UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS TECNOLOGIA E INGENIERIA

GUÍA COMPONENTE PRÁCTICO

201103 – BIOQUÍMICA

GOLDA MEYER TORRES VARGAS
(Director Nacional)

ALBERTO GARCÍA JEREZ
Acreditador

DUITAMA
JULIO DE 2013

1. ASPECTOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL Y VERSIONAMIENTO

El presente material en primera instancia fue diseñado por el Ingeniero Rubén Darío Munera en el 2008, quien en ese entonces era el director de curso, era y es tutor de la UNAD Cead Palmira. El ingeniero Rubén Munera recopilo además las guías de laboratorio que están contenidas en el material impreso de la Unisur "Bioquímica" de Gerardo Pérez y Yolanda Navarro publicado en 1992.

Este material ha tenido tres actualizaciones, la primera en el 2008 el Ingeniero Rubén Darío Munera, la segunda en el 2009 r y la tercera en agosto de 2010 por Q.A de alimentos Golda Meyer Torres, tutor de la UNAD del Cead de Duitama, y quien se desempeña actualmente como directora del curso.

El proceso de revisión de estilo del material y aportes disciplinares, didácticos y pedagógicos en el proceso de acreditación de material didáctico desarrollado en el mes de JULIO de 2009, ENERO y AGOSTO de 2010 se hizo por parte del Biólogo Alberto García, tutor del Cead de Bucaramanga y se mantiene la vigencia para el 2011.En el mes de Julio de 2013 se hace un ajuste y actualización en el número de horas, número de prácticas, calificación y contenido de las prácticas de laboratorio.

2. INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
CARACTERÍSTICAS GENERALES	6
PRÁCTICA No. 1: METODOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE AMINOÁCIDOS Y PROTEINAS	9
PRÁCTICA No. 2: FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS Y CEREALES POR SOLUBILIDAD	22
PRACTICA No. 3 – ENSAYOS ENZIMATICOS CUALITATIVOS –ESTUDIO CINÉTICO DE LA UREASA	32
PRACTICA No. 4- HIDRÓLISIS DE POLSACARIDOS, MÉTODO DEL REACTIVO 3,5-DINITROSALICILATO	53
PRÁCTICA No. 5 - RECONOCIMIENTO DEL GLUCOGENO	61
PRACTICA No. 6- RECONOCIMIENTO CUALITATIVO DE LIPIDOS	69
NOTAS	76
7. FUENTES DOCUMENTALES	81

3. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 reactivos práctica 1. 12

Tabla 2: Marcha de la práctica 1. 19

Tabla 3: Rúbrica de la práctica 1. 21

Tabla 4: reactivos práctica 2 25

Tabla 5: batería de tubos método Biuret para la cuantificación de proteínas 27

Tabla 6: batería de tubos método Folin Lowry para la cuantificación de proteínas. 29

Tabla 7: presentación de resultados práctica 2. 29

Tabla 8: Rúbrica de la práctica 2. 31

Tabla 9: reactivos práctica 3 35

Tabla 10: Marcha de la práctica 3. 38

Tabla 11: Marcha de la práctica 3 alfa- amilasa. 40

Tabla 12: batería de tubos efecto de la concentración, alfa-amilasa. 41

Tabla 13: batería de tubos efecto del pH, alfa-amilasa 42

Tabla 14: batería de tubos efecto de la temperatura, alfa-amilasa. 43

Tabla 15: baterías de tubos pH óptimo de la ureasa tubos blanco 46

Tabla 16: baterías de tubos pH óptimo de la ureasa, tubos problema 46

Tabla 17: resultados pH óptimo de la ureasa, tubos problema 47

Tabla 18: baterías de tubos variación concentración de sustrato, tubos problema 48

Tabla 19: expresión de resultados variación concentración de sustrato 49

Tabla 20: baterías de tubos variación de la temperatura 50

Tabla 21: baterías de tubos extracción de ureasa de leguminosas 51

Tabla 22: Rúbrica de la práctica 3. 52

Tabla 23: reactivos de la práctica 4. 55

Tabla 24: baterías de tubos cuantificación de glucosa DNS hidrólisis química. 57

Tabla 25: baterías de tubos cuantificación de glucosa DNS hidrólisis enzimática. 58

Tabla 26: Rúbrica de la práctica 4. 60

Tabla 26: reactivos de la práctica 5. 63

Tabla 27: Marcha de la práctica extracción de glicógeno. 67

Tabla 28: Rúbrica de la práctica 5. 68

Tabla 29: reactivos práctica 6 71

Tabla 30: Rúbrica de la práctica 6 75

4. LISTADO DE GRÁFICOS Y FIGURAS

Figura 1: fraccionamiento de proteínas en semillas de leguminosas y cereales por solubilidad **26**

5. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Introducción	Uno de los cursos fundamentales es la Bioquímica el cual permite comprender los mecanismos de formación y transformación de los nutrientes que componen un determinado alimento. La presente guía de prácticas de laboratorio contiene una serie de experimentos básicos que complementan los conceptos fundamentales. El trabajo de laboratorio utiliza como materiales de experimentación, materias primas de uso común como harinas de cereales y leguminosas, féculas, frutas y verduras, tejidos de origen animal, que ayudan al estudiante a asimilar las técnicas de uso común en la investigación bioquímica con fuentes alimenticias o potencialmente alimenticias. La investigación no es completa sino se divulgan los resultados obtenidos en la experiencia. Es importante que el estudiante aprenda la forma de reportar sus datos y a saber interpretar las conclusiones obtenidas por otros investigadores, con el fin de evaluar su propia investigación. Esto hace necesario que elabore un informe donde presente sus datos, resultados y conclusiones obtenidos durante el trabajo experimental. En esta guía de prácticas de laboratorio, se presentan 6 sesiones. Para el porcentaje dentro del 100% del curso equivalen al 30%, de las cuales las prácticas del 1 a la 6 tienen una ponderación de acuerdo a la complejidad de la guía.
Justificación	Un curso de bioquímica sin experiencia práctica es un curso incompleto, sólo con el desarrollo de laboratorios, los estudiantes asimilan los complejos conceptos que encierra una bioquímica general. EL desarrollo de los laboratorios, conlleva a los estudiantes adquirir competencias académicas al argumentar en los análisis de resultados, al interpretar los resultados y a proponer aplicación de dichas experiencias en los contextos regionales.
Intencionalidades formativas	**PROPÓSITOS** Reconocer mediante el uso de reacciones coloreadas y cualitativas la presencia de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos, como constituyentes de las biomoléculas. Cuantificar fracciones proteicas y glúcidos mediante las técnicas de análisis instrumental, volumétrico y gravimétrico. Interpretar los resultados obtenidos en cada observación para argumentar los resultados en el análisis de resultados y proponer posibles aplicaciones en los

contextos regionales.

Reconocer a las biomoléculas como unidades fundamentales y su importancia en los diferentes procesos metabólicos

Complementar con cada práctica los conceptos fundamentales de las 45 lecciones del módulo.

OBJETIVOS

Que el estudiante reconozca mediante el uso de reacciones coloreadas y cualitativas la presencia de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos, como constituyentes de las biomoléculas.

Que el estudiante cuantifique fracciones proteicas y glúcidos mediante las técnicas de análisis instrumental, volumétrico y gravimétrico.

Que el estudiante interprete los resultados obtenidos en cada observación para argumentar los resultados en el análisis de resultados y proponer posibles aplicaciones en los contextos regionales.

Que el estudiante reconozca a las biomoléculas como unidades fundamentales y su importancia en los diferentes procesos metabólicos

Que el estudiante complemente con cada práctica los conceptos fundamentales de las 45 lecciones del módulo.

COMPETENCIAS

El estudiante reconoce mediante el uso de reacciones coloreadas y cualitativas la presencia de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos, como constituyentes de las biomoléculas.

El estudiante cuantifica fracciones proteicas y glúcidos mediante las técnicas de análisis instrumental, volumétrico y gravimétrico.

El estudiante interpreta los resultados obtenidos en cada observación para argumentar los resultados en el análisis de resultados y proponer posibles aplicaciones en los contextos regionales.

El estudiante reconoce las biomoléculas como unidades fundamentales y su importancia en los diferentes procesos metabólicos.

METAS

El estudiante presentará y sustentará un informe personal (pre informe) y un trabajo grupal (informe de laboratorio) como resultado del estudio, aplicación y análisis sistemático del desarrollo de cada práctica de laboratorio, presentando un análisis

	de resultados utilizando un lenguaje amplio relacionado con la temática. El estudiante describirá a las diferentes biomoléculas identificadas en las pruebas cualitativas cuantitativas. El estudiante resolverá los cuestionarios planteados en cada una de las prácticas de laboratorio. El estudiante aprenderá el manejo de las principales técnicas bioquímicas generales para la identificación de biomoléculas.
Denominación de practicas	1. Práctica 1. Métodos cualitativos para la identificación de aminoácidos y proteínas. 2. Práctica 2: fraccionamiento de proteínas en semillas de leguminosas y cereales por solubilidad. 3. Se Unen en una sola la práctica 3 y 4: Ensayos enzimáticos cualitativos y estudio cinético de la ureasa. 4. Hidrólisis de polisacáridos, método del reactivo 3,5-Dinitrosalisilico. 5. Reconocimiento del glucógeno 6. Reconocimiento cualitativo de lípidos.
Número de horas	18 H Práctica 1: 2 H 16% Práctica 2: 3 H 17% Práctica 3: 4 H 17% Práctica 4: 4 H 17% Práctica 5: 3 H 16% Práctica 6: 3 H 17%
Porcentaje	30% (100 puntos)
Curso Evaluado por proyecto	**SI___ NO_x_**
Seguridad industrial	El trabajo en el laboratorio requiere la observación de una serie de normas de seguridad que eviten posibles accidentes debido al desconocimiento de lo que se está haciendo. Es necesario que al comienzo de cada práctica se revise el reglamento de laboratorio y los documentos sobre el manejo de sustancias peligrosas.

6. DESCRIPCIÓN DE PRÁCTICAS

PRACTICA No. 1: METODOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS

<table>
<tr><td>Tipo de practica</td><td><table>
<tr><td>Presencial</td><td>X</td><td>Autodirigida</td><td></td><td>Remota</td><td></td></tr>
<tr><td>Otra ¿Cuál</td><td colspan="5"></td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Porcentaje de evaluación</td><td>16%</td></tr>
<tr><td>Horas de la practica</td><td>2 H</td></tr>
<tr><td>Temáticas de la práctica</td><td>Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el capítulo 1, aminoácidos y capítulo 2, péptidos y proteínas.</td></tr>
<tr><td>Intencionalidades formativas</td><td>Propósitos

Reconocer a los aminoácidos como unidades estructurales de las proteínas y su importancia en los diferentes procesos metabólicos.

Analizar, mediante reacciones cualitativas coloreadas la presencia de aminoácidos y enlaces peptídicos en las muestras.

Establecer relaciones entre la estructura y la función de las proteinas y pérdida de esta al variar su pH y solubilidad (precipitación y desnaturalización).

Objetivos

Que el estudiante reconozca los aminoácidos como unidades estructurales de las proteínas.
Que el estudiante analice, mediante reacciones cualitativas coloreadas la presencia de aminoácidos y enlaces peptídicos en las muestras.

Que el estudiante establezca la relación entre la estructura y la función de las proteinas y pérdida de esta al variar su pH y solubilidad (precipitación y desnaturalización).

COMPETENCIAS

El estudiante describe y analiza de manera eficiente los resultados observados en cada prueba cualitativa y relaciona el marco teórico y los resultados para dar el respectivo análisis.

El estudiante conceptualiza en forma precisa la relación que tiene cada prueba y la estructura de aminoácidos y proteínas.

El estudiante comunica los conocimientos adquiridos a a través de la</td></tr>
</table>

	elaboración de informes escritos. **Metas** Al finalizar la práctica #1: El estudiante obtendrá su calificación del respectivo pre informe personal como resultado del estudio independiente. El estudiante resolverá los respectivos cuestionarios dados. El estudiante presentará en forma escrita el informe del respectivo laboratorio en forma grupal en donde sobresalga el análisis de resultados.

Fundamentación Teórica

El estudiante como parte de su autogestión en el desarrollo de su aprendizaje autónomo, se servirá investigar antes de la práctica y a manera de **pre informe** los siguientes temas:

1. Capítulo 1 y 2 de la Unidad 1: Biomoléculas del módulo del curso, enfatizando en: Clasificación de aminoácidos, Enlace peptídico, Niveles de estructuración, Solubilidad de proteínas: desnaturalización por calor y pH extremos. Precipitación por metales pesados, Precipitación acídica

2. Pruebas cualitativas: enfatizar en las reacciones químicas que tienen lugar y el principio del método: Reacción de la ninhidrina, Reacción xantoproteica, Reacción de millón, Reacción del ácido glioxílico, Prueba de Pauly, Prueba del Nitroprusiato, Reacción de Sakaguchi prueba de Biuret.

Bibliografía de Consulta:

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Voet, V. (2004). Bioquímica, tercera edición. Montevideo, Uruguay.: Editorial Médica panamericana. Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Campbell, M. Farrell, S. (2003). Bioquímica. México. Thomson Editores. Cuarta Edición.

Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.

Descripción de la practica:

En esta práctica mediante pruebas coloreadas, se identifica los aminoácidos que componen las proteínas de los extractos utilizados basados en las reacciones de los grupos R ó cadena lateral. Se desarrolla pruebas para analizar el comportamiento y la solubilidad de proteínas en tratamientos de precipitación y desnaturalización.

Estas prácticas corresponde a los temas que se tratan en la Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el

capítulo 1, aminoácidos y capítulo 2, péptidos y proteínas.

Es de vital importancia para los estudiantes de la formación profesional y técnica de los programas de ingeniería de alimentos, agroforestal, agronómica, zootecnia, producción animal y regentes de farmacia, el desarrollo de estas prácticas, ya que profundizan y analizan la relación e importancia que guardan los aminoácidos y la función biológica de las proteinas en los tejidos biológicos.

Recursos a utilizar en la práctica (Equipos / instrumentos)

Material de vidrio	Material biológico y otros (estudiantes)	Reactivos	Equipos
Tubos de ensayo	Alimento de origen vegetal o animal: concentrados, proteína cárnica, hígado, huevo, etc.	Reactivo de millón	Estufas (5)
gradillas	tapabocas	Agua destilada, Solución de CuSO4 1%	pHmetro (1)
espátulas	Libros de bioquímica	Solución NaOH 30% y 40%, Solución saturada de NaCl	Centrifuga
Pipetas 1, 5 y 10 ml	Marcador de vidrio	HNO3 concentrado, Cristales de sacarosa	Balanza analítica
Mallas de asbesto	Cinta para rotular	HCl concentrado, Acido tricloracetico 10%	Termómetros 120 ºC
Papel filtro	Cuaderno de laboratorio	Solución ácido pícrico saturada, Etanol 95%	mecheros
Embudos	Bata blanca	Solución de **(**NH4SO4) al 50%, acetona	
Agitador de vidrio	Marcador para vidrio	Solución de acetato de plomo 0.5 %	
Erlenmeyers 100 y 250 ml		Reactivo de sakaguchi, Ácido acético glacial	
Vasos de precipitado 250 ml		HSO4 concentrado, Acido acético al 30%	
Vasos precipitado 500 ml		Aminoácidos: glicina, tirosina, triptófano, aminoácidos azufrados, leucina	
Probeta 100 ml		Ninhidrina (2 g/l) prepárese en fresco, Hidróxido de amonio.	
Pinzas para tubos en madera		Ácido sulfanilico (10 g/l en solución de HCl 1 mol/l).	
Vidrios reloj grandes		Nitrito de sodio, Carbonato de sodio	
Mortero con mango		Acetato de plomo, Nitrato de mercurio.	
Soporte para embudos		Nitroprusiato de sodio (20 g/l, prepárese fresco).	
Pinzas para tubos de ensayo metálicas		Alfa- naftol, Agua d Tabla 4: reactivos práctica 2.e bromo	
Vasos de		Ácido fosfórico, Molibdato de sodio	

Tabla 1 reactivos práctica 1.

Software a utilizar en la práctica u otro tipo de requerimiento para el desarrollo de la práctica

No hay un software recomendado.

Como complemento a la fundamentación teórica, se recomienda revisar la presentación de objeto virtual:

Video Tutorial. Dar clic en los archivos Index html. Descargarlo en:

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/Parte%201_%20proteinas.zip

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/Parte%202_proteinas.zip
Objeto de Aprendizaje (OA): pruebas cualitativas para determinar aminoácidos y proteínas partes 1 y 2.

Ubicación: Aula Virtual del Curso.

Seguridad Industrial

	REACTIVO	PROTECCION	RIESGO	
	Ácidos inorgánicos concentrados.	Gafas de seguridad, tapabocas. Lo que estipula el reglamento de laboratorio.		

Metodología

Conocimiento previo para el desarrollo de la práctica:

Se requiere que el estudiante tenga conocimiento de las temáticas de la Unidad 1: Capítulo 1 y 2 del módulo del curso.

Forma de trabajo: Estimado estudiante a continuación encontrará los pasos a seguir para el desarrollo de la práctica #1 del curso.

La metodología es la siguiente:

Preinforme:

1. Observe los siguientes recursos dando Clic sobre el enlace:

Presentación aminoácidos.

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/Presentaci%C3%B3nAminoacidos.ppsx

Pruebas cualitativas de aminoácidos parte 1:

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/Parte%201_%20proteinas.zip

Pruebas cualitativas de aminoácidos parte 2:

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/Parte%202_proteinas.zip

Dar clic en los archivos Index html.

2. Desarrolle el siguiente taller (después de revisar el punto 1) y entréguelo a su tutor de laboratorio en formato Word (no se debe evidenciar copias tácitas de internet) ó a mano alzada.

3. Defina aminoácido: Que grupos funcionales están presentes en los aminoácidos? Cómo ellos están relacionados con las propiedades ácido básicas.

1. Algunos autores clasifican los aminoácidos de varias formas, por ejemplo, en esenciales y no esenciales, en alifáticos y aromáticos, o quizá la más acertada; de acuerdo a la polaridad, presencia de cargas y composición química de la cadena lateral "R" de los aminoácidos. De un argumento válido de ésta última clasificación en dónde se explique el porqué de esta.

2. Qué implicaciones tiene la Cadena lateral de los aminoácidos en sus propiedades químicas y en los métodos de identificación en el laboratorio?

3. En este laboratorio, Usted va a identificar algunos aminoácidos que están dentro de la composición de un tejido biológico. Explique brevemente, que pruebas usaría para identificar los siguientes aminoácidos y porque?:

   Tirosina, Fenilalanina, Aminoácidos aromáticos, Triptófano, Metionina y cisteína, Grupos aminos libres.

4. Que es el enlace peptídico, represéntelo. ¿qué prueba usa en el laboratorio para identificarlos? ¿en qué se fundamenta?

5. Que es un proteína

6. Complete el siguiente cuadro, relacionada con proteínas

Niveles de estructuración que puede tener una proteína	Clasificación de las proteínas según su solubilidad

7. Cuál es la diferencia de precipitar y desnaturalizar una proteína.

8. Elabore el diagrama de flujo de la marcha de la práctica y tablas de resultados en blanco.

Trabajo grupal

En grupo de trabajo (máximo 4 estudiantes), todos los estudiantes realizan la práctica #1 de laboratorio, para ello previamente deben identificar los materiales que se requiere. Tenga presente que el desempeño individual como grupal, serán tenidos en cuenta en la rúbrica de evaluación del informe de laboratorio.

Producto a entregar:

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Procedimiento:

1. Pruebas Cualitativas

1. 1 Obtención de los Extractos:

-En el caso de alimentos en polvo, coloque unos 30 gramos en un vaso de precipitado, agregue 100 ml de agua destilada, agite durante 10 minutos y filtre a través de tela limpia. Conserve el líquido (filtrado) para las pruebas de las proteínas.

-En el caso de los alimentos concentrados ó sólidos, muélala o macérelas por separado y recoja el molido en vasos de precipitado. Agregue 100 ml de agua destilada, agite durante 10 minutos y filtra a través de tela. Recoja los filtrados en vasos de precipitado o en Erlenmeyers previamente marcados. Deseche los residuos.

-En el caso de la solución de clara de huevo: Haga un pequeño orificio en uno de los extremos del huevo y vierta por él la clara en un vaso precipitado, dejando dentro la yema. Luego agregue a la clara 100 ml de agua destilada y agite con el fin de disolverla.

Marcha de la práctica parte 1:

prueba	procedimiento en un tubo de ensayo colocar:	cantidad a adicionar:	Anote aquí el resultado Obtenido.	Realice aquí apuntes importantes para el análisis de resultados.
Biuret	extracto problema	2 ml		
	NaOