. Efecto de la presencia de un inhibidor en la velocidad de reacción

Buffer: Solución buffer citrato 0,1 M, pH 5,3
Temperatura: Ambiente
Tiempo de reacción: 10 min
Sustrato (S): Soluciones de β-glicerofosfato de sodio de diversas concentraciones en el rango 43-300 mM
Inhibidor: $HgCl_2$ 5 mg/mL
Enzima: Extracto enzimático crudo

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
Buffer (mL)	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Sustrato (mL)	-	0,8	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Concentración de S (mM)	-	300	-	43	50	60	75	100	150	300
Agua (mL)	1,0	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
Inhibidor (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Mezcle bien los tubos y enseguida agregue a intervalos de 30 s:

Enzima (mL)	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Deje reaccionar a temperatura ambiente durante 10 min exactos. Al final de este período adicione a cada tubo 2 mL de ATA 10%, mezcle y centrifugue a 2.500×g por 5 min. Determine en el sobrenadante la cantidad de fósforo producida, utilizando el tubo BB para ajustar 0 de absorbancia, como se indica atrás en el experimento 4.

Cálculos y resultados

Presente un informe de sus resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

Calcule la absorbancia corregida, descontando para cada tubo lo correspondiente a los blancos (BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima). Cuando sea necesario se debe aplicar la ley de Beer, para descontar la parte proporcional de los blancos correspondiente a cada tubo (numerales 3, 8 y 9).

La absorbancia corregida se interpola en la curva de calibración de fósforo, con el fin de obtener la concentración en cada tubo. Se deben tener en cuenta las diluciones realizadas, para calcular la cantidad de fosfato generado en la mezcla de reacción.

La velocidad de reacción se determina como la cantidad de fósforo liberado por acción de la enzima en 1 mL de la mezcla de reacción en 1 min, es decir, se calcula el cociente de la concentración de fósforo en el tubo inicial y el tiempo de incubación.

Haga las siguientes tablas:

- Tabla 4.1B. Curva de calibración de fósforo: absorbancia, volumen de la solución patrón de fósforo, concentración de fósforo (mM de P).
- Tabla 4.2B. Determinación del tiempo de incubación: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), tiempo de incubación.
- Tabla 4.3B. Efecto del pH: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), pH.
- Tabla 4.4B. Efecto de la temperatura: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), temperatura.
- Tabla 4.5B. Efecto de la concentración de enzima: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), volumen de extracto enzimático.
- Tabla 4.6B. Efecto de la concentración de sustrato: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), inverso de la velocidad de reacción (1/v), con-

centración de sustrato en el tubo de reacción (mM), inverso de la concentración de sustrato (1/S).

- Tabla 4.7B. Efecto de la presencia de un inhibidor: absorbancia corregida, concentración de fósforo interpolada (mM P), velocidad de reacción (mM P/min), inverso de la velocidad de reacción (1/v), concentración de sustrato en el tubo de reacción (mM), inverso de la concentración de sustrato (1/S).
- Tabla 4.8B. Resumen de los resultados de la práctica: pH óptimo, temperatura óptima, actividad del extracto enzimático (la pendiente de la gráfica 4.5B), tiempo de incubación, constante de Michaelis (K_m), velocidad máxima, velocidad máxima en presencia del inhibidor, constante de inhibición, tipo de inhibición.

Haga las siguientes gráficas:

- Gráfica 4.1B. Curva de calibración de fósforo: absorbancia vs. concentración de P (mM P), ver tabla 4.1B.
- Gráfica 4.2B. Determinación del tiempo óptimo de incubación: concentración de P (mM P) vs. tiempo (min), ver tabla 4.2B.
- Gráfica 4.3B. Efecto del pH en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) vs. pH, ver tabla 4.3B.
- Gráfica 4.4B. Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) vs. temperatura (°C), ver tabla 4.4B.
- Gráfica 4.5B. Efecto de la concentración de enzima en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) vs. volumen de extracto enzimático (mL), ver tabla 4.5B.
- Gráfica 4.6B. Efecto de la concentración de sustrato y de la presencia de un inhibidor en la velocidad de reacción: velocidad de reacción (mM P/min) con y sin inhibidor vs. concentración de sustrato (mM), ver tablas 4.6B y 4.7B.
- Gráfica 4.7B. Gráfica de Lineweaver-Burk: 1/v vs. 1/S, ver tablas 4.6B y 4.7B.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las críticas que se hacen al método de Lineweaver-Burk propuesto en 1934?
2. ¿En qué consiste el método propuesto por Eisenthal y Cornish-Bowden?
3. ¿Mediante qué código se identifica la fosfatasa ácida y qué indica cada número de su identificación?
4. ¿Cómo podría purificar la fosfatasa ácida del germen de trigo?
5. ¿Cómo se define la unidad de actividad?
6. ¿En qué condiciones se logra la mejor extracción de la fosfatasa ácida de levadura?

7. Para la fosfatasa ácida de levadura, ¿en qué condiciones se logra la máxima estabilidad en soluciones de etanol?
8. ¿Cuál es la constante de sedimentación de la enzima de levadura purificada?
9. ¿Cuáles son las características de estabilidad térmica de la fosfatasa ácida de levadura y las características de inactivación por agitación?
10. ¿Qué utilidad tiene el análisis de los niveles de fosfatasa ácida en sangre en relación con el cáncer de próstata y cómo se diferencia de las otras isoenzimas presentes en la sangre?

Referencias bibliográficas

Barman, T.E. 1985. *Enzyme handbook*. 2ª imp. Nueva York: Springer-Verlag.

Brenda. The Comprehensive Enzyme Information System. http://www.brenda-enzymes.org/; consulta: enero de 2013.

Coodley, E.L. (ed.). 1970. *Diagnostic enzymology*. Filadelfia: Lea & Febiger.

Enzyme structures database. http:/www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes/; consulta: enero de 2013.

ExPASy. Enzyme nomenclature database. http:/www.expasy.org/enzyme/; consulta: enero de 2013.

Guija, E., M. Soberón y H. Haak-Mares. 2007. Mecanismos de acción de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular. *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima)* 68(4): 356-362.

Lineweaver, H. y D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society* 56: 658-666.

Mathews, C.K., K.E van Holde y K.G. Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Pearson Addison Wesley. pp. 527-528.

Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H. Freeman and Co. pp. 191-232.

Safadi, A., E. Livne y A. Reznick. 1997. Characterization of alkaline and acid phosphatases from skeletal muscle of young and old rats. *Archives of gerontology and geriatrics* 24: 183-196.

Soberón, M., H. Haak y E. Guija. 1995. Influencia del pH sobre la hidrólisis de fosfomonoésteres catalizada por la fosfatasa ácida de hígado de porcino. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* 61(1): 13-19.

Tsuboi, K.K., G. Wierner y P.B. Hudson. 1957. Acid phosphatase. VII: Yeast phosphomonoesterase: isolation procedure and stability characteristics. *The Journal of Biological Chemistry* 224: 621-635.

Materiales y reactivos

Materiales

Vasos de precipitado
Pipetas y micropipetas
Baño de hielo
Centrífuga
Tubos de ensayo
Gradillas
Vórtex
pHmetro
Colorímetro
Cronómetro

Reactivos

- Germen de trigo
- Solución *stock* de fosfato: 0,2 mg P/mL. Pese 87,9 mg de KH_2PO_4 (RA), disuelva en 75 mL de agua, agregue 1 mL de solución de ácido sulfúrico 10 N y complete el volumen a 100 mL con agua.
- Solución patrón de fósforo de 0,04 mg P/mL (recién preparada): Diluya 2 mL de la solución *stock* hasta 10 mL con agua.
- Solución de ácido molíbdico: Agregue 84 mL de H_2SO_4 concentrado (RA, libre de fosfatos y silicatos) sobre 300 mL de agua, agite y enfríe. Aparte disuelva 25 g de molibdato de amonio en agua. Luego mezcle las dos soluciones y complete hasta 1 L con agua. Verifique que los reactivos estén libres de fosfatos.
- Solución de ácido ascórbico 1,5 mg/mL (recién preparada): Prepare 50 mL.
- Solución de ácido tricloroacético (ATA) 10%
- Solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,1 M (recién preparada): PM 216. Prepare 25 mL: pese 0,54 g y disuélvalos en agua. Complete a 25 mL en balón aforado.
- Solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,3 M (recién preparada): Prepare 25 mL.
- Soluciones de ß-glicerofosfato de sodio de diversas concentraciones: Prepárelas a partir de la solución de ß-glicerofosfato de sodio 0,3 M.

Concentración de ß-glicerofosfato de Na (mM)	ß-glicerofosfato de Na 0,3 M (mL)	Agua (mL)
43	0,86	5,14
50	1,00	5,00
60	1,20	4,80
75	1,50	4,50
100	2,00	4,00
150	3,00	3,00
300	6,00	-

- Solución de ácido cítrico 0,1 M: PM 192. Prepare 250 mL: pese 4,80 g, disuélvalos en agua y complete a 250 mL en balón aforado.
- Buffer citrato 0,1 M de distintos pH: La solución de ácido cítrico 0,1 M tiene un pH inicial de 2,25. A partir de esta solución, mida en vasos de precipitados volúmenes de 20 mL y ajústeles el pH a 3; 4; 5; 5,6 y 6,2 con adición de NaOH. A los 150 mL restantes, ajústeles de la misma manera el pH a 5,3.
- Solución de inhibidor $HgCl_2$ 20 mM: PM, 270,6. Prepare 5 mL: pese 25 mg y disuélvalos en 5 mL de agua.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 4B
Estudio cinético de la fosfatasa ácida

Objetivos

Fundamento teórico y reacciones

Fosfatasa ácida

Determinación de fósforo

Tablas de datos y resultados

Tabla 4.1B. Curva de calibración de fósforo

Anexar gráfica 4.1B (Abs 660 nm vs. concentración de P)

Concentración del patrón _____ mM P Masa molar del P = 31

Tubo	B	1	2	3	4	5
Volumen de patrón (mL)						
Concentración (mM)						
Abs 660 nm						

Muestra de cálculos:

Tabla 4.2B. Determinación del tiempo óptimo de incubación

Anexar gráfica 4.2B ([P] vs. tiempo)

Tiempo (min)	2	5	10	15	25
Abs 660 nm corregida					
[P] (mM)					

Velocidad inicial (pendiente en el origen) _____

Tiempo óptimo de reacción _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.3B. Efecto del pH

Anexar gráfica 4.3B (velocidad vs. pH)

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6
pH									
Abs 660 nm corregida									
[P] (mM)									
Velocidad (mM/min)									

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia.

pH óptimo _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.4B. Efecto de la temperatura

Anexar gráfica 4.4B (velocidad vs. temperatura)

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Temperatura (°C)								
Abs 660 nm corregida								
[P] (mM)								
Velocidad (mM/min)								

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia.

Temperatura óptima _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.5B. Efecto de la concentración de la enzima

Anexar gráfica 4.5B (velocidad vs. volumen de enzima)

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5
Volumen de enzima (mL)	-	-	0,4	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
Abs 660 nm corregida								
[P] mM								
Velocidad (mM/min)								

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia. Para BE la corrección es proporcional.

Actividad del extracto enzimático (pendiente de la gráfica) _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.6B. Efecto de la concentración de sustrato [S]

Anexar gráfica 4.6B (velocidad vs. concentración de S) y gráfica 4.7B (1/v vs. 1/[S])

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
[S] (mM)										
Abs 660 nm corregida										
[P] (mM)										
Velocidad (mM/min)										
1/[S]										
1/v										

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia. Para BS la corrección es proporcional.

K_m _____ V_m _____

Muestra de cálculos:

Tabla 4.7B. Efecto de la presencia de un inhibidor

Anexar gráfica 4.6B (v vs.[S]) y gráfica 4.7B (1/v vs. 1/[S]) *

Inhibidor _____ Concentración del inhibidor _____

Tiempo de reacción _____

Tubo	BB	BS	BE	1	2	3	4	5	6	7
[S] (mM)										
Abs 660 nm corregida										
[P] (mM)										
Velocidad (mM/min)										
1/[S]										
1/v										

BB, blanco de buffer (Abs=0); BS, blanco de sustrato y BE, blanco de enzima: sus valores se deben restar para corregir los valores de absorbancia. Para BS la corrección es proporcional.

*Estas gráficas se realizan en la misma hoja que las gráficas sin inhibidor

K_m _____ V_m _____

Muestra de cálculos:

Discusión de resultados y conclusiones

Tabla 4.8B. Resumen de resultados

Resultado	Valor obtenido	Valor citado en la literatura*
Tiempo óptimo o de incubación		
pH óptimo		
Temperatura óptima		
Actividad del extracto		
K_m		
V_m		
Tipo de inhibición		

*Referencias bibliográficas:

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 5
Inhibidores de tripsina

Objetivos

Comprobar la presencia de inhibidores de tripsina en harina de semillas de leguminosas, estudiar su efecto en la actividad de la tripsina y evaluar la estabilidad térmica de los inhibidores.

La práctica comprende la realización de las siguientes actividades:

- Extracción de la fracción de albúminas y globulinas, a partir de harinas de distintas leguminosas
- Determinación de la presencia de inhibidores de tripsina en los extractos
- Estudio cinético de la tripsina, en ausencia y en presencia de un inhibidor
- Estudio del efecto del calor sobre la actividad de los inhibidores de tripsina.

Fundamento teórico

En forma general, un inhibidor se puede definir como una sustancia que reduce la actividad enzimática. De esta amplia definición se excluye la pérdida de actividad por desnaturalización por pH extremos, calor y solventes orgánicos.

En plantas como balú, soya, haba, fríjol, garbanzo, papa, entre otras, se encuentran sustancias capaces de inhibir la actividad de enzimas proteolíticas. Estos inhibidores disminuyen el valor nutricional de las proteínas de origen vegetal y causan hipertrofia del páncreas en ratas y en pollos. Ocurre una pérdida excesiva de proteína endógena y, ya que ésta contiene cantidades grandes de enzimas pancreáticas ricas en cistina, el efecto resultante es una pérdida neta de azufre.

El contenido proteico de las leguminosas está en el rango de 18-32%, significativamente más alto que el encontrado en tubérculos y cereales. Por la importancia de las leguminosas en la alimentación humana y animal, los inhibidores de proteínas han sido objeto de numerosas investigaciones.

El inhibidor más estudiado ha sido el extraído de la soya. Aproximadamente 6% de la proteína total de soya actúa como inhibidor. Se ha encontrado que

la inhibición en presencia de sustratos naturales es de tipo no competitivo y además que existe una relación lineal entre el grado de inhibición y la concentración del inhibidor. Sin embargo, a concentraciones altas de inhibidor se llega a un valor de saturación, después del cual la inhibición de la tripsina no aumenta en forma lineal sino que tiende a un valor casi constante.

Los inhibidores de tripsina de las leguminosas son proteínas de bajo peso molecular, en el rango de 3.000-25.000 Da. Son cadenas simples o asociadas de unos pocos monómeros que se pueden disociar en los procesos de purificación. Los inhibidores de tripsina son diversos en número y especificidad: algunos pueden inhibir otras enzimas, como la quimotripsina y la papaína, y para inhibir enzimas proteolíticas diferentes muestran sitios de actividad distintos. En general presentan contenidos altos de cistina (≈20%) y abundantes enlaces disulfuro, lo que les confiere gran resistencia a la desnaturalización y a la digestión proteolítica.

Muchos de los efectos antinutricionales de las leguminosas pueden ser eliminados total o parcialmente por métodos apropiados de calentamiento, acompañados de suplementos de la dieta con aminoácidos azufrados.

Tripsina

Es una enzima proteolítica producida en el páncreas como zimógeno (tripsinógeno) y vertida en el intestino delgado como constituyente del jugo pancreático. Su activación se realiza en el duodeno, por acción de la enteropeptidasa, una enzima proteolítica especializada secretada por las células del intestino. El tripsinógeno está constituido por 249 aminoácidos y su secuencia está bien establecida.

La tripsina es una endopeptidasa, cuya función consiste en hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos, atacando el grupo carbonilo de lisina y arginina. Su máxima actividad ocurre a pH entre 7 y 8.

La tripsina es estable a pH 3, pero a pH mayores de 5 sufre una autólisis fuerte. La presencia de iones de calcio le confiere estabilidad y reduce la autólisis. Es estable a temperatura inferior a 40 °C, mientras que temperaturas mayores de 50 °C la desnaturalizan.

La actividad de la tripsina puede seguirse empleando un sustrato artificial, como el BAPNA (clorhidrato de N_{α}-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida), que al hidrolizarse produce N-benzoil-DL-arginina y p-nitroanilina. Esta última es una sustancia coloreada y por lo tanto es posible detectarla espectrofotométricamente. La absorbancia a 410 nm es una medida cuantitativa de la actividad de la tripsina.

Una unidad de tripsina es la cantidad de enzima que produce por hidrólisis un color equivalente a un μmol de para-nitroanilina por minuto. De manera arbitraria, una unidad de tripsina (UT) se define como un incremento, con respecto al blanco, de 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de la mezcla de reacción, en las condiciones del ensayo (ver Kakade *et al.*, 1969).

La actividad de los inhibidores de tripsina se define como el número de unidades de tripsina inhibidas (UTI) y se puede expresar en porcentaje de inhibición.

Procedimiento experimental

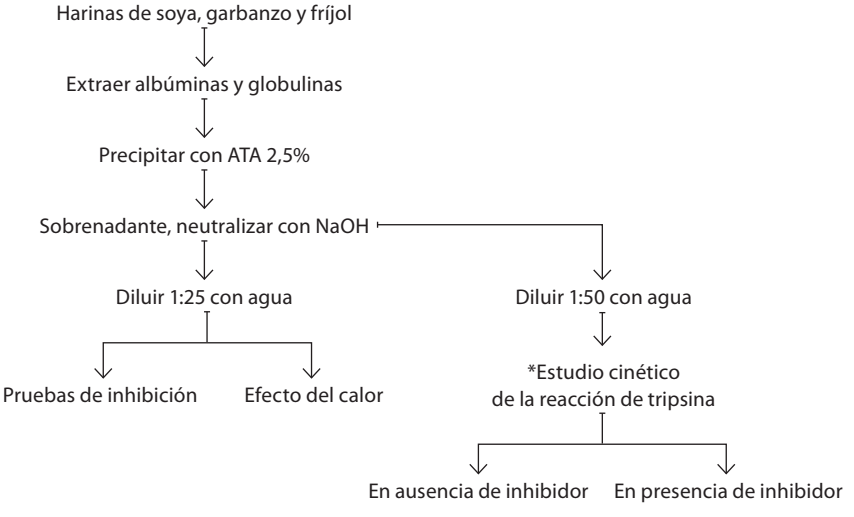


Figura 5.1 Esquema del procedimiento. (*Para esta prueba, se escoge el extracto que haya mostrado el mayor grado de inhibición.)

Experimentos

Nota importante: Todos los tiempos de reacción se deben controlar rigurosamente con un cronómetro.

Pruebas de inhibición

Se realizan con los extractos diluidos de fríjol (F), soya (S) y garbanzo (G).

En 9 tubos de ensayo rotulados, mida los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3F	4F	5S	6S	7G	8G
Solución de tripsina (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Inhibidor solución N° 3 (mL)	-	-	-	1,5F	1,5F	1,5S	1,5S	1,5G	1,5G

Mezcle y deje en reposo durante 3 min. Agregue:

Agua (mL)	1,5	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-
Ácido acético 30% (mL)	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-

Coloque los tubos en termostato a 37 °C por 3 min. Agregue:

BAPNA (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Mezcle bien y deje reaccionar durante 10 min. Agregue:

Ácido acético 30% (mL)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Retire los tubos del termostato y mida los valores de absorbancia a 410 nm, ajustando el 0 de absorbancia con el tubo B.

Estudio cinético de la tripsina en ausencia de inhibidor

En 9 tubos de ensayo rotulados, mida los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución de tripsina (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agua (mL)	3,0	2,75	2,5	2,25	2,0	1,75	1,5	1,25	1,0
Ácido acético 30% (mL)	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-

Mezcle, coloque en termostato a 37 °C por 3 min. Agregue:

BAPNA (mL)	-	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	1,50	1,75	2,0

Mezcle bien y deje reaccionar a 37 °C durante 10 min. Agregue:

Ácido acético 30% (mL)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Retire los tubos del termostato y mida la absorbancia a 410 nm, ajustando el 0 de absorbancia con el tubo B.

Estudio cinético de la tripsina en presencia de inhibidor

Esta parte de la práctica se realiza con el extracto que haya dado mayor valor en las pruebas de inhibición.

En 9 tubos de ensayo rotulados, medir los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución de tripsina (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extracto inhibidor diluido 1:50 (mL)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

Mezcle, deje en reposo por 3 min. Agregue:

Agua (mL)	2,25	2,0	1,75	1,5	1,25	1,0	0,75	0,5	0,25
Ácido acético 30% (mL)	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-

Mezcle, coloque los tubos en termostato a 37 °C por 3 min. Agregue:

BAPNA (mL)	-	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	1,50	1,75	2,0

Mezcle bien y deje reaccionar durante 10 min. Agregue:

Ácido acético 30% (mL)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Retire los tubos del termostato y mida los valores de absorbancia a 410 nm, ajustando el 0 de absorbancia con el tubo B.

Efecto del calentamiento sobre la actividad de los inhibidores de tripsina

Se trabaja con el extracto que haya presentado el mayor valor en las pruebas de inhibición.

1. En 5 tubos de ensayo rotulados B, 1, 15, 30, 60 y A coloque 10 mL del extracto del inhibidor escogido. Lleve los tubos a un baño en ebullición por 15, 10 y 60 min, respectivamente, retirando cada uno al cumplir el tiempo de calentamiento indicado en su etiqueta. El tubo A se coloca en autoclave, previamente calentado, durante 15 min a 16 lb de presión. Los tubos B y 1 no se someten a calentamiento.

Para la siguiente prueba, de cada uno de estos tubos se tomará la cantidad correspondiente de inhibidor calentado a los distintos tiempos y temperaturas.

2. Realice la prueba que se indica en la tabla siguiente. Rotule nuevos tubos y agregue los reactivos en el orden y cantidades indicados:

Tubo	B	1	15	30	60	A
Solución de tripsina (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Inhibidor sin calentar (mL)	0,75	0,75	-	-	-	-
Inhibidor calentado* (mL)	-	-	0,75	0,75	0,75	0,75
Tiempo de calentamiento (min)	-	1	15	30	60	15
Agua (mL)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Ácido acético 30% (mL)	0,5	-	-	-	-	-

Mezcle, coloque en termostato a 37 °C por 3 min. Agregue:

BAPNA (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Mezcle bien y deje reaccionar a 37 °C durante 10 min. Agregue:

Ácido acético 30% (mL)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Retire los tubos del termostato y lea la absorbancia a 410 nm, empleando el tubo B para ajustar el 0.

Cálculos y resultados

Presente un informe de sus resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

Pruebas de inhibición

Calcule las unidades de tripsina en ausencia de inhibidor con el valor de los tubos 1 y 2, y en presencia del inhibidor con los valores de los demás tubos, así como el porcentaje de inhibición para cada uno de los extractos.

Nota: Los valores se deben corregir de acuerdo al volumen total de la mezcla de reacción utilizada (4 mL), ya que la unidad de tripsina está definida por la absorbancia de una mezcla de reacción de 10 mL.

Estudio cinético de la tripsina

Construya las tablas y las gráficas de velocidad vs. concentración de sustrato (v vs. [S]) y 1/v vs. 1/[S]. Determine V_m, K_m, tipo de inhibición y constante del inhibidor.

Efecto del calentamiento sobre la actividad de los inhibidores de tripsina

Construya una tabla comparativa de las unidades de tripsina obtenidas sin inhibidor, con inhibidor sin calentar y con inhibidor calentado a ebullición a diferentes tiempos y en autoclave. Interprete los resultados obtenidos.

Haga las siguientes tablas:

- Tabla 5.1. Pruebas de inhibición: inhibidor, absorbancia, unidades de tripsina, porcentaje de inhibición de la tripsina.
- Tabla 5.2. Estudio cinético de la tripsina en ausencia de inhibidor: absorbancia, concentración de sustrato, velocidad de reacción.
- Tabla 5.3. Estudio cinético de la tripsina en presencia de inhibidor: absorbancia, concentración de sustrato, velocidad de reacción.
- Tabla 5.4. Efecto del calentamiento sobre la actividad de los inhibidores de tripsina: absorbancia, unidades de tripsina inhibidas.

Haga la siguiente gráfica:

- Gráfica 5.1. Efecto de la concentración de sustrato y de la presencia de un inhibidor en la velocidad de reacción: velocidad de reacción ([S]/min) sin (v_0) y con inhibidor (v_i) vs. concentración de sustrato [S] (mg/mL). Ver tablas 5.2 y 5.3.

Cuestionario

1. Explique qué factores afectan el contenido de inhibidores de tripsina.
2. Los animales al ingerir leguminosas crudas pueden presentar hipertrofia pancreática, ¿por qué ocurre esto y cómo afecta al organismo?
3. ¿Por qué son estables los inhibidores de tripsina?
4. ¿Cómo se procesa la harina de soya en la industria para poderla incorporar en los concentrados para animales, y qué pruebas debe pasar?

Referencias bibliográficas

Campell, M.K. y S.O. Farrell. 2009. *Bioquímica*. 6ª ed. México: Cengage Learning. pp. 154-157.

Habib, H. y K. Majid. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and molecular biology review* 2: 068-085.

Hedstrom, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Review* 102(12): 4501-4524.

Hernández, C.A. 1982. Contribución al estudio de los inhibidores de tripsina presentes en la semilla de balú (*Erythrina edulis*). Trabajo de grado.

Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.

Kakade, M.L, N. Simons y I.E. Liener. 1969. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry* 46: 518-526.

Klomklao, S., S. Benjakul, H. Kishimura *et al*. 2011. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean. *Food Chemistry* 129: 1348-1353.

Marquez, M.C. y V. Fernandez. 2009. Effect of dry heat on the in vitro digestibility on trypsin inhibitor activity of chick pea. *International Journal of Food Science Technology* 33(6): 527-532.

Mathews, C.K., K.E. van Holde y K.G. Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Pearson, Addison Wesley. pp. 452-454.

Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H. Freeman and Co. pp. 659.

Osman, M.A., P.M. Reid y Ch.W. Weber. 2002. Thermal inactivation of theraphy bean (*Phaseolus acutifolicus*), soybean and limebean protease inhibitors. Effects of acidic and basic pH. *Food Chemistry* 78: 419-423.

Polgar, L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and molecular life* 62(19-20): 2161-2172.

Rauling, N.D., D.P. Tolle y A.J. Barett. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal* 378: 705-716.

Stryer, L., J.L. Tymoczko y J.M. Bers. 2006. *Bioquímica*. 6ª ed. Editorial Reverté. pp. 225-228.

Suárez, M. 1990. Contribución al estudio de los inhibidores de tripsina presentes en la semilla de *Dioclea lehmanni*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.

Torres, H. y L. Acosta. 1988. Estudio de los inhibidores de tripsina presentes en la semilla de *Canavalia ensiformis*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Valle, P. y Lucas, B. 2000. *Toxicología de alimentos.* México D.F.: Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental. En: es.scribd.com/doc/6640704/30/inhibidores-de-tripsina; consulta: febrero de 2013.

Materiales y reactivos

Materiales

Agitador magnético o mecánico
Centrífuga

pHmetro
Balones aforados de 50 mL y 100 mL
Baño termostatado
Baño de maría
Cronómetro
Colorímetro
Tubos para colorímetro
Pipetas y micropipetas
Gradillas
Plancha de calentamiento

Reactivos

- Harina de fríjol rojo, 5 g
- Harina de soya, 5 g
- Harina de garbanzo, 5 g
- NaCl 1%
- Ácido tricloroacético (ATA) sólido
- NaOH 10%
- Ácido acético 30% en agua: Prepare 100 mL.
- Solución de tripsina (recién preparada): Pese exactamente 50 mg de tripsina y disuélvalos en 25 mL de HCl 0,001 M. Debe conservarse refrigerada. La enzima se prepara en HCl diluido para evitar la autólisis. Nota: Las enzimas van perdiendo actividad durante el almacenamiento, por lo que se requiere hacer una prueba para establecer cuál es la concentración más apropiada para desarrollar la práctica: 1 mL de la solución de tripsina al reaccionar con 3 mL del sustrato (BAPNA) debe dar una absorbancia cercana a 0,367 en 10 min. Con una tripsina de buena actividad este resultado se puede lograr a concentraciones de 4-5 mg/100 mL.
- Extractos inhibidores de tripsina:
    - Inhibidor de fríjol: En un erlenmeyer de 250 mL coloque 5 g de harina de fríjol rojo; puede obtenerlos licuando algunos granos de fríjol. Agregue 50 mL de NaCl 1%. Agite vigorosamente durante 1 h, con agitador mecánico o magnético. Centrifugue a 4000 rpm, durante 15 min. Descarte el residuo y reserve el sobrenadante.
        - Solución N° 1: Mida el volumen de sobrenadante y el pH del extracto.
        - Solución N° 2: Mida 10 mL de la solución N° 1 y colóquelos en un vaso de precipitados de 100 mL. Agregue ácido tricloroacético (ATA) sólido, para tener una concentración final de 2,5% (se requieren 250 mg). Disuelva el ATA y centrifugue el precipitado a 4000 rpm durante 10 min. Descarte el residuo y neutralice el sobrenadante con NaOH al 10%. La precipita-

ción con ATA tiene por objeto eliminar algunas proteínas de alto peso molecular que pueden interferir con la actividad del inhibidor.

- Solución N° 3: Diluya 1:25 la solución N° 2 con agua destilada. La solución resultante se empleará para las pruebas de inhibición y para determinar la estabilidad frente al calentamiento.
- Solución N° 4: A partir de la solución N° 2, haga otra dilución 1:50 con agua destilada y resérvela para el estudio cinético de la tripsina.

- Inhibidores de soya y garbanzo: A partir de harinas de soya y de garbanzo obtenga otros extractos, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el fríjol. Con la dilución 1:25 de estos extractos, o solución N° 3, haga las pruebas para inhibidores de tripsina y verifique si son estables al calor.

- Buffer Tris 0,05 M, pH 8,2, $CaCl_2$ 0,02 M: Prepare 250 mL. Disuelva 6,05 g de Tris y 2,94 g de $CaCl_2.2H_2O$, en 900 mL de agua destilada; ajuste el pH a 8,2 con HCl concentrado y complete a 1 L con agua destilada.
- BAPNA (recién preparado): Para preparar 50 mL, disuelva 15 mg de BAPNA en 1,0 mL de dimetil sulfóxido (DMSO); diluya a 50 mL con el buffer Tris precalentado a 37 °C. Esta solución debe ser fresca y mantenerse a 37 °C en el termostato, en frasco con tapa.

  Nota: En la preparación del BAPNA es indispensable lograr la disolución total del reactivo en el DMSO, agitando con una varilla de vidrio por el tiempo necesario. Si el BAPNA no se disuelve por completo antes de agregar el buffer precalentado, se forma una suspensión lechosa que no se podrá disolver. En estas condiciones, el reactivo no se puede usar.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 5
Inhibidores de tripsina

Objetivos

Fundamento teórico

Tripsina

Inhibidores de tripsina

Reacción de la tripsina sobre el BAPNA

Tablas de datos y resultados

Tabla 5.1 Pruebas de inhibición

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Inhibidor	-	-	-	Fríjol	Fríjol	Soya	Soya	Garb.	Garb.
Abs 410 nm									
Unidades de tripsina* (UT)									
% inhibición									

*Una unidad de tripsina (UT) es la cantidad de enzima que produce por hidrólisis 1 μmol de p-nitroanilina por min. Arbitrariamente 1 UT se define como el incremento, respecto al blanco, de 0,01 unidades de Abs a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción, en las condiciones del ensayo.

Muestra de cálculos:

Tabla 5.2 Estudio cinético de tripsina en ausencia de inhibidor

Anexar gráfica 5.1 (v_0 vs. [S])

Sustrato _____ Tiempo de reacción _____ min

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Abs 410 nm									
[S] (mg/mL)									
Velocidad (ΔAbs/min)									
1/[S]									
$1/v_0$									

K_m _____ V_m _____

Muestra de cálculos:

Tabla 5.3 Estudio cinético de tripsina en presencia de inhibidor

Anexar gráfica 5.1, elaborada conjuntamente con los datos de la tabla 5.2 (v_0, v_i vs. [S])

Sustrato _____ Tiempo de reacción _____ min

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8
Abs 410 nm									
[S] (mg/mL)									
Velocidad (ΔAbs/min)									
1/[S]									
$1/v_i$									

K_m _____ V_m _____

Tipo de inhibición _____ K_i _____

¿Mediante qué fórmula se puede calcular K_i?

Muestra de cálculos:

Tabla 5.4 Efecto del calentamiento sobre la actividad de los inhibidores de tripsina

Inhibidor extraído de _____

Tubo			B	1	15	30	60	A
Tiempo de calentamiento (min)			-	1	15	30	60	15
Inhibidor	**Sin inhibidor**	UTI						
		Abs 410 nm						
	Con inhibidor sin calentar	UTI						
		Abs 410 nm						
	Con inhibidor calentado a ebullición	UTI						
		Abs 410 nm						

UTI, unidades de tripsina inhibidas

Unidades de tripsina (UT), en ausencia de inhibidor* _____

*Valor correspondiente al tubo N° 6 del estudio cinético de tripsina en ausencia de inhibidor, tabla 5.2.

Muestra de cálculos:

Discusión de resultados y conclusiones

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 6
Extracción y caracterización de lípidos presentes en la yema de huevo

Objetivos

Trabajar con sustancia lipídicas, a partir de la yema de huevo. La práctica comprende las siguientes actividades:

- Extracción, cuantificación y caracterización de la lecitina, el colesterol y los triacilgliceroles presentes en la yema de huevo
- Extracción y caracterización del derivado α-glicerilfosforilcolina (α-GPC) de la lecitina
- Reconocimiento de la presencia de colina, fosfatos y glicerol en un hidrolizado de lecitina
- Determinación del contenido de colesterol presente en la yema de huevo, por el método de Lieberman-Burchard
- Determinación de la acción de la lipasa sobre los triacilgliceroles.

Fundamento teórico

Los lípidos son un grupo de biomoléculas heterogéneas caracterizadas por su escasa solubilidad en agua y considerable solubilidad en disolventes orgánicos, propiedades físicas que reflejan la naturaleza hidrofóbica de sus estructuras.

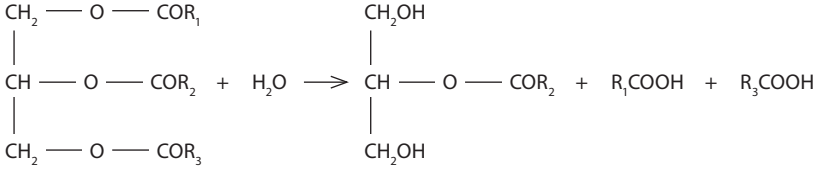
Siendo un grupo de compuestos bastante heterogéneo, los lípidos se clasifican en: acilgliceroles, fosfolípidos, esfingolípidos, ceras, terpenos y esteroles.

Los acilgliceroles están constituidos por glicerol esterificado con ácidos grasos. Los más abundantes son los triacilgliceroles, llamados también triglicéridos o lípidos neutros, cuya función principal es servir para el almacenamiento de grasas. Los diacil y monoacilgliceroles no existen en cantidades apreciables en la naturaleza, pero son intermediarios importantes en varias reacciones biosintéticas.

Los triacilgliceroles existen en forma sólida o líquida, dependiendo de la naturaleza de los ácidos grasos que los componen. La mayoría de los triacilgliceroles de origen vegetal son líquidos (aceites) a temperatura ambiente, pues contienen gran proporción de ácidos grasos insaturados, como oléico, linoléico y linolénico. Los triacilgliceroles de los animales contienen mayor proporción de ácidos grasos saturados, como palmítico y esteárico, por lo

que son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente y reciben el nombre común de mantecas.

Los animales superiores degradan en el intestino delgado los triacilgliceroles ingeridos en la dieta, mediante la acción de enzimas hidrolíticas llamadas lipasas, presentes en el jugo pancreático. Sus sustratos son los di y triacilgliceroles, ya que los monoglicéridos son hidrolizados lentamente por estas enzimas. Los triacilgliceroles se hidrolizan preferiblemente en las posiciones 1 y 3. La velocidad de la reacción no se afecta apreciablemente por el número de átomos de carbono (C4-C18) ni por el número de dobles enlaces en la cadena lateral del ácido graso.



Con el fin de que sean óptimas las condiciones para la acción de la lipasa pancreática, se requiere:

1. Emulsificar las grasas con detergentes o sales biliares
2. Adicionar calcio para mejorar la actividad y para retirar los ácidos grasos formados durante la hidrólisis:

$$2RCOO^- + CaCl_2 \longrightarrow (RCOO)_2Ca + 2Cl^-$$

3. Mantener el pH de la reacción en un valor cercano a 8,0 ya que durante el curso de la reacción hay liberación de H^+, los cuales son neutralizados llevando a la formación de iones NH_4^+:

$$RCOOH \longrightarrow RCOO^- + H^+$$

$$H^+ + NH_4OH \longrightarrow NH_4^+ + H_2O$$

En la práctica la extensión de la hidrólisis enzimática se evidencia por el aumento de los iones amonio, y su concentración puede determinarse por titulación de la mezcla de reacción con KOH de concentración conocida. Esta titulación se efectúa en mezcla de etanol-éter para detener la actividad de la enzima y para aumentar el pK aparente de la fenolftaleína en 2 o 3 unidades de pH.

Los fosfolípidos se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, tejidos animales y vegetales, y sus estructuras, sin importar su origen, son bas-

tante similares. La fosfatidilcolina, o lecitina, la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina forman parte de la estructura de las membranas celulares. Así mismo, los fosfolípidos se denominan como compuestos anfipáticos por tener en su estructura grupos polares y no polares, lo que les permite asociarse con moléculas hidrofílicas (polares) o hidrofóbicas (no polares).

Las lecitinas tienen un pH aproximadamente neutro, ya que contienen grupos ácidos ($HPO_4^{=}$) y básicos (colina) formando switteriones. Se dispersan coloidalmente en agua, en contraste con las grasas neutras que no emulsionan. Pueden precipitarse de una mezcla de lípidos, a partir de una solución etérea, por adición de acetona. Sus enlaces éster pueden ser hidrolizados por ácidos o álcalis. La hidrólisis ácida es reversible, mientras que la alcalina no lo es, pues en presencia de exceso de base el ácido liberado queda en estado de anión completamente disociado, que no muestra tendencia a reaccionar con alcoholes.

Al someter la lecitina a la acción de álcalis en una mezcla de metanol-cloroformo, a 4 °C y por corto tiempo, se obtiene el derivado α-glicerilfosforilcolina (α-GPC) y los ésteres metilados de los ácidos grasos. La α-GPC es un aceite viscoso, que por tratamiento con $CdCl_2$ produce el correspondiente derivado de cadmio, forma en la que puede aislarse. Al someter a la α-GPC a tratamiento con ácido o álcali concentrados, se produce la colina, que se reconoce por su reacción con el reineckato de amonio. Si la base es débil, como $Ba(OH)_2$, se obtiene el fosfoglicerol, pero si es fuerte, como KOH, se hidrolizan totalmente las uniones con el fosfato produciéndose glicerol. Este se reconoce por reacción con agua de bromo y adición posterior de 2-naftol y ácido sulfúrico; en estas condiciones el glicerol se oxida inicialmente a dihidroxiacetona y luego por deshidratación se forma metilglioxal, de color café-verdoso. Por su parte, el grupo fosfato puede reconocerse mediante la reacción con ácido molíbdico, que produce fosfomolibdato, el que en presencia de un reductor, como el ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico o el ascórbico, produce los óxidos de molibdeno de color azul.

Los esfingolípidos son compuestos que forman parte de las membranas de las células animales, en particular del tejido nervioso. Su compuesto central es la 4-esfingenina, o esfingosina, a la que pueden unirse diferentes componentes para obtener derivados importantes: esfingomielinas, cerebrósidos, gangliósidos, etc.

Las ceras sirven de cubierta protectora en frutas y hojas y además son secretadas por insectos, como la cera de abeja. En general son ésteres de ácidos grasos con alcoholes monohídricos de cadena larga. Son químicamente inertes, protegen las plantas de la pérdida de agua y sirven de barrera al paso de agua en insectos, aves y otros animales, como la oveja.

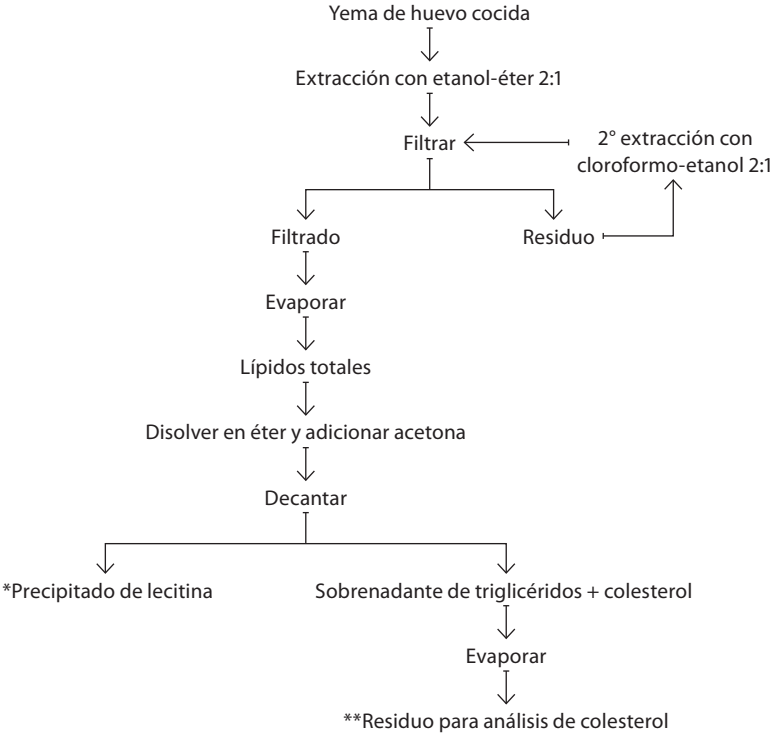
Los terpenoides forman un grupo grande e importante de compuestos cuya unidad repetitiva es el isopreno. La condensación de varias unidades de isopreno da origen a compuestos como caucho, carotenoides, esteroides, aceites esenciales, etc.

Los esteroles están presentes en todos los organismos y tienen diversas funciones. En el ser humano sirven como hormonas, agentes emulsificantes durante la digestión de los lípidos, agentes antiinflamatorios y reguladores de algunos procesos metabólicos. El esterol más abundante en el reino animal es el colesterol, componente estructural de las membranas celulares, que les proporciona mayor rigidez por su estructura de anillo fusionado, el ciclopentanoperhidrofenantreno. Es el precursor de los ácidos biliares, las hormonas sexuales y en ciertos tejidos, de la vitamina D. En el hombre el valor promedio del colesterol sérico es de 200 mg/100 mL, pero puede elevarse con la edad hasta alcanzar un máximo entre los 40 y los 50 años y descender nuevamente. Las mujeres en general muestran valores más bajos que los de los hombres; sin embargo, en la menopausia los valores se elevan. El colesterol es muy soluble en acetona y como no es saponificable, puede separarse de los triglicéridos por tratamiento con KOH y posterior extracción con éter. Para su reconocimiento se emplea la prueba de Lieberman Burchard, específica para 3-hidroxiesteroides con doble enlace en el carbono 5. La reacción se basa en la condensación del anhídrido acético con el grupo hidroxilo del carbono 3 del colesterol, con catálisis ácida por la presencia del ácido sulfúrico, y produce un color verde característico, que absorbe a una longitud de onda de 680 nm.

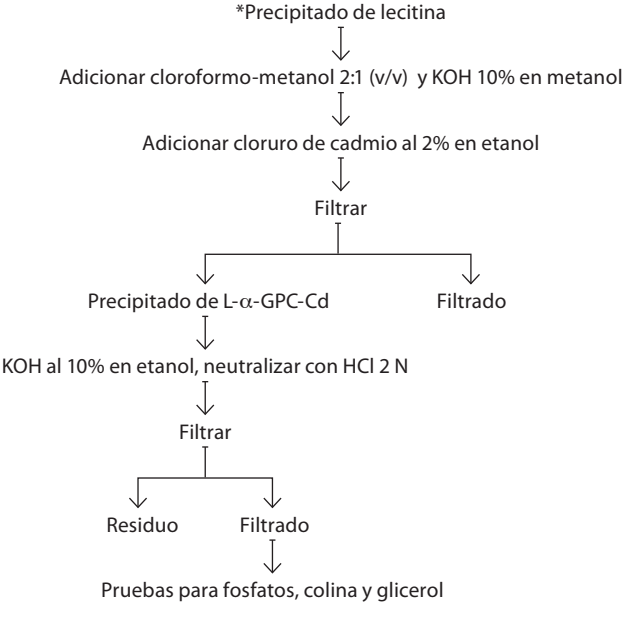
Procedimiento experimental

Nota importante: Tenga un especial cuidado con el manejo de los solventes orgánicos: no utilice mechero y protéjase con gafas de seguridad durante toda la sesión. Cada estudiante debe traer el día de la práctica una yema de huevo cocida.

Extracción de lípidos totales



Análisis de lecitina y pruebas para fosfatos, colina y glicerol



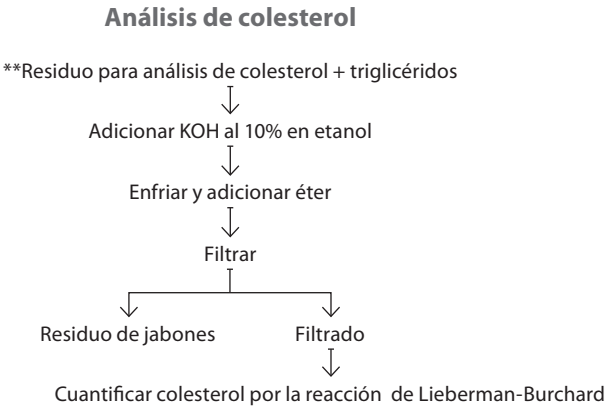


Figura 6.1 Esquema del procedimiento.

Experimentos

1. Extracción de lípidos totales

Pese media yema de huevo cocida y adiciónele 20 mL de mezcla etanol-éter 2:1. Macere en mortero, deje en reposo 10 min, con agitación ocasional. Filtre, recogiendo el líquido en un vaso de precipitado previamente pesado. Haga una segunda extracción del residuo sólido con 10 mL de mezcla de cloroformo-etanol 2:1. Macere y deje en reposo 10 min antes de filtrar y recoger el líquido, junto con el filtrado de la primera extracción, en el vaso pesado. Después de la 2ª extracción, descarte el residuo.

Evapore los solventes del filtrado en cabina en un baño de maría sobre plancha eléctrica, para obtener la fracción de lípidos totales. Pésela.

Disuélvala en 5 mL de éter y adiciónele lentamente 15 mL de acetona. Espere 10 min. Aglomere el precipitado de lecitina, decántelo y péselo.

Evapore en cabina el sobrenadante, que contiene la fracción de triglicéridos + colesterol. Pésela y reserve este residuo para el análisis de colesterol.

2. Análisis de la lecitina

En un vaso de precipitados, adicione al precipitado de lecitina 10 mL de mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) y 15 ml de KOH 10% en metanol. Enfríe 5 min en baño de hielo (4 °C). Adicione 8 mL de cloruro de cadmio al 2% en etanol y filtre. Deseche el filtrado. El residuo es el precipitado de L-α-GPC-Cd.

Pase el residuo a un erlenmeyer y agréguele 15 mL de KOH al 10% en etanol. Refluje por 30 min en baño de maría. Enfríe. Adicione entonces 3

gotas de fenolftaleína y neutralice con HCl 2 N hasta que desaparezca el color rosado. Filtre y descarte el residuo.

Guarde el filtrado para realizar las pruebas para determinar la presencia de fosfatos, colina y glicerol.

3. Pruebas para fosfatos, colina y glicerol

- Fosfatos: Mezcle 1 mL de filtrado con 1 mL de ácido molíbdico. Agite y deje 3 min en reposo. Adicione 1 mL de solución de ácido ascórbico. Incube 10 min a 37 °C. La prueba positiva da un color azul.
- Colina: Mezcle 1 mL de filtrado con 2 gotas de HCl 2N y 2 mL de reineckato de amonio. Enfríe en baño de hielo. La prueba positiva da cristales rosados.
- Glicerol: A 2 mL de filtrado agregue 2 mL de agua de bromo. En vitrina, caliente a la llama y hierva para expulsar el exceso de bromo. Tome 0,4 mL de esta solución y añádale 0,1 mL de solución de ß-naftol al 5% en etanol. Agite y adicione 40 gotas de ácido sulfúrico. Caliente 2 min en baño de maría. Enfríe. Simultáneamente, en otro tubo haga un control con glicerol puro para comparar la coloración. La prueba positiva da un color café verdoso.

4. Cuantificación del colesterol

Al residuo de colesterol + triglicéridos previamente pesado, adicione 1 . mL de KOH al 10% en etanol. Refluje por 30 min. Enfríe y adicione 20 mL de éter. Filtre y dscarte el residuo, que contiene la fracción de jabones.

Concentre el filtrado en cabina. Disuélvalo en cloroformo, hasta completar 10 mL. Cuantifique el colesterol presente en la muestra por medio de la reacción de Lieberman-Burchard.

Nota: Todo el material debe estar perfectamente seco, incluyendo la celda de cuarzo, para evitar accidentes. Use gafas de seguridad.

Patrón para la curva de calibración: colesterol 0,5 mg/mL en cloroformo.

En 8 tubos de ensayo secos y rotulados adicione:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7
Patrón (mL)	-	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	-	-
Muestra* (mL)	-	-	-	-	-	-	0,3	0,5
Cloroformo (mL)	1,0	0,9	0,7	0,5	0,3	0,1	0,7	0,5
Anhidrido acético: ácido sulfúrico 18:0,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Mezcle y deje 10 min en reposo para que se complete la reacción.

Lea la absorbancia a 680 nm.

*Si la muestra está muy concentrada, tome 200 µL y llévelos a 1 mL con cloroformo. Lea la absorbancia a 680 nm.

5. Hidrólisis del aceite oliva con lipasa pancreática

Prepare 6 erlenmeyers de 250 mL rotulados con el tiempo de reacción, en minutos. En cada erlenmeyer pese la muestra de aceite de oliva y registre el peso exacto.

Erlenmeyer	t0	t10	t15	t30	t45	t70
Aceite de oliva (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Buffer NH_4Cl-NH_3 0,05 M, pH 8,0 (mL)	10	10	10	10	10	10
$CaCl_2$ 0,1M (mL)	10	10	10	10	10	10
Agua (mL)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Caliente las muestras en termostato a 37 °C con agitación constante. Agregue:

Etanol:éter 9:1 (mL)	20	-	-	-	-	-
Fenolftaleína (gotas)	5	5	5	5	5	5
Suspensión de lipasa (mL)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Mantenga el color rosado tenue de la solución con adición de NH_4OH 5 N y la temperatura de los erlenmeyers a 37 °C con agitación en el termostato. Con un cronómetro mida el tiempo de reacción para cada muestra:

Tiempo de reacción (min)	0	10	15	30	45	70

Al alcanzar el tiempo de reacción para cada erlenmeyer, detenga la hidrólisis enzimática adicionando:

Etanol:éter 9:1 (mL)	-	20	20	20	20	20

Una vez suspendida la reacción enzimática, titule con ayuda de un pH-metro los ácidos grasos liberados, adicionando KOH 0,10 N hasta llegar a pH 10,5. Anote el volumen de KOH gastado para cada uno de los tiempos de hidrólisis.

Cálculos y resultados

Presente un informe de los resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

En su informe incluya:
- Porcentaje de lípidos totales
- Porcentaje de lecitina referida a la yema de huevo y a los lípidos totales
- Porcentaje de colesterol referido a la yema de huevo y a los lípidos totales

Compare los resultados obtenidos con los presentados en las referencias bibliográficas.

Calcule el porcentaje de hidrólisis enzimática para los diferentes tiempos. Trace la curva de hidrólisis respectiva y analice los resultados.

Interprete, preferiblemente con reacciones, las pruebas realizadas para reconocer los diferentes productos obtenidos.

Haga las siguientes tablas:
- Tabla 6.1. Análisis de la lecitina: resultado de las pruebas cualitativas para fosfatos, colina y glicerol
- Tabla 6.2. Curva de calibración del colesterol: concentración del patrón (mg/mL), absorbancia a 680 nm
- Tabla 6.3. Análisis de triglicéridos: peso de la muestra de aceite de oliva (g), tiempo de hidrólisis (min), volúmen gastado de KOH (mL), % de hidrólisis enzimática
- Tabla 6.4. Resumen de resultados de la práctica: % de lípidos totales, de triglicéridos, de lecitina y de colesterol

Haga las siguientes gráfica:
- Gráfica 6.1. Curva de calibración del colesterol: concentración del patrón (mg/mL) vs. Abs 680 nm, ver tabla 6.2
- Gráfica 6.2. Curva de hidrólisis enzimática de triglicéridos en el aceite de oliva: % de hidrólisis vs. tiempo, ver tabla 6.3.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los productos de la hidrólisis completa de la lecitina?
2. Si la extracción del colesterol no se realiza en condiciones anhidras, ¿qué resultados esperaría?
3. ¿Por qué la lecitina forma una emulsión en presencia de agua?
4. ¿Es el colesterol saponificable? Explique su respuesta.

5. Dependiendo de su edad, ¿cuál debería ser el valor promedio de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL)?
6. ¿Qué factores dietarios pueden alterar los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos? Explique el efecto de cada uno de ellos.
7. ¿Qué son los "sustitutos de grasa" y qué materia prima se usa para su elaboración?
8. ¿Qué son "análogos de lípidos", cómo se obtienen y cuál es su función?
9. Haga una comparación entre el huevo de gallina y el de codorniz en cuanto a: % de colesterol, % de proteína, % de lípidos totales, contenido de ácido oleico y de W6 y W3.
10. ¿Por qué para el análisis de colesterol en huevos de gallina y codorniz se aconseja más usar técnicas cromatográficas que técnicas colorimétricas?
11. ¿Qué relación hay entre los niveles de colesterol en sangre y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares?

Referencias bibliográficas

Barroeta, A.W. El huevo y sus componentes como alimento nutricional. En: http://www.institutohuevo.com/images/archivos/ana_barroeta._el_huevo_alimento_funcional08_13135328.pdf; consulta: febrero de 2013.

Bauer, E., S. Jacob y R. Mosenthin. 2005. Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 18(2): 282-295.

Bolaños, J., S. Quesada, C.I. Nanne *et al*. 1988. Efecto del consumo de huevo y lecitina en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en ratas. *Revista costarricense de ciencias médicas* 19(1-2): 17-27. En: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0253-29481998000100002&script=sci_arttext

Cabezas, D.M., R. Madory y M.C. Tomas. 2009. Lecitinas hidrolizadas de girasol. Obtención y aplicaciones en emulsiones aceite en agua. *Ciencia y Tecnología de Alimentos (Argentina)* pp. 74-80.

Closa, S.J., C. Marchesich, M. Cabrera *et al*. 1999. Composición de huevos de gallina y codorniz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49(2): 181-185.

es.wikipedia.org/wiki/fosfatidilcolina; consulta: febrero de 2013.

García, C. y C. Abala. 1998. Composición lipídica de huevos de gallina alimentados con productos grasos y proteicos marinos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 48(1): 71-75.

Gargoyuri, Y., G. Pieroni, C. Riviere *et al*. 1986. Kinetic assay of human gastric lipase on short and long chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology* 91(4): 919-925.

Karra-Chaabouri, M, I. Bouaziz, S. Boufi *et al*. 2008. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate. *Coloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66: 168-177.

Lorenzo, P., A. Moreno, J.C. Leza *et al*. 2008. *Velásquez. Farmacología básica y clínica*. 18ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana. pp. 459.

Mathews, C.K., K.E van Holde y K.G. Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Pearson Addison Wesley. pp. 346-347, 705.

McMurry, J. 2008. *Química orgánica*. 7ª ed. México D.F.: Cengage Learning. pp. 810, 1064 y 1089.

Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H. Freeman and Co. pp. 343-365.

Sagiroglu, A. y N. Arabaci. 2005. Sunflower seed lipase: extraction, purification and characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35(1): 37-50.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2012. USDA National nutrient database for standard reference, Release 25. Nutrient Data Laboratory. En: http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl; consulta: febrero de 2013.

Xiong, Q., W.K. Wilson y J. Pang. 2007. The Lieberman Burchard reaction: sulfonation, desaturation and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids* 42(1): 87-96.

Yánez, E. y E. Biolley. 1999. Sustitutos de grasa en la alimentación humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49(2): 101-105.

Materiales y reactivos

Materiales

Erlenmeyers
Pipetas
Bureta
Mortero
Baño de maría
Plancha de calentamiento
Balón aforado de 10 mL
Colorímetro
Termostato con agitación
pHmetro

Reactivos

- Yema de huevo cocida y pesada
- Mezcla etanol:éter 2:1 (prepare 20 mL)
- Mezcla cloroformo:etanol 2:1 (prepare 10 mL)
- Eter etílico

- Acetona
- Mezcla cloroformo:metanol 2:1 (prepare 10 mL)
- KOH 10% en metanol, recién preparado (prepare 15 mL)
- Cloruro de cadmio 2% en etanol (prepare 50 mL)
- KOH 10% en etanol, recién preparado (prepare 25 mL)
- Fenolftaleína 0,2% en etanol
- HCl 2 N
- Reineckato de amonio 2% en etanol (prepare 10 mL y guarde en nevera)
- Agua de bromo
- 2-naftol 5% en etanol
- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución de ácido molíbdico: Agregue 84 mL de H_2SO_4 concentrado (RA, libre de fosfatos y silicatos) sobre 300 mL de agua, agite y enfríe. Aparte disuelva 25 g de molibdato de amonio en agua. Luego mezcle las dos soluciones y complete hasta 1 L con agua. Verifique que los reactivos estén libres de fosfatos. Para cada práctica se requieren 35 mL de solución.
- Ácido ascórbico 1 mg/mL, recién preparado
- Solución patrón de colesterol (0,5 mg/mL) en cloroformo (prepare 10 mL)
- Mezcla anhídrido acético-ácido sulfúrico 18:0,5 recién preparada (prepare 18,5 mL)
- Aceite de oliva
- NH_4OH 5 N
- Fenolftaleína 0,2% en etanol
- Buffer cloruro de amonio-amoniaco 0,05 M, pH 8,0: Prepare una solución de NH_4Cl 0,05 M (0,135 g de NH_4Cl en 50 mL) y otra de NH_4OH 0,05 M (0,34 mL de NH_4OH RA en 100 mL). A 20 mL de la solución de NH_4Cl adiciónele lentamente la solución de NH_4OH, controlando el pH hasta alcanzar un valor de 8,0.
- Suspensión de enzimas: Panzytrat (Knoll) es una mezcla de enzimas digestivas. Cada cápsula contiene: lipasa 25.000 UI, amilasa 22.500 UI y proteasa 1.250 UI. Peso de una cápsula de Panzytrat, 0,543 g. Retire el contenido de la cápsula y muélalo en un mortero. Adicione 30 mL de buffer NH_4Cl-NH_3 0,05 M, pH 8,0. Decante el residuo. Mantenga la solución en un baño de hielo mientras la utilice.
- Solución de $CaCl_2$ 0,1 M: Disuelva 1 g de $CaCl_2$ ó 1,45 g de $CaCl_2.2H_20$ en 100 mL de agua.
- Solución de amoníaco 5 N: Mezcle 16,8 mL de NH_4OH concentrado con 33 mL de agua.
- Mezcla de etanol-éter 9:1: Prepare 130 mL.
- Solución valorada de KOH 0,10 N: Disuelva 1,37 g de KOH en 250 mL. Valore con ácido.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 6
Extracción y caracterización de lípidos presentes en la yema de huevo

Objetivos

Fundamento teórico y reacciones

Extracción de lípidos totales

Análisis de lecitina

Análisis de colesterol

Análisis de triglicéridos

Tablas de datos y resultados

Tabla 6.1 Análisis de lecitina
Extracción de lípidos totales

Peso yema de huevo _____ Peso muestra para extracción _____

Peso lípidos totales _____ Peso de la lecitina _____

Peso de colesterol + triglicéridos _____

Compuestos	Reactivos	Resultado	Conclusión
Fosfatos			
Colina			
Glicerol			

Tabla 6.2 Curva de calibración del colesterol

Anexar gráfica 6.1 (concentación del patrón vs. Abs 680 nm)

Concentración del patrón _____

Tubo	B	1	2	3	4	5	6*	7*
Concentración (mg/mL)								
Abs 680 nm								

*Dilución en el tubo N° 6 _____ y el tubo N° 7 _____

Muestra de cálculos:

Tabla 6.3 Análisis de triglicéridos

Anexar gráfica 6.2 (% de hidrólisis vs. tiempo)
Índice de saponificación para aceites: 220 mg KOH/g

Índice de saponificación corregido* _____ N_{KOH} _____

Peso aceite de oliva (g)	**Tiempo (min)**	**Volumen KOH (mL)**	**$V_t - V_0$**	**% hidrólisis**
	0			
	10			
	15			
	30			
	45			
	70			

V_0, volumen de KOH gastado en la muestra de tiempo 0

V_t, volumen de KOH gastado en la muestra de tiempo t

En la muestra de t=0 se titulan los ácidos grasos libres que estaban presentes antes de la acción de la enzima. Como los pesos de las muestras no son idénticos, la corrección del blanco se hace de manera proporcional.
Muestra de cálculos:

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{(V_t - V_0) \times N_{NaOH} \times \text{peso fórmula del KOH (mg/meq)} \times 1 \text{ g} \times 100}{\text{Peso muestra (g)} \times \text{índice de saponificación corregido* (mg)}}$$

*Como la hidrólisis enzimática se realiza en un 66% (no se hidroliza un enlace éster), el índice de saponificación se debe corregir.

Discusión de resultados y conclusiones

Tabla 6.4 Resumen de resultados

Resultado	Valor obtenido	Valores citados en la literatura*
% lípidos totales		
% triglicéridos		
% lecitina		
% colesterol		

*Referencias bibliográficas:

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 7
Técnicas de análisis de proteínas

Objetivos

Conocer algunos métodos empleados en la determinación de proteínas, como los de Biuret, Kjeldahl, Bradford y absorción en el ultravioleta (UV), y desarrollar habilidades para el análisis cuantitativo de proteínas en diferentes tipos de muestras.

La práctica comprende las siguientes actividades:

- Obtención, a partir de harinas vegetales, de fracciones proteicas con base en la solubilidad: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas.
- Realización de la curva de calibración para cada uno de los métodos de análisis de proteínas utilizados en la práctica
- Determinación cuantitativa del contenido de proteínas y comparación de los resultados entre los diferentes métodos empleados
- Búsqueda de información relacionada con la utilidad del análisis de fracciones proteicas en la industria, en la investigación clínica y en la básica.

Fundamento teórico

Las proteínas son un grupo de biomoléculas caracterizadas por su variedad estructural y enorme diversidad de funciones biológicas. Las proteínas de cada ser vivo, animal, vegetal o microorganismo, son específicas pues son codificadas por su genoma. A pesar de que desempeñen la misma función, las proteínas presentan ligeras variaciones estructurales en las diferentes especies. Químicamente pueden diferenciarse en proteínas simples, constituidas sólo por aminoácidos, y en proteínas complejas, las que contienen material adicional como carbohidratos, lípidos, metales o ácidos nucleicos.

En general, no hay un método de determinación de proteínas completamente satisfactorio. La escogencia del método depende de la naturaleza de la proteína que se analiza, de la presencia de otros componentes en la muestra, de la exactitud y la sensibilidad deseadas y de la rapidez con que se requieran los resultados.

Con base en su solubilidad, las proteínas pueden clasificarse en:

- Albúminas: Presentes en todos los seres vivos. Son proteínas fácilmente solubles en agua y coagulan por acción del calor. Precipitan por adición de sulfato de amonio de 80-100% de saturación, equivalente a una concentración de 22%. Ejemplos: ovoalbúmina, seroalbúmina, lactoalbúmina.
- Globulinas: Distribuidas ampliamente en todos los seres vivientes, son proteínas insolubles o muy poco solubles en agua. Su solubilidad aumenta de manera notable por la adición de pequeñas cantidades de sales neutras, como NaCl 1%. Precipitan de una solución al añadir sulfato de amonio de 50% de saturación (11% de concentración). Ejemplos: seroglobulinas, globulinas de semillas, lactoglobulinas.
- Prolaminas: Presentes sólo en plantas. Son proteínas solubles en etanol de 70-80% y en soluciones acuosas de otros alcoholes de bajo peso molecular, e insolubles en agua y en etanol absoluto. Por hidrólisis liberan gran cantidad de prolina y amoníaco. Ejemplos: gliadina de trigo, zeína de maíz.
- Glutelinas: Presentes en plantas y abundantes en granos de cereales. Son proteínas insolubles en solventes neutros, soluciones salinas (NaCl 1%) y alcohólicas, pero solubles en ácidos y álcalis diluidos (0,1 N). Ejemplos: glutelina de trigo, orizeína de arroz.
- Escleroproteínas: Son proteínas animales fibrosas, insolubles en agua y muy resistentes a las enzimas proteolíticas. Ejemplos: colágeno de cartílago, piel, huesos; queratinas de seda, lana, pelo, uñas.

Método de Biuret

La reacción del Biuret sirve para analizar proteínas solubles, pues los compuestos que contienen dos o más enlaces peptídicos, péptidos y proteínas, dan un color rosado o lila característicos cuando se tratan con sulfato de cobre diluido en solución alcalina. El color se debe al complejo de coordinación que se forma entre el átomo de cobre y cuatro átomos de nitrógeno provenientes de enlaces peptídicos (dos de cada cadena peptídica). La estructura del complejo responsable de la coloración se muestra en la figura 7.1.

Los espectros de absorción de los complejos de cobre formados con diferentes proteínas son similares aunque no idénticos, por lo que cualquier proteína se puede utilizar como patrón de coloración.

Esta técnica es bastante reproducible para una proteína dada, aunque para obtener coloración se requieren cantidades relativamente grandes de ella (1-20 mg/mL). Compuestos como glicerol, amoníaco, tris(hidroximetil) aminometano (Tris), causan interferencia.

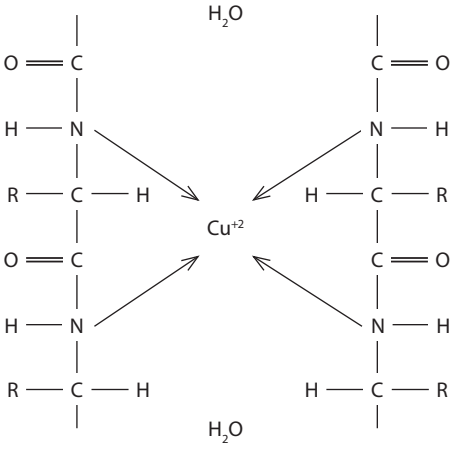


Figura 7.1 Complejo de coordinación entre cobre y nitrógenos peptídicos.

Método de Kjeldahl

En 1883 el investigador danés Johann Kjeldahl desarrolló el método más usado en la actualidad para el análisis de proteínas.

Este método, diseñado para la determinación de nitrógeno orgánico total, puede aplicarse al análisis de proteína bruta o de proteína verdadera de una muestra sólida o líquida. La proteína bruta incluye todos los compuestos nitrogenados presentes, proteicos y no proteicos.

Los resultados de los análisis por Kjeldahl se expresan como proteína bruta, multiplicando el porcentaje de nitrógeno en la muestra por 6,25. Esta conversión se basa en el hecho de que el contenido promedio de nitrógeno de muchas proteínas es 16%. Aunque este promedio puede no ser válido para proteínas específicas purificadas, es lo suficientemente exacto para la mayoría de proteínas.

Para determinar la proteína verdadera en un extracto proteico, hay que separarla por precipitación con ácido tricloroacético al 10%; en el sobrenadante que queda, se analiza el nitrógeno no proteico. La diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno no proteico es la fracción de nitrógeno correspondiente a la proteína verdadera.

Para la determinación de nitrógeno presente en la muestra es necesario realizar la digestión del compuesto hasta CO_2 e iones NH_4^+, por tratamiento en caliente con ácido sulfúrico concentrado en presencia de mezcla catalizadora. Si se trata de determinar el nitrógeno en compuestos con enlaces

N–N, NO y NO_2, se deben tratar previamente con agentes reductores para convertirlos en grupos amino.

La concentración del amonio producido se determina agregando un exceso de álcali a la solución, con lo cual se desplazan los iones de bisulfato amónico a la forma de hidróxido de amonio. Este último se arrastra por destilación con vapor de agua en un sistema cerrado y se absorbe en una solución de ácido bórico. El borato ácido de amonio producido se titula con una solución de ácido fuerte de concentración conocida (HCl).

El método es reproducible, se requiere que el contenido de proteína de la muestra sea mayor a 3 mg/mL, para muestras líquidas, o mayor a 3 mg/g, para muestras sólidas.

El método de Kjeldahl se recomienda para determinar proteína en mezclas crudas y relativamente grandes, pero no es aconsejable cuando se trata de un número grande de muestras de proteína soluble relativamente pura, ya que en general es dispendioso y consumidor de tiempo.

Las reacciones que ocurren durante todo el proceso son:

a. Digestión:

$$\text{N orgánico} + H_2SO_4 \xrightarrow[\text{calor}]{\text{catalizador}} NH_4HSO_4 + CO_2 + SO_2 + SO_3$$

b. Destilación:

$$NH_4HSO_4 + NaOH \longrightarrow NH_4OH + NaHSO_4$$

c. Absorción:

$$NH_4OH + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4H_2BO_3 + H_2O$$

d. Titulación:

$$NH_4H_2BO_3 + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_3BO_3$$

Método de absorción en el UV

Las medidas de absorbancia se utilizan con frecuencia para determinar la concentración de proteínas y péptidos en solución. Estas medidas pueden hacerse en forma rápida y precisa con el espectrofotómetro. La absorbancia está relacionada linealmente con la concentración, de acuerdo a la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

donde: A, absorbancia; ε, coeficiente de absorción molar; c, concentración molar y l, espesor de la celda en centímetros.

El espectro de absorción de una proteína se debe mayoritariamente a la de los residuos de aminoácidos aromáticos.

En el rango 230-300 nm los coeficientes de absorción son: 1-400 $M^{-1}cm^{-1}$ para tirosina a 274 nm, 5-600 $M^{-1}cm^{-1}$ para triptófano a 280 nm y 200 $M^{-1}cm^{-1}$ para fenilalanina a 257 nm. A su vez el espectro de absorción de los aminoácidos aromáticos depende de la naturaleza de los cromóforos que lo rodean. Este efecto del medio ambiente causa ensanchamiento de las bandas, modificación en la longitud de onda de máxima absorción y cambio en la intensidad de la absorción.

Los enlaces disulfuro presentan débil absorción cerca a 250 nm y los enlaces peptídicos, cerca a 230 nm.

El buffer para realizar medidas espectrofotométricas no debe absorber en el rango de longitud de onda en el que se realiza el experimento. Este criterio se tiene en cuenta para la mayoría de disolventes acuosos usados. La mayoría de los buffer que contienen grupos amino y/o carboxilo absorben considerablemente en el rango de 220-280 nm. Los buffer más utilizados en el UV lejano son los de fosfato y borato. Los buffer se deben guardar a bajas temperaturas y por cortos periodos de tiempo, ya que son excelentes medios para el crecimiento de gran variedad de microorganismos. El ácido ascórbico como antioxidante presenta problemas porque también absorbe en el rango de 220-280 nm.

Método de Bradford

La técnica de Bradford se basa en la reacción de la forma aniónica de residuos de arginina, principalmente, o de lisina, histidina, triptófano, tirosina y fenilalanina de la proteína, con la forma catiónica del reactivo azul de Coomassie G-250, formando un complejo de color azul cuya absorción máxima se presenta a 595 nm. Es una técnica bastante sensible, del orden de microgramos, reproducible y rápida; la reacción se completa en 2 min, con buena estabilidad del color durante una hora. No presentan interferencia ni los iones, como Na^+ y K^+, ni los agentes reductores ni los carbohidratos, como la sacarosa. Los buffer fuertemente alcalinos pueden desarrollar color, pero la mayor interferencia la presentan detergentes como SDS y Triton X-100.

El colorante libre en solución está en forma catiónica, con un máximo de absorción a 470 nm, y con coloración rojiza.

La curva de calibración no es lineal a concentraciones altas de proteína, por lo que se debe definir el rango de linealidad y usar este intervalo como rango de trabajo. Además, se debe tener en cuenta la interferencia que pueda

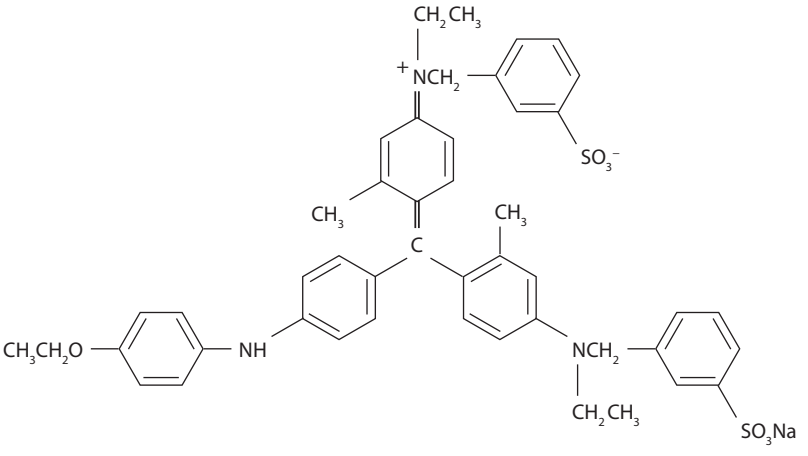


Figura 7.2 Estructura del colorante azul de Coomassie G-250.

causar el buffer, de manera que es necesario hacer un blanco de buffer y determinar su absorción. Si el buffer no presenta absorción, puede utilizarse agua como blanco.

La selección del patrón es muy importante puesto que la intensidad del color puede variar, dependiendo del contenido de aminoácidos de la proteína. Se recomienda, de ser posible, usar como patrones de referencia la albúmina de suero bovino (BSA) o la inmunoglobulina G (IgG).

Varias proteínas, en especial de naturaleza hidrofóbica, tienden a precipitar en presencia del colorante azul de Coomassie G-250, por lo que se recomienda el uso de una pequeña cantidad (100-250 μL) de NaOH 1 M para ayudar a la solubilización.

Procedimiento experimental

Experimentos

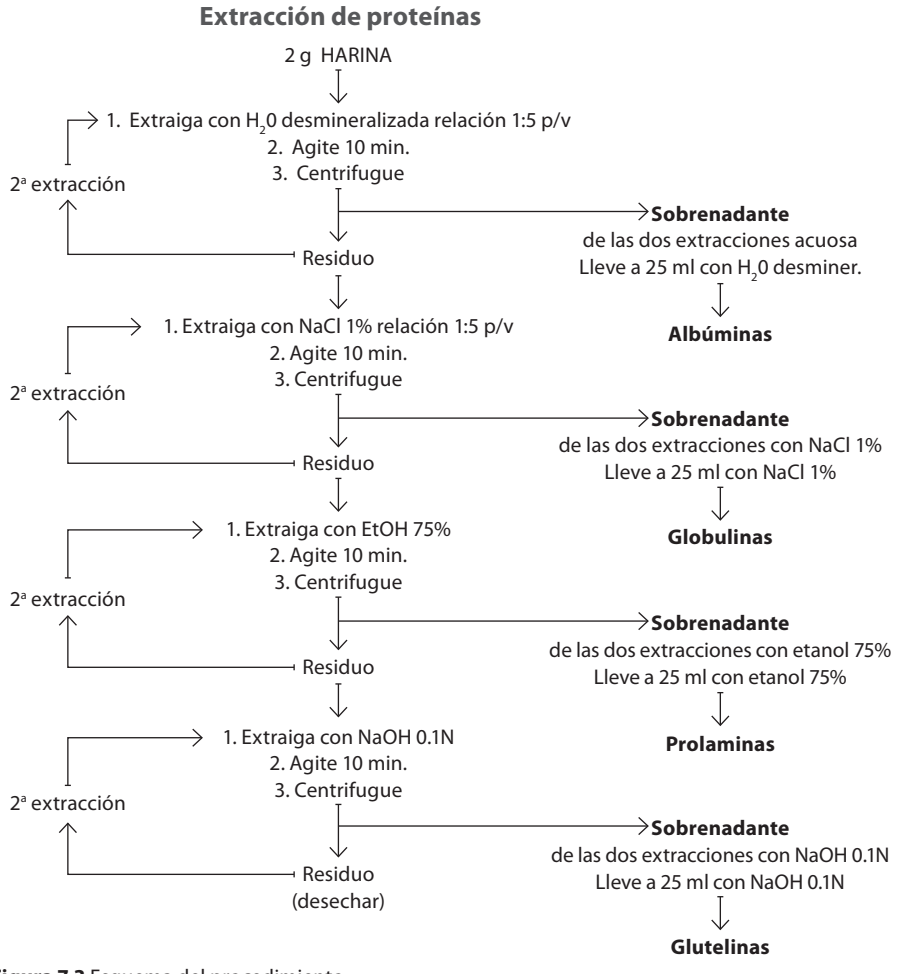


Figura 7.3 Esquema del procedimiento.

Para extraer las fracciones proteicas requeridas para determinar el contenido de proteínas, se emplea una muestra de harina finamente molida (trigo, avena, mungo, arveja o fríjol) y se sigue el esquema de la figura 7.3.

Sobre los extractos de las fracciones proteicas obtenidas se realiza la determinación del contenido de proteínas a través de:

- Método de Kjeldahl: harina 25-30 mg (peso exacto, por duplicado)
- Albúminas: 5 mL de extracto
- Globulinas: 5 mL de extracto
- Prolaminas: 5 mL de extracto
- Glutelinas: 5 mL de extracto
- Método de Biuret: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas.
- Método de Bradford: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Se diluyen los extractos originales 1:10 y a continuación, 1:100.

- Método UV: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Se diluye hasta la concentración apropiada.

Método de Biuret

Para la curva de calibración se utiliza como patrón una solución acuosa de proteína, que puede ser albúmina de huevo o caseína, en concentración de 5 mg/mL.

En 10 tubos de ensayo rotulados, añada los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8*	9*
Patrón de proteína (mL)	-	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,2	1,5	-	-
Extracto (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1,0
Agua destilada (mL)	2,0	1,9	1,7	1,5	1,3	1,1	0,8	0,5	1,5	1,0
Reactivo de Biuret (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0

Mezcle bien y deje en reposo por 30 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color o coloque los tubos en un termostato a 37 °C durante 10 min. Lea la absorbancia a cada tubo a 540 nm.

*De cada uno de estos dos tubos, prepare uno por fracción proteica: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas; en total serán 8 tubos.

Método de Kjeldahl (técnica micro)

Digestión

En un balón Kjeldahl coloque en su orden lo siguiente:

Muestra de harina exactamente pesada: 30-40 mg (haga duplicado)

Si trabaja con un extracto, coloque una alícuota de 5 mL.

Mezcla catalizadora: aproximadamente 100 mg

H_2SO_4 concentrado: 30-40 gotas

En otro balón prepare el blanco, colocando la mezcla catalizadora y el H_2SO_4.

Lleve los dos balones al digestor, ubicado en la campana de extracción. Caliente al principio suavemente durante unos 5 min, con el fin de eliminar por evaporación la mayor parte de la humedad que acompaña a la muestra. Suba gradualmente el calor hasta una temperatura tal que los vapores de SO_3 (vapores irritantes producidos por descomposición del H_2SO_4) no

lleguen sino a la mitad del cuello del balón de digestión. Mantenga estas condiciones aproximadamente por 1 h, hasta obtener una solución de color verde esmeralda. Deje enfriar los balones.

Destilación y absorción

En la figura 7.4 se muestra el aparato de destilación. Al balón generador de vapor agréguele agua destilada y perlas de vidrio o pedazos de porcelana, para regular la ebullición. Opere el generador de vapor hasta alcanzar un flujo de vapor constante, lo que se consigue regulando el calor. Entre tanto, la llave de doble paso debe conducir el vapor al vertedero.

Al balón de digestión agréguele con cuidado un poco de agua destilada y agítelo para disolver la suspensión. Si el balón de digestión no tiene boca esmerilada, transfiera cuantitativamente esta mezcla al balón de destilación con boca esmerilada. Lave unas tres veces el balón de digestión, con pequeñas porciones de agua destilada, y agregue esta agua de lavado al balón de destilación. A continuación abra la llave de entrada de agua al refrigerante, para evitar pérdida de amoniaco. En un erlenmeyer de 125 mL, adicione 15 mL de ácido bórico al 4% y 3 gotas de indicador de Taschiro: la solución se torna rojiza. Coloque el erlenmeyer debajo del refrigerante, de modo que la punta del tubo interior quede sumergida en el ácido bórico (figura 7.4).

Coloque el balón de destilación que contiene la mezcla digerida en el extremo del tubo que conduce el vapor, asegurándose de que quede perfectamente ajustado, para prevenir escapes.

Levante la tapa del embudo que contiene NaOH del 50% para permitir el paso lento de aproximadamente 5 mL de la solución. Asegúrese de que

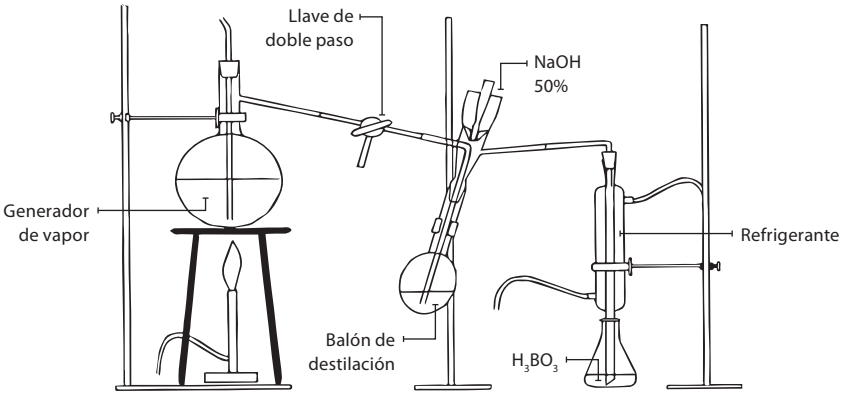


Figura 7.4 Equipo de destilación para el método de Kjeldahl.

quede un poco del líquido en el fondo del embudo para que actúe como sello. Tape rápidamente el embudo y opere la llave de doble paso para que el vapor penetre al balón de destilación, el mismo al que se le acaba de agregar la soda concentrada.

Contabilice 5-10 min a partir del momento en que empiecen a condensarse los vapores de NH_3 en la parte superior del refrigerante, lo que se reconoce cuando la solución de ácido bórico vira a azul. Transcurrido este tiempo, baje el erlenmeyer de modo que el extremo del tubo interior del refrigerante quede por encima del nivel del líquido en el erlenmeyer. Espere 3 min más para que el refrigerante escurra y se lave.

Lave la punta del refrigerante con el frasco lavador y reciba esta agua de lavado en el erlenmeyer y proceda a la titulación.

Adicionalmente, retire el balón de destilación y deje pasar el vapor para efectos de lavado. Opere en seguida la llave de doble paso para dirigir el vapor hacia el vertedero. Lave el extremo del tubo que conduce el vapor al balón de destilación, con el fin de dejarlo limpio para la próxima destilación.

Titulación

Titule la solución del erlenmeyer correspondiente al blanco con HCl 0,010 N valorado, hasta que alcance la misma coloración que tenía antes de recibir el destilado. Luego, titule uno a uno los demás erlenmeyers provenientes de la destilación hasta que obtenga una coloración final en cada uno igual a la alcanzada con el blanco.

Método de absorción en el UV

Para la curva de calibración se utiliza como patrón una solución acuosa de proteína, que puede ser albúmina de huevo o caseína, en concentración de 5 mg/mL.

En 9 tubos de ensayo rotulados, añada los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7*	8*
Patrón de proteína (mL)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	-	-
Extracto problema (mL)	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1,0
NaCl 1% (mL)	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8	4,5	4,0

Mezcle y lea la absorbancia a 280 nm.

*Haga las lecturas de las muestras de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas diluidas como se requiera, para interpolar en la curva de calibración.

Método de Bradford

Para la curva de calibración se utiliza como patrón una solución acuosa de proteína, que puede ser albúmina de huevo o caseína, en concentración de 1,0 mg/mL.

En 8 tubos de ensayo rotulados, añada los siguientes reactivos en el orden indicado:

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7*
Patrón de proteína (µl)	-	10	20	30	40	50	60	-
NaCl 1% (µl)	2500	2490	2480	2470	2460	2450	2440	2450
Muestra diluida (µl)	-	-	-	-	-	-	-	50
Bradford (µL)	500	500	500	500	500	500	500	500

*Prepare este tubo con las muestras de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas diluidas como se requiera, para interpolar en la curva de calibración.

Agite. Transcurridos 10 min (y antes de 30 min) haga lecturas de absorbancia a 595 nm.

Nota: Como el colorante se une al cuarzo, para hacer las lecturas de absorbancia es recomendable usar celdas de vidrio o plásticas o, en su defecto, lavar las de cuarzo con etanol.

Cálculos y resultados

Presente un informe con sus resultados, según el formato que aparece al final de esta práctica.

Para los métodos colorimétricos, elabore las curvas de calibración así:

- Gráfica 7.1. Curva de calibración de proteína para el método de Biuret: absorbancia vs. concentración, ver tabla 7.1.
- Gráfica 7.2. Curva de calibración de proteína para el método de absorción en el UV: absorbancia vs. concentración, ver tabla 7.2.
- Gráfica 7.3. Curva de calibración de proteína para el método de Bradford: absorbancia vs. concentración, ver tabla 7.3.

Con base en ellas calcule los porcentajes de proteína en cada muestra. Es conveniente ajustar las curvas de calibración por regresión lineal, excepto para el método de Bradford.

En cuanto al método de Kjeldahl, a partir de los volúmenes de ácido gastados, calcule el porcentaje de nitrógeno total con la ecuación:

$$\%Nt = \frac{(Vm\text{-}Vb) \times N_{HCl} \times 14 \times 100}{\text{Peso muestra (mg)}}$$

Donde: Nt, nitrógeno total; Vm, volumen de ácido gastado en la muestra; Vb, volumen de ácido gastado en el blanco; N_{HCl}, normalidad del HCl.

Para muestras líquidas, aplique la siguiente ecuación:

$$\%Nt = \frac{(Vm\text{-}Vb) \times N_{HCl} \times 14 \times \text{volumen total del extracto} \times 100}{\text{Alícuota (mL)}}$$

Luego refiera al valor del %N al peso de harina utilizado para la extracción. Calcule el porcentaje de proteína bruta:

$$\%\ \text{proteína bruta} = \%Nt \times \frac{100}{16}$$

$$\%\ \text{proteína bruta} = \%Nt \times 6{,}25$$

Analice los resultados, incluyendo las ventajas y las desventajas observadas en la aplicación de las diferentes técnicas.

En la tabla 7.4 haga un resumen de los resultados y compárelos con los valores dados en la literatura.

Cuestionario

1. ¿Qué diferencia hay entre proteína bruta y proteína verdadera? ¿Cómo se pueden determinar?
2. ¿Cuál es el fundamento del método del ácido bis-cinconínico para cuantificar proteínas? ¿Qué sustancias pueden interferir en esta determinación? ¿Cuál es la sensibilidad del método?
3. ¿Qué aminoácidos se encuentran en mayor proporción en gliadinas y gluteninas?
4. ¿Cuáles son las principales enzimas presentes en el trigo y a qué grupo de proteínas pertenecen?
5. ¿Cómo se lleva a cabo el proceso de panificación y qué fracción proteica es importante en este proceso?
6. ¿Cuáles son las principales propiedades de la masa de panadería y, químicamente, a qué pueden atribuirse?
7. ¿Por qué la avena no se puede usar en panificación? ¿Qué recurso de la ingeniería genética podría utilizarse para hacer esto posible?

8. Químicamente, ¿qué son la concanavalina A, la canavanina y las hemaglutininas?
9. En la canavalia, ¿en qué fracción proteica se encuentra el mayor contenido de canavanina y el mayor contenido de hemaglutininas?
10. ¿Cuáles son los métodos oficiales de análisis de proteínas en alimentos?
11. ¿Qué significado tienen los niveles de albúminas y globulinas de suero en el diagnóstico clínico?

Referencias bibliográficas

Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. 1984. *Official methods of analysis*. 13ª ed. Washington.

Barac, M., S. Cabrilo, M. Pesic *et al*. 2009. Profile and functional properties of seed proteins from six pea (Pisum sativum) genotypes. *Legume Research* 32(4): 265-269.

Baudi, S. 2000. *Química de los alimentos*. 2ª ed. Editorial Acribia. pp. 137-138.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry* 72: 248-254.

Chavan, U.D., D.B. McKenzie y F. Shahidi. 2001. Functional properties of protein isolates of beach pea (Lathryus martimus). *Food chemistry* 74(2): 177-187.

Creighton, T.E. (ed.). 1997. *Protein structure. A practical approach.* Oxford: Oxford University Press. pp. 251-264.

Gil, A. 2010. *Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos.* Tomo II. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana. pp. 569.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr *et al*. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265.

Neves, V.A, E.J. Lourenco y M.A. da Silva. 1996. Isolation and in vitro hydrolysis of lentil protein fractions by trypsin. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 46(3): 238-242.

Pedroza, I.R., J. Monroy y R. Moreno-Terrazas. 1996. Instructivos para el laboratorio de análisis químicos de maíz y sorgo. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 46(3): 243-246.

Ramírez, M. *et al*. 2000. Estudio de algunas características de las proteínas de Canavalia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50: 69-73.

Soriano del Castillo, J.M. 2006. *Nutrición básica humana.* 1ª ed. Universitat de Valencia. pp. 28-31.

Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Fisiología vegetal. Vol. 1*. Publicacions de la Universitat Jaume I de Castellón. pp. 566-570.

Tomoskozi, S., R, Lasztity, R. Haraszi *et al*. 2001. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Food/Nahrung* 45(6): 399-401.

Wang, N. y J.K. Dawn. 2006. Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (Lens culinaris). *Food chemistry* 95: 493-502.

Wang, T.L., C. Dononey, C.L. Hedle *et al*. 2003. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant physiology* 131: 886-891.

Zor, T. y Z. Selinge. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analitical Biochemistry* 236: 302-308.

Materiales y reactivos

Materiales

Balón aforado de 25 mL
Vasos de precipitados 100-150 mL
Agitador magnético
Centrífuga
Espectrofotómetro UV-visible
Celdas de cuarzo y de vidrio
Tubos de ensayo
Vórtex
Pipetas y micropipetas
Balones Kjeldahl
Destilador
Erlenmeyer de 125 mL

Reactivos

- Muestra de harina
- NaCl 1%
- Etanol 75%
- NaOH 0,1N
- Agua desmineralizada
- Solución patrón de proteína (caseína) de 1,0 y 5,0 mg/mL en NaCl 1%: Prepare 10 mL de solución patrón de 5 mg/mL: en un vaso de precipitados pese 50 mg de caseína, adicione una pequeña cantidad de NaCl 1% y con una varilla de vidrio trate de humectar formando una especie de pasta; agregue más solución de NaCl y continúe la disolución en esta forma sin agitar puesto que formaría gran cantidad de espuma. Pase la solución a un balón aforado y antes de completar el volumen adicione 2 o 3 gotas de solución diluida de NaOH (aproximadamente al 1%), para que la solución quede completamente transparente. En caso de que se haya formado espuma, añada 1 gota de alcohol isoamíli-

co. A partir de este patrón haga las diluciones necesarias para preparar 10 mL del patrón de 1 mg/mL.

- Reactivo de Biuret: En un matraz de 1 L disuelva 1,5 g de $CuSO_4.5H_2O$ y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada. Añada con agitación constante 300 mL de NaOH 10%, preparada recientemente y libre de carbonatos. Complete a volumen con agua destilada y almacene en botella oscura. La presencia de un precipitado rojo o negro indica que la solución se debe desechar.
- Reactivo de Bradford: Disuelva 100 mg de azul de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol de 95%. Adicione 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v) y diluya la solución resultante a 1 L. Filtre y guarde en frasco oscuro, a 4 °C. Nota: El reactivo Coomassie R-250, empleado como revelador para electroforesis, no sirve para preparar el reactivo de Bradford.
- Muestra de harina y fracciones proteicas
- Mezcla catalizadora Sysoev: Mezcle 25 g de K_2SO_4; 6,25 g de $CuSO_4$; 1,89 g de $KMnO_4$ y 0,125 g de selenio. Macere hasta obtener una mezcla homogénea.
- Solución acuosa de ácido bórico 4%
- H_2SO_4 concentrado
- NaOH 50%
- HCl 0,010 N valorado
- Indicador de Tashiro: Mezcle un volumen de rojo de metilo al 0,2% en etanol con 5 volúmenes de verde de bromocresol al 0,2% en etanol.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 7
Técnicas de análisis de proteínas

Objetivos

Fundamento teórico y reacciones

Método de Biuret

Método de Kjeldahl

Método de absorción en el UV

Método de Bradford

Tablas de datos y resultados

Tipo de harina empleada: _____

Método de Biuret:

Tabla 7.1 Curva de calibración

Anexar gráfica 7.1

Concentración del patrón _____

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7
Concentración (mg/mL)								
Abs								

Muestras	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Abs				
% proteína				

Muestra de cálculos:

Método de Kjeldahl

Determinación de proteína total:

Peso de la harina (mg) _____

Extracción de las fracciones proteicas:

Volumen total de cada fracción _____

Volumen de la alícuota analizada _____

Blanco de reactivos: Volumen de HCl _____

Muestra	Volumen de HCl	% Nitrógeno	% Proteína
Harina completa			
Albúminas			
Globulinas			
Prolaminas			
Glutelinas			

Muestra de cálculos:

a. Para la harina completa

b. Para una de las fracciones analizadas

Método de absorción en el UV

Tabla 7.2. Curva de calibración

Anexar gráfica 7.2

Concentración del patrón _____

Tubo	B	1	2	3	4	5	6
Concentración (mg/mL)							
Abs							

Muestras	**Dilución***	**Abs**	**% Proteína**
Albúminas			
Globulinas			
Prolaminas			
Glutelinas			

*Dilución del extracto final correspondiente a la medida de absorbancia.

Muestra de cálculos:

Método de Bradford:

Tabla 7.3. Curva de calibración

Anexar gráfica 7.3

Concentración del patrón _____

Tubo	B	1	2	3	4	5	6
Concentración (mg/mL)							
Abs							

Muestras	**Dilución***	**Abs**	**% Proteína**
Albúminas			
Globulinas			
Prolaminas			
Glutelinas			

*Dilución del extracto final al que corresponde la absorbancia.

Muestra de cálculos:

Discusión de resultados y conclusiones

Tabla 7.4 Resumen de resultados en la harina de _____

Muestra	Valor obtenido según método analítico				Valor citado en la literatura*
	Kjeldahl	Biuret	Bradford	UV	
Harina		ND	ND	ND	
Albúminas					
Globulinas					
Prolaminas					
Glutelinas					

ND, no determinado

*Referencias bibliográficas:

Respuestas al cuestionario

Práctica N° 8
Purificación de proteínas

Objetivos

Conocer y aprender los fundamentos de las técnicas que se emplean comúnmente para purificar proteínas y realizar la purificación de una de ellas (una lectina) por cromatografía de afinidad, comprobando la pureza por electroforesis y la actividad biológica mediante pruebas de aglutinación de eritrocitos.

La práctica comprende las siguientes actividades:

- Extracción de albúminas y globulinas a partir de harina de haba (*Vicia faba*) o de alverja (*Pisum sativum*)
- Precipitación de las globulinas con sulfato de amonio
- Purificación de la lectina por cromatografía de afinidad
- Verificación de la pureza por electroforesis
- Comprobación de la actividad de la lectina por prueba de hemaglutinación
- Empleo de la espectrofotometría UV como método de detección de proteínas.

Fundamento teórico

El haba es una leguminosa que se cultiva fácilmente en diferentes climas y que se consume como alimento en muchas regiones. Tiene alto valor de energía metabolizable (≈3000 cal/g) y un contenido de proteína de 20-30%. La calidad nutricional de las proteínas de haba es baja, principalmente por la deficiencia de aminoácidos azufrados y la presencia de sustancias antinutricionales.

La harina de haba contiene favina, una glicoproteína que posee actividad hemoaglutinante y mitogénica. Las proteínas que presentan esta actividad biológica característica se conocen con el nombre genérico de lectinas.

Las lectinas de origen animal se han estudiado en caracoles, huevos de pescado, babosas, esponjas, etc. Las de origen vegetal provienen en especial de leguminosas, aunque también se han encontrado en frutas, gramíneas y tubérculos.

Las lectinas que se han aislado y purificado presentan peso molecular entre 20.000 y 400.000 Da. La mayoría de ellas son glicoproteínas, en las que uno o más de los 15 carbohidratos presentes son monosacáridos.

La lectina de haba se detectó por primera vez en 1949. Es una glicoproteína que presenta tres subunidades con pesos moleculares de 9.000, 16.000 y 18.000 Da, determinados por electroforesis en SDS a pH 6,5. El peso molecular de la favina definido por difracción de rayos X y equilibrio de sedimentación varía entre 51.000 y 53.000 Da.

Por tratarse de proteínas, las lectinas son termolábiles. El calentamiento en determinadas condiciones destruye su acción específica y mejora el valor nutricional de las leguminosas.

La actividad biológica de las lectinas se detecta por su acción hemoaglutinante en soluciones salinas de eritrocitos. La capacidad de aglutinación puede ser influenciada por la presencia o ausencia de iones metálicos. En las lectinas de fríjol, lenteja, habichuela y concanavalina, los iones Ca^{+2} y Mn^{+2} son necesarios en su actividad hemoaglutinante.

Las lectinas tienen la propiedad de unirse a carbohidratos de estructura y configuración definidas. Estos carbohidratos intervienen en la constitución de glicoproteínas y glicolípidos de las membranas, los cuales son receptores celulares específicos. La unión de las lectinas a sus receptores celulares les confiere actividad biológica que consiste, entre otras, en la capacidad de aglutinar eritrocitos.

La lectina de alverja es un tetrámero de cerca de 50.000 Da formado por dos clases de subunidades: una grande, la subunidad β de 17.000 Da, y una pequeña, la subunidad α de 6.000 Da. Posee actividad mitogénica. Aunque la lectina de alverja no es glicosilada, su interacción es específica con manosa y glucosa.

La lectina de alverja se encuentra, además de la semilla, en la raíz, aunque en menor cantidad. La lectina de la raíz juega un papel importante en la fijación biológica de nitrógeno.

Separación de las proteínas

Las células contienen miles de proteínas diferentes. Para estudiar una proteína en particular es necesario separarla de todas las demás, purificarla, y luego determinar sus propiedades. Los métodos para separar proteínas se basan en sus diferencias en: solubilidad, tamaño, carga y actividad biológica.

Las fuentes de proteínas son las células o los tejidos, bien sea microorganismos o tejidos animales o vegetales. Si es necesario, se pueden separar fracciones subcelulares u organelas a través de centrifugación diferencial.

El primer paso en la purificación consiste en obtener una solución de las proteínas. Para lograrla, el material, sean células, organelas o tejidos, se debe romper para liberar las proteínas en el llamado extracto crudo. Es deseable realizar las operaciones a baja temperatura (0-4 °C), para reducir al mínimo la degradación de las proteínas por la acción de proteasas, que pueden estar presentes en la solución.

Debe recordarse que las proteínas son moléculas frágiles y por lo tanto hay que tener cuidado durante la purificación para asegurar que no se afecte su estructura nativa ni su actividad.

Métodos de ruptura de células

1. Homogenización: El tejido celular se corta con cuchillas giratorias.
2. Molienda: El tejido se desintegra por fricción contra un abrasivo, como arena, y de unas células con otras.
3. Ultrasonido: La estructura de las membranas celulares se afecta por acción de la energía de las ondas ultrasónicas. La intensidad y la duración del tratamiento se pueden controlar. Este método no afecta las organelas.
4. *Shock* osmótico: Las células se suspenden primero en una solución de alta concentración de soluto, o sea en una solución hipertónica, lo que hace que el agua migre hacia el exterior. Luego se transfieren a agua pura, o sea a una solución hipotónica: el agua entra rápidamente en las células y las hace explotar, produciendo lisis.
5. Alta presión: Células pequeñas, como bacterias, se pueden romper forzando una suspensión concentrada de ellas a pasar por un pequeño orificio bajo una presión alta, de varios miles de libras.
6. Acción de la lisozima: Esta enzima hidroliza los polisacáridos de la pared bacteriana.
7. Acción de detergentes: Estos compuestos solubilizan los componentes de la membrana y la desintegran.
8. Los procedimientos 1, 2 y 3 se usan generalmente para procesar tejidos animales y vegetales. En la lisis de células bacterianas, se prefieren los procedimientos 3, 4, 5 y 6. El objetivo en todos los casos es lograr la máxima ruptura y el mínimo daño a los componentes subcelulares.

Solubilidad de las proteínas

Las proteínas se clasifican de acuerdo con su solubilidad, según Osborne (1910), en los siguientes grupos:

- Albúminas: Son solubles en agua y en soluciones acuosas diluidas de sales. Se coagulan por acción del calor y precipitan de una solución acuosa

por adición de sulfato de amonio de 80-100% de saturación, que equivale a 22% de concentración. Se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos.

- Globulinas: Al igual que las albúminas, son solubles en soluciones acuosas diluidas de sales, pero, en contraste, son insolubles o escasamente solubles en agua desmineralizada.
  Las insolubles en agua se llaman euglobulinas o globulinas verdaderas, mientras que las que son escasamente solubles reciben el nombre de pseudoglobulinas. En términos de solubilidad, no es posible hacer una clara distinción entre las pseudoglobulinas y las albúminas.
  Alternativamente, las globulinas se han definido como proteínas que precipitan de una solución acuosa por adición de sulfato de amonio al 50% de saturación (11% de concentración).
  Las globulinas constituyen una clase importante de proteínas y se encuentran ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal.
- Prolaminas: Son insolubles en agua, pero se disuelven en soluciones acuosas de etanol, de 70-80%, y en soluciones acuosas de otros alcoholes de bajo peso molecular. Las prolaminas sólo se han encontrado en las plantas y tienen una distribución limitada.
- Glutelinas: Son insolubles en agua, en soluciones salinas diluidas y en soluciones alcohólicas. Se disuelven en soluciones diluidas de ácidos o bases, alrededor de 0,1 N. Estas proteínas sólo se encuentran en las plantas.
- Escleroproteínas: Son insolubles en la mayoría de los solventes comunes. Por lo general se localizan en el tejido conectivo, huesos, pelo, piel, lana, seda y similares. Los principales exponentes de este grupo son el colágeno y las queratinas.

La solubilidad de la mayoría de las proteínas se ve afectada por los siguientes factores:

- Fuerza iónica de la solución (μ): A fuerzas iónicas bajas las proteínas se solubilizan (*salting in*), mientras que a fuerzas iónicas altas se precipitan (*salting out*).
  En el primer caso, la presencia de los iones de sal estabiliza las cargas en la proteína e incrementa la solubilidad. En el segundo caso, hay una competencia entre las proteínas y los iones de la sal por el agua disponible para solvatarse: el resultado es que las moléculas de proteína no se solvatan completamente, las interacciones proteína-proteína se vuelven más importantes que las interacciones proteína-agua y ocurre precipitación.
  En general las sales de iones monovalentes, como NaCl, aumentan la solubilidad, mientras que las sales de iones divalentes, como sulfato de amonio, la disminuyen.
  La concentración de cualquier sal necesaria para causar la precipitación

de una proteína particular está relacionada con el número y distribución de cargas sobre la superficie de la proteína y con el número y la distribución de residuos hidrofóbicos expuestos. Por supuesto que el tamaño y la forma de la proteína también contribuyen a una mayor o menor facilidad de precipitación.

- pH: Cuando se grafica la solubilidad de las proteínas contra el pH, a fuerza iónica constante, se obtiene una curva en forma de U, con el mínimo cercano al punto isoeléctrico (pI). Este comportamiento se explica porque en el pI la carga neta de la proteína es cero y las repulsiones electrostáticas entre las moléculas son mínimas.
- Temperatura: El incremento de temperatura favorece la solubilidad de las proteínas, en el rango de 0-60 °C. A temperaturas superiores se produce desnaturalización de las proteínas y, por esta razón, ocurre precipitación, ya que los grupos hidrofóbicos que estaban en el interior de la molécula quedan expuestos al agua, medio en el que son poco solubles.
- Solventes orgánicos: Solventes como el etanol, metanol y acetona, que disminuyen la constante dieléctrica del agua, causan precipitación de las proteínas. En este caso, se disminuye la capacidad del solvente acuoso para solvatar los grupos cargados de las proteínas.

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Proteínas disueltas en buffer o contenidas en un extracto crudo pueden ser el material de partida. La concentración de proteínas usualmente debe estar entre 5 y 30 mg/mL. Las concentraciones altas favorecen la estabilidad de las proteínas y minimizan su desnaturalización.

Para obtener fracciones, se adiciona sulfato de amonio sólido a 0 °C, sobre hielo y con agitación, en cantidades crecientes para obtener la concentración final deseada. La mayoría de los fraccionamientos se pueden realizar a pH 7, pero se puede seleccionar otro valor de pH dependiendo de la proteína de interés.

Cuando todo el sulfato de amonio se ha disuelto, la mezcla se deja en reposo sobre hielo por 15 min y luego se centrifuga a 4 °C (10.000×g por 10 min o 3.000×g por 30 min). El sobrenadante se utiliza como material inicial para el siguiente fraccionamiento.

Se pueden obtener fracciones sucesivas con porcentajes de saturación de sulfato de amonio de 25, 40, 50, 60, 80 y 100%.

La solubilidad del sulfato de amonio varía poco en el rango de 0-30 °C, y una solución saturada en agua pura es aproximadamente 4 M. El sulfato de amonio que se utiliza debe ser suficientemente puro ya que la presencia de pequeñas cantidades de metales pesados, especialmente hierro, es inde-

seable pues puede afectar a algunas proteínas. En tal caso, antes de agregar sulfato de amonio se debe adicionar EDTA u otra sustancia que acompleje metales presentes en la solución.

Dado que la precipitación con sulfato de amonio es una técnica de uso frecuente en los laboratorios de bioquímica, comúnmente se utiliza una tabla en la que se ha calculado la cantidad, en gramos, de sulfato de amonio sólido que se debe agregar a 100 mL de la solución de proteína para lograr el porcentaje de saturación deseado. La tabla 8.1, que se incluye más adelante en la sección de Reactivos, está calculada en intervalos de 5%. Otros puntos se pueden interpolar a partir de estos valores.

Aunque el pH puede ser importante en la precipitación, en la mayoría de los casos las variaciones pequeñas del pH de un experimento a otro no tienen mayor efecto. Es aconsejable realizar la precipitación a pH neutro (pH 6,0-7,5). Ya que el sulfato de amonio tiene un ligero efecto acidificante, el buffer usado debe ser al menos 50 mM.

Los precipitados se disuelven en una cantidad pequeña del buffer apropiado y se hacen análisis de proteína y de actividad biológica. Cuando se completen los análisis para todas las fracciones, se construye una tabla con la cantidad total de proteína en la fracción, la actividad total y el porcentaje de rendimiento de proteína y de actividad, con respecto a los valores con los que se inició el fraccionamiento. Si se considera necesario se puede hacer un fraccionamiento más fino o pasar al siguiente procedimiento de purificación.

Precaución: Durante la solubilización del sulfato de amonio se debe controlar la agitación y mantener en el mínimo la formación de espuma, ya que esto puede promover la oxidación de la proteína (por ejemplo, de los grupos sulfihidrilo) y la desnaturalización en la superficie.

Eliminación del sulfato de amonio

La sal de las soluciones de proteínas se puede eliminar por diálisis o por filtración por gel. El soporte usado más comúnmente es Sephadex G-25, disponible en distintos tamaños de partícula, desde grueso hasta superfino. Las macromoléculas >5.000 Da son excluidas de los poros del gel, de modo que se desalinizan eficientemente. La remoción óptima de la sal se logra con volúmenes de muestra que no excedan 20-25% del volumen de la resina empacada en la columna. La columna se equilibra con el mismo buffer al que se va a transferir la muestra.

Para la diálisis se emplea una membrana semipermeable, con un rango definido de poro. La solución de proteína se transfiere a la membrana de diálisis, que debe tener una longitud suficiente para acomodar la muestra,

con un margen suficiente para un posible incremento de volumen durante la diálisis y para permitir el cierre apropiado en ambos extremos.

La bolsa de diálisis se sumerge en un erlenmeyer o un vaso de precipitados grande con el buffer de diálisis, y se mezcla continuamente con ayuda de un agitador magnético. El líquido de diálisis se debe cambiar periódicamente para acelerar el proceso. Según el volumen y la composición de la muestra, la diálisis se puede completar en 2-5 h. La relación entre el área de la membrana y el volumen de solución de proteína determina el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio. La diálisis termina cuando se obtiene una prueba negativa para sulfato en el agua o en el buffer de diálisis.

Cromatografía de afinidad

Es un tipo de cromatografía de adsorción en el que la molécula que va a ser purificada es adsorbida de manera reversible y específica sobre una sustancia complementaria (ligando) que está inmovilizada en un soporte insoluble (matriz): por ejemplo, una enzima puede interactuar con un análogo del sustrato inmovilizado, o una lectina inmovilizada puede hacerlo con los carbohidratos de una glicoproteína, o una proteína receptora con su ligando específico.

Para la elución de la proteína retenida es necesario romper o debilitar la interacción entre las proteína y el ligando, lo que se puede lograr variando la fuerza iónica y/o el pH. En otros casos es posible eluir la proteína por competencia con el ligando, agregando una concentración alta de este en solución.

Una resina de afinidad consta por lo general de tres componentes unidos covalentemente: la matriz insoluble, un espaciador, o brazo, y el ligando específico:

matriz – espaciador – ligando

1. Matriz insoluble: Como soportes se han utilizado: dextrano entrecruzado, poliacrilamida, polímeros de hidroxialquilmetacrilato, vidrio recubierto y sílice; pero con mucha frecuencia se utilizan matrices de agarosa al 4-6%, estabilizada por entrecruzamiento con epiclorhidrina, divinilsulfona o un bis-epóxido.
2. Espaciador: Si un ligando de bajo peso molecular se une directamente a la matriz, los efectos estéricos pueden reducir la interacción entre el ligando y la proteína. Para contrarrestar este efecto, se introduce un espaciador entre la matriz y el ligando. En general se emplea una cadena hidrocarbonada de 6-8 átomos de longitud, de modo que el ligando

queda a 5-10 Å de la matriz. Algunas veces se emplean espaciadores de hasta 17 átomos de carbono. Los espaciadores hidrocarbonados pueden interactuar hidrofóbicamente con ciertas macromoléculas y afectar su adsorción, por lo que a veces se prefieren espaciadores que tengan grupos hidrofílicos.

Cuando el ligando es una macromolécula, por ejemplo, una proteína, no es necesario incluir un espaciador: el ligando macromolecular se puede unir directamente a la matriz sólida.

3. Ligando: Cualquier molécula, pequeña o grande, que interactúe específicamente con la proteína que va a ser purificada es potencialmente útil en cromatografía de afinidad. Muchos ligandos, tales como análogos de sustratos de enzimas, lectinas o antígenos, interactuarán con una sola clase de proteína o en últimas con una variedad muy limitada de ellas.

   Para preparar un adsorbente de afinidad, el ligando escogido se hace reaccionar con un derivado de agarosa activado o con otro soporte sólido, o también con un derivado de agarosa que lleve el espaciador con un grupo terminal reactivo. En el comercio hay derivados de agarosa con y sin espaciadores.

Electroforesis

Es una técnica de separación que se basa en el movimiento de partículas con carga, principalmente de ácidos nucleicos y proteínas, en respuesta a un campo eléctrico. La velocidad de migración, o movilidad, depende de la fuerza del campo, de la carga neta, del tamaño y de la forma de las moléculas; también, de la fuerza iónica, la viscosidad y la temperatura del medio en que se mueven las moléculas. Como técnica analítica la electroforesis es simple, rápida y altamente sensible.

Una molécula de proteína en solución, a cualquier pH diferente de su punto isoeléctrico tiene carga. Esto hace que se desplace hacia el electrodo de polaridad opuesta cuando se aplica un campo eléctrico.

Si una molécula con carga q se encuentra en un campo eléctrico de fuerza x, la fuerza que causa la aceleración de la partícula es qx. Esta fuerza es contrarrestada por la resistencia friccional f, dando una velocidad total v:

$$qx = fv$$

Al aplicar las leyes de Stokes para una molécula esférica de radio r que se mueve a través de un medio de viscosidad η, se tiene que:

$$f = 6\pi\eta r$$

Entonces:

$$qx = 6\pi\eta rv$$

La movilidad electroforética μ de una molécula se define como la migración por unidad de campo de fuerza, así que:

$$\mu = v/x = q/6\pi\eta r$$

Por consiguiente, la movilidad de una molécula es proporcional a la carga, pero inversamente proporcional al tamaño y a la viscosidad del medio.

La carga depende principalmente de los grupos ionizables presentes en la superficie de la partícula y, a su vez, la carga de estos depende del pH y de la fuerza iónica del medio, por lo tanto la separación óptima de las moléculas se logra seleccionando cuidadosamente las condiciones más apropiadas de pH y fuerza iónica.

Soportes para electroforesis

Generalmente la muestra se aplica y se separa sobre un soporte, que puede ser, por ejemplo, papel, acetato de celulosa, gel de almidón, gel de agarosa o gel de poliacrilamida. Los dos últimos son los más utilizados.

Como los poros de los geles de agarosa son grandes, se emplean para separar macromoléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas grandes y complejos proteicos. La agarosa es un polisacárido altamente purificado derivado del agar. Viene en forma de polvo que se disuelve en agua en ebullición. Permanece en estado líquido hasta que la temperatura baja a unos 40 °C, donde gelifica. El gel es estable pero frágil, ya que es un hidrocoloide.

El tamaño del poro puede predeterminarse ajustando la concentración de agarosa en el gel: a mayor concentración, menor el tamaño del poro. Las concentraciones de trabajo están por lo general en el rango de 0,4-2% p/v. Los geles de poliacrilamida son más rígidos que los de agarosa. Para formar el gel, los monómeros de acrilamida polimerizan en largas cadenas que se unen covalentemente a un agente de entrecruzamiento, que es en realidad el responsable de mantener junta la estructura. La molécula de entrecruzamiento más común es N,N'-metilen-bis-acrilamida.

La polimerización se logra por un método fotoquímico o químico. De este último tipo el más común es el empleo de persulfato de amonio y una amina cuaternaria, la N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina, o TEMED, que sirven como iniciador y catalizador respectivamente.

En el método fotoquímico se emplean riboflavina y TEMED. La reacción se inicia iluminando el gel con luz ultravioleta de onda corta.

El tamaño del poro del gel puede variarse, dependiendo de la concentración del monómero presente en la solución. Las proteínas pueden separarse convenientemente en acrilamida 7,5%, pero moléculas más grandes, como el rRNA, requieren un gel más poroso de acrilamida, al 2,5%.

El tamaño del poro puede controlarse con exactitud y en forma reproducible a través de la concentración total de acrilamida (T) y el grado de entrecruzamiento (C), dados como porcentajes :

$$\%T = \frac{(a+b)\times 100}{V} \qquad \%C = \frac{b\times 100}{a+b}$$

Donde: a, masa de acrilamida en gramos; b, masa de metilen-bis-acrilamida en gramos y V, volumen en mililitros.

Cuando C permanece constante y T se incrementa, el tamaño del poro disminuye. Cuando T permanece constante y C se incrementa, el tamaño del poro sigue una función parabólica: a altos y bajos valores de C los poros son grandes, con el poro mínimo a un C de 4%.

Determinación de proteínas por absorción en el ultravioleta

En los procedimientos de extracción y purificación de proteínas se requiere disponer de un método para detectar su presencia y para cuantificarlas. Dentro de los métodos disponibles uno de los más simples se basa en la medida de la absorbancia a 280 nm, en la región ultravioleta del espectro.

La fenilalanina, la tirosina y el triptófano tienen cadenas laterales aromáticas que absorben la luz ultravioleta. A pH neutro, la tirosina y el triptófano absorben la luz UV a 280 nm, en tanto que la fenilalanina es casi transparente a 280 nm, pero absorbe débilmente a 260 nm. Como la mayor parte de las proteínas contienen tirosina y/o triptófano, la absorbancia de las soluciones a 280 nm se utiliza en forma rutinaria para estimar la concentración de proteínas.

Procedimiento experimental

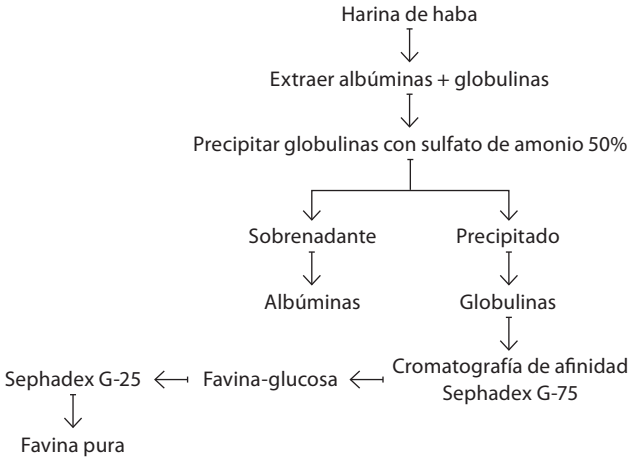


Figura 8.1 Esquema del procedimiento.

Experimentos

Extracción de proteínas

El extracto se debe preparar con anticipación. En un erlenmeyer coloque 10 g de harina de haba o de alverja finamente molida y adicione 30 mL de NaCl 1%; agite vigorosamente durante 3-5 h o toda la noche con agitador mecánico o magnético. Centrifugue a 4.000 rpm durante 10 min a baja temperatura (4 °C), para obtener un sobrenadante claro. Descarte el residuo.

Ajuste el pH del extracto de proteínas a 4,65 usando el potenciómetro y mida el volumen total del extracto. Este extracto, que es llamado extracto crudo, contiene albúminas y globulinas y se debe mantener sobre hielo o en nevera.

El extracto crudo se emplea en la práctica para medir el contenido de proteína inicial, realizar la precipitación con sulfato de amonio y purificar la lectina, para finalmente hacer con ella pruebas de aglutinación y electroforesis.

Precipitación de globulinas con sulfato de amonio

En un vaso de precipitados coloque 10 mL del extracto crudo de proteínas y agregue lentamente sulfato de amonio sólido, finamente molido, en la cantidad necesaria para lograr una concentración final del 50%. Utilice la tabla 8.1 para determinar el peso de sal sólida necesaria. Disuelva la sal antes de hacer una nueva adición, evitando la formación de espuma.

Deje en reposo, sobre hielo, durante 15 min. Centrifugue 10 min a 4.000 rpm y a baja temperatura (4 °C). El precipitado contiene las globulinas y el sobrenadante, las albúminas.

Determine en el sobrenadante el contenido de proteína y hágale pruebas de aglutinación y electroforesis.

Redisuelva el precipitado en NaCl 1% y complete en balón volumétrico a 25 mL. Reserve 2 mL para determinar el contenido de proteína, hacer pruebas de aglutinación y electroforesis.

Purificación de la lectina por cromatografía de afinidad

Como soporte se emplea Sephadex G-75, un polímero de glucosa que usualmente funciona como tamiz molecular, para separar proteínas por tamaño. En esta práctica se emplea el Sephadex como resina de afinidad, ya que las lectinas de haba o de alverja son proteínas que reconocen los residuos de glucosa ligándose específicamente a ellos. O sea que en este caso el adsorbente no tiene un espaciador ni otro ligando diferente a la glucosa que forma el polímero.

Preparación de la columna

El Sephadex previamente hinchado con agua, aproximadamente 15 mL, se empaca en la columna (20 cm x 2 cm) de tal manera que no queden burbujas de aire. La resina debe tener apariencia homogénea y estar húmeda en todo momento. Una vez empacada, la columna se equilibra haciendo pasar NaCl 1% en cantidad igual a dos veces el volumen de la resina.

Aplicación de la solución de globulinas

Cierre la salida inferior de la columna. Retire con una pipeta Pasteur la solución de NaCl que está por encima del lecho del gel y aplique 10 mL de la solución de globulinas contra las paredes de la columna, sin perturbar la superficie del gel. Abra el conducto inferior, para que la muestra entre en el gel. Luego agregue 5 mL de solución de NaCl 1%, lavando las paredes de la columna y deje bajar el líquido hasta que quede a ras sobre la superficie del gel. A continuación, llene toda la columna con solución de NaCl 1%, para proceder a la elución. Ajuste el flujo a 1 mL/min y recoja fracciones de 3 mL, en total 20 fracciones. Con el NaCl 1% deben eluir todas las proteínas no retenidas, que constituyen las impurezas con las que está mezclada la lectina.

Haga el seguimiento de la elución de proteínas mediante la lectura de la absorbancia (Abs) en el ultravioleta (280 nm) de cada una de las fracciones recolectadas. Guarde el tubo con la mayor Abs para hacer las pruebas de aglutinación y la electroforesis de las proteínas no retenidas.

Una vez eluidas las proteínas no retenidas, cuando la Abs sea cero, cambie el eluyente por NaCl 1%-glucosa 5%. Es conveniente dejar entrar 10 mL del eluyente, recoger las fracciones y cerrar la columna por 10 min para lograr la competencia por la lectina entre la glucosa del Sephadex y la del eluyente.

Continúe recogiendo el eluyente hasta completar 15 fracciones. Haga nuevamente lecturas de Abs a 280 nm para establecer dónde eluye la lectina, la única proteína retenida en la columna.

Reúna las fracciones que contienen la lectina-glucosa y guárdelas para hacer prueba de electroforesis y aglutinación, previa eliminación de la glucosa, como se indica más adelante.

Al terminar el procedimiento lave la columna, pasando NaCl 1% hasta fin de glucosa. Luego desempaque la columna y guarde el gel, el Sephadex G-75, en la nevera en NaCl 1% con azida de sodio (NaN_3) para evitar que crezcan hongos. El recipiente debe estar debidamente rotulado y cerrado.

Eliminación de la glucosa unida a la lectina

La favina eluida de la columna de Sephadex G-75 está unida a glucosa, que le inhibe su capacidad de aglutinación. Esta glucosa debe eliminarse en una columna de Sephadex G-25, equilibrada con NaCl 1%. Aplique la solución de lectina-glucosa, obtenida en el paso anterior, y eluya con NaCl 1%, recogiendo de 8 a 10 fracciones de 2 mL. Haga lecturas de Abs a 280 nm para determinar en qué tubos eluye la lectina libre de glucosa.

Estas fracciones de lectina pura se reservan para hacer pruebas de aglutinación y electroforesis.

Ensayos de aglutinación

Preparación de la suspensión de eritrocitos

En una centrífuga clínica, centrifugue durante 5 min una muestra de sangre humana fresca, recogida con anticoagulante (EDTA u oxalato), con el fin de separar los eritrocitos y el plasma.

Lave los eritrocitos 3 veces con solución de NaCl RA 1%, invirtiendo el tubo con cuidado para evitar la lisis de las células, para eliminar la glucosa que normalmente está presente en la sangre. Centrifugue entonces hasta obtener un sobrenadante transparente. Luego prepare 5 mL de una suspensión de eritrocitos al 4% (v/v) en la misma solución salina.

Observación importante: El uso de NaCl comercial que contiene yodo causa ruptura de los eritrocitos (hemólisis); lo mismo ocurre si los eritrocitos se suspenden en agua.

Ensayos de aglutinación

Los ensayos de aglutinación se realizan con: extracto crudo de proteínas, fracción de albúminas, fracción de globulinas, proteínas no retenidas, lectina unida a glucosa y lectina pura, empleando una caja de microtiter para aglutinación.

Tome 1 gota de la muestra de proteína, agregue 1 gota de NaCl 1% y 2 gotas de suspensión de eritrocitos y deje en reposo por 1-2 h. La formación de aglutinados se observa directamente por comparación con el control.

El control o blanco se prepara simultáneamente mezclando 2 gotas de NaCl 1% y 2 gotas de suspensión de eritrocitos.

Ensayos de aglutinación en presencia de azúcares

La prueba de aglutinación para la lectina pura se hace en presencia de fructosa, sacarosa, galactosa y lactosa en solución al 5%. Tome 1 gota de lectina pura, 1 gota del azúcar y 2 gotas de suspensión de eritrocitos. Haga un blanco para cada azúcar con 1 gota de NaCl, 1 gota del azúcar respectivo y 2 gotas de suspensión de eritrocitos. Deje en reposo 1-2 h y observe la formación de aglutinados.

Electroforesis

Se realiza en una cámara de electroforesis vertical (EC120 Mini-vertical gel system, Thermo Electron Corp.).

Prepare el gel entre dos placas de vidrio, limpias y secas, mezclando los reactivos necesarios en las cantidades descritas en la preparación de reactivos. Entre los vidrios coloque los separadores, sujete los vidrios con pinzas y séllelos en la parte inferior con agar caliente al 4%.
Vierta la solución para formar el gel entre los vidrios, cuidando de que no se formen burbujas. Coloque arriba “el peine” para que se formen los pozos en donde se aplicarán las muestras. Luego deje polimerizar durante 2 h.

Terminado el proceso de gelificación, remueva con cuidado el peine. Coloque los vidrios en la cámara, teniendo la precaución de colocar el vidrio más corto en contacto con el buffer.

Llene los tanques superior e inferior con buffer Tris-glicina pH 8,3. Si quedan burbujas remuévalas con una pipeta. Usando una jeringa o una micropipeta aplique las muestras en cada uno de los pozos y también una proteína patrón. (A las mismas muestras se les hace la prueba de aglutinación.)

Conecte los electrodos a la fuente de poder: el cátodo en el tanque superior y el ánodo en el tanque inferior. Las proteínas y el gel tienen pH alcalino, por lo tanto las proteínas tendrán carga negativa y se moverán hacia el

ánodo al hacer pasar la corriente generada por la fuente de poder.

Inicie la corrida a 100 V mientras las muestras entran al gel. Luego continúela a 150 V. Cuando el colorante azul de bromofenol se acerque al extremo inferior del gel apague la fuente de poder y desconecte los electrodos.

Desensamble los vidrios y colque el gel en la solución de azul de Coomassie para fijar y teñir las proteínas, agitándolo suavemente. La tinción se logra en unos 30 min. Cuando aparezcan las bandas sobre el gel, páselo a la solución de lavado para retirarle el exceso de colorante.

Determinación de proteínas por absorción en el ultravioleta

Prepare una curva de calibración, empleando como patrón una solución de albúmina de huevo o de caseína con 5 mg/mL, y lea los valores de Abs a 280 nm.

Tubo	B	1	2	3	4	5	6
Patrón (mL)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
NaCl 1% (mL)	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8

En esta curva de calibración se interpolan los valores de Abs obtenidos para las diferentes muestras, en las que se debe estimar el contenido de proteína.

Cálculos y resultados

Presente un informe de sus resultados, según el formato que aparece al final de la práctica.

Incluya el peso de la proteína extraída, de las albúminas, las globulinas y la lectina, cada uno en miligramos y en porcentaje.

Anexe la fotocopia o diagrama del gel de electroforesis de las proteínas.

Haga las siguientes tablas:

- Tabla 8.1. Curva de calibración para la determinación de proteínas por absorción en el UV: concentración del patrón (mg/mL), absorbancia
- Tablas 8.2a y b. Perfiles de elución de (a) proteínas no retenidas y (b) de la lectina: fracciones de elución, absorbancia
- Tablas 8.3a y b. Tabla de resultados de las pruebas de aglutinación de eritrocitos con (a) distintas fracciones proteicas del haba y la lectina pura y (b) con la lectina pura en presencia de azúcares: fracción proteica, presencia o no de aglutinación

Haga las siguientes gráficas:

- Gráfica 8.1. Curva de calibración para la determinación de proteínas por absorción en el UV: Abs 280 nm vs. concentración del patrón de proteína, ver tabla 8.1.
- Gráfica 8.2. Perfiles de elución de la cromatografía de afinidad de las proteínas no retenidas y de la lectina: Abs 280 nm vs. fracciones de elución, ver tablas 8.2a y 8.2b.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la función del azul de bromofenol y del glicerol o la sacarosa en la electroforesis?
2. ¿Qué utilidad tiene hacer la electroforesis en presencia del detergente SDS (dodecilsulfato de sodio) y en presencia de 2-mercaptoetanol?
3. ¿Qué es isoelectroenfoque?
4. ¿Cómo se extraen las proteínas de membrana?
5. ¿Cúal es la diferencia entre suero y plasma?
6. ¿Qué sucede si los eritrocitos se suspenden en agua en lugar de NaCl 1%?
7. ¿Por qué en presencia de algunos azúcares se inhibe la aglutinación, mientras que con otros no se observa este efecto?
8. ¿Qué estudios *in vivo* e *in vitro* soportan la posible actividad antitumoral de las lectinas y cuál es el mecanismo que se postula para explicarla?

Referencias bibliográficas

Anzola, D.G. 1983. Efecto de hidrólisis parciales sobre la actividad fitohemoaglutinante de la favina. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Allen, A., R. Desai. y A. Neuberger. 1976. The purification of the glycoprotein lectin from the broad bean (*Vicia faba*) and a comparison of its properties with lectins of similar specificity. *Biochemichal Journal* 155: 127-135.

Andrews, A.T. 1995. *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications.* 2ª ed. Oxford: Clarendon Press. pp. 24, 37, 241.

Asensio, E. 1975. Estudio comparativo de la actividad hemoaglutinante de algunas leguminosas colombianas. Purificación y caracterización de la hemaglutinina del haba (*Vicia faba*). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Castillo-Villanueva. A. y F. Abdullaev. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica* 57(1): 55-64.

Goyoaga, J.C. 2005. Estudio de factores no nutritivos en Vicia faba: influencia de la germinación sobre su valor nutritivo. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Hemperly, J., T. Hopp, J. Becker *et al*. 1979. The chemical characterization of favin, a lectin isolated from Vicia faba. *Journal of Biological Chemistry* 254(14): 6803.

Jandera, P. y J. Churacek. 1985. *Gradient elution in column liquid chromatography. Theory and practice.* Journal of Chromatography Library, vol. 31. Amsterdam: Elsevier Science Ltd.

Luque, E. 1997. Comparación de las lectinas extraídas de la semilla y la raíz de arveja. *Revista Colombiana de Química* 26(1): 51-57.

Maldonado, C.E. 1982. Estudio comparativo de lectinas presentes en semillas y raíces de algunas leguminosas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Mathews, K., K.E. van Holde y K.G Ahern. 2010. *Bioquímica*. 3ª ed. España: Pearson, Addison Wesley. pp. 166-170.

Navarro, Y. y G. Pérez. 1990. Comparación de algunas propiedades de las lectinas de semilla y de raíz de haba (Vicia faba). *Revista Colombiana de Química* 19(1).

Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4ª ed. Nueva York: W.H. Freeman and Co. pp. 89-96.

Osborne, T.B. 1910. Die Pflanzenproteine. *Ergebnisse Physiologie* 10: 47-215.

Scopes, R.K. 1994. *Protein purification. Principles and practice*. 3ª ed. Nueva York: Springer-Verlag. pp. 187-204.

Sierra, A. 1997. Extracción, purificación y caracterización parcial de las lectinas presentes en la semilla de Dioclea sericea. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Van Damme, E.J.M., W.J. Peumans, A. Pusztai *et al*. 1998. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. Chichester, UK: John Wiley and Sons. p. 452.

Vega, N., H. Murcia y G. Pérez. 2009. Caracterización de IGYS anti-lectina de Salvia bogotensis y su aplicación en estudios citoquímicos para la detección del antígeno TN. *Revista Colombiana de Química* 38(2): 363-375.

Materiales y reactivos

Materiales

Nota importante: Cada estudiante debe traer el día de la práctica una jeringa pequeña (3-5 mL).

Cuantificación de proteínas

Espectrofotómetro UV
Celdas de cuarzo

Extracción de proteínas
Agitador magnético o mecánico
Centrífuga
pHmetro
Vaso de precipitados

Precipitación de proteínas
Mortero
Vaso de precipitados
Baño de hielo
Centrífuga
Balón aforado 25 mL

Cromatografia de afinidad
Columna de vidrio 2 cm × 20 cm
Pipetas Pasteur
Tubos de ensayo
Gradillas

Eliminación de la glucosa unida a la lectina
Columna de vidrio
Tubos de ensayo
Gradillas

Electroforesis
Aparato de electroforesis, fuente de poder
Micropipetas
Caja de microtiter para aglutinación

Reactivos

- Albúmina de huevo o caseína 5 mg/mL
- Harina de haba o de alverja
- Sangre fresca
- Sephadex G-25
- Sephadex G-75
- Persulfato de potasio o de amonio
- TEMED
- Sacarosa o glicerol
- Azul de Coomassie R-250
- Metanol
- Ácido sulfosalicílico
- Sulfato de amonio sólido, finamente molido
- NaCl 1%

- NaCl 1% RA
- HCl 1 M
- NaOH 1 M
- Ácido acético al 7% en agua
- NaCl 1%-glucosa 5%
- Acrilamida al 29,1%
- Bis-acrilamida al 0,9%
- Azul de bromofenol al 20% en agua
- Buffer Tris-HCl 1 M, pH 8,8
- Buffer Tris-glicina, pH 8,3
- Agar al 4% en agua (disuelva en caliente)
- Solución de monómeros: Pese 14,55 g de acrilamida y 0,45 g de bisacrilamida, disuelva en agua y complete a 50 mL. Guarde en frasco oscuro en la nevera.
  Nota: Los monómeros son neurotóxicos y cancerígenos. Se debe evitar su contacto con la piel. Use guantes para la preparación y manejo de este reactivo.
- Solución de tinción: a) Disuelva 0,2 g de azul de Coomassie R-250 en 33 mL de metanol. b) Disuelva 4,5 g de ácido 5-sulfosalicílico y 15 g de ácido tricloroacético en 100 mL de agua destilada. Disuelva a) en b).
- Solución de lavado: Ácido acético al 7% en agua.
- Buffer Tris-HCl 1 M, pH 8,8: Disuelva 12,11 g de Tris (base) en 90 mL de agua destilada. Agregue 5 mL de HCl 6 N. Ajuste el pH a 8,8. Complete a 100 mL. Guarde en la nevera.
- Buffer Tris-glicina pH 8,3: Disuelva 1,4 g de glicina, 0,3 g de Tris (base). Ajuste el pH, complete con agua destilada a 100 mL y guarde en la nevera.
- Preparación de un gel plano para electroforesis: Agua 3,62 mL, Tris-HCl 3,75 mL, monómeros 2,75 mL, persulfato de amonio 25 mg y TEMED 20 μL. Este último reactivo se agrega al final, sólo en el momento de aplicar la solución entre los vidrios.
- Preparación de la muestra para electroforesis: Debe contener aproximadamente 1 mg de proteína/mL. En un tubo Eppendorf mezcle: 30 μL de muestra, 12 μL de buffer Tris-HCl, 2 gotas de glicerol o unos cristales de sacarosa y un cristal de azul de bromofenol. Aplique en cada pozo 20 μl, que contengan como mínimo 8 μg de proteína. De igual manera prepare un patrón de albúmina, de similar concentración.
- Solución de azúcares al 5% en NaCl 1%: Prepare 5 mL de cada azúcar (fructosa, sacarosa, galactosa y lactosa) y guarde en el congelador.

% de saturación inicial de $(NH_4)_2SO_4$ a 0 °C	% de saturación final $(NH_4)_2SO_4$ a 0 °C																
	20	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**	**60**	**65**	**70**	**75**	**80**	**85**	**90**	**95**	**100**
	Sulfato de amonio sólido (g) que se deben adicionar para preparar 100 mL de solución																
0,0	10,7	13,6	16,6	19,7	22,9	26,2	29,5	33,1	36,6	40,4	44,2	48,3	52,3	56,7	61,1	65,9	70,7
5,0	8,0	10,9	13,9	16,8	20,0	23,2	26,6	30,0	33,6	37,3	41,1	45,0	49,1	53,3	57,8	62,4	67,1
10,0	5,4	8,2	11,1	14,1	17,1	20,3	23,6	27,0	30,5	34,2	37,9	41,8	45,8	50,0	54,4	58,9	63,6
15,0	2,6	5,5	8,3	11,3	14,3	17,4	20,7	24,0	27,5	31,0	34,8	38,6	42,6	46,6	51,0	55,5	60,0
20,0	0,0	2,7	5,6	8,4	11,5	14,5	17,7	21,0	24,4	28,0	31,6	35,4	39,2	43,3	47,6	51,9	56,5
25,0		0,0	2,7	5,7	8,5	11,7	14,8	18,2	21,4	24,8	28,4	32,1	36,0	40,1	44,2	48,5	52,9
30,0			0,0	2,8	5,7	8,7	11,9	15,0	18,4	21,7	25,3	28,9	32,8	36,7	40,8	45,1	49,5
35,0				0,0	2,8	5,8	8,8	12,0	15,3	18,7	22,1	25,8	29,5	33,4	37,4	41,6	45,9
40,0					0,0	2,9	5,9	9,0	12,2	15,5	19,0	22,5	26,2	30,0	34,0	38,1	42,4
45,0						0,0	2,9	6,0	9,1	12,5	15,8	19,3	22,9	26,7	30,6	34,7	38,8
50,0							0,0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,3	27,2	31,2	35,3
55,0								0,0	3,0	6,2	9,4	12,9	16,3	20,0	23,8	27,7	31,7
60,0									0,0	3,1	6,3	9,6	13,1	16,6	20,4	24,2	28,3
65,0										0,0	3,1	6,4	9,8	13,4	17,0	20,8	24,7
70,0											0,0	3,2	6,6	10,0	13,6	17,3	21,2
75,0												0,0	3,2	6,7	10,2	13,9	17,6
80,0													0,0	3,3	6,8	10,4	14,1
85,0														0,0	3,4	6,9	10,6
90,0															0,0	3,4	7,1
95,0																0,0	3,5
100,0																	0,0

Fuente: Dawson, R.M., D.E. Elliot, W.H. Elliot *et al.* 1987. *Data for biochemical research.* 3ª ed. Oxford: Clarendon Press.

Tabla 8.1 Corrección de un porcentaje dado de saturación de una solución de $(NH_4)_2SO_4$ por adición de un peso determinado de la sal sólida.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias – Departamento de Química
Curso de Bioquímica para la carrera de Química
Código 2015585

Alumnos _____ Código _____

_____ Código _____

Fecha de realización de la práctica _____

Informe. Práctica N° 8
Purificación de proteínas

Objetivos

Fundamento teórico

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Cromatografía de afinidad

Electroforesis

Pruebas de aglutinación

Tablas de datos y resultados

Determinación de proteínas por absorción en UV

Tabla 8.1. Curva de calibración para la determinación de proteínas

Anexar gráfica 8.1

Concentración del patrón _____

Tipo y peso de la harina de _____

Volumen del extracto de albúminas + globulinas (extracto crudo) _____

Volumen del sobrenadante (albúminas) _____

Contenido de albúminas _____ Contenido de globulinas _____

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	Proteína total*	Albúminas*	Globulinas*
Concentración (mg/mL)										
Abs 280 nm										

*Escriba la dilución del extracto que corresponde a la Abs registrada en la tabla

Cromatografía de afinidad

Anexar gráfica 8.2

Volumen de la muestra de globulinas aplicada _____

Columna _____ cm × _____ cm

Resina _____ Volumen empacado _____

Eluyente _____ Velocidad de flujo _____

Tabla 8.2a. Perfil de elución de proteínas no retenidas

Fracción N°	Abs 280 nm	Fracción N°	Abs 280 nm	Fracción N°	Abs 280 nm
1		11		21	
2		12		22	
3		13		23	
4		14		24	
5		15		25	
6		16		26	
7		17		27	
8		18		28	
9		19		29	
10		20		30	

Tabla 8.2b. Perfil de elución de la lectina

Eluyente _____ Velocidad de flujo _____

Fracción N°	Abs 280 nm	Fracción N°	Abs 280 nm
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Eliminación de la glucosa unida a la lectina

Columna _____ cm × _____ cm

Resina _____ Volumen empacado _____

Volumen de muestra _____ Eluyente _____

Velocidad de flujo _____

Fracción N°	Abs 280 nm	Fracción N°	Abs 280 nm
1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5		10	

Pruebas de aglutinación

Tabla 8.3a. Pruebas de aglutinación con fracciones proteicas y lectina pura

Muestra	Blanco	Extracto crudo	Albúminas	Globulinas	Proteínas no retenidas	Lectina-glucosa	Lectina pura
Resultado							

Tabla 8.3b. Pruebas de aglutinación con lectina pura en presencia de azúcares

Muestra	Blanco	Fructosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa
Resultado					

Electroforesis

Anexar el gel o una fotocopia de éste.

Discusión de resultados y conclusiones

Respuestas al cuestionario

Guías de laboratorio de Bioquímica para la carrera de Química,
editado por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia,
fue compuesto en caracteres Adobe Garamond Pro y Myriad Pro, y se utilizó
papel Bond de 90 grs. Se acabó de imprimir en agosto de 2013, en los talleres
de Xpress Estudio Gráfico y Digital S.A., Bogotá, Colombia.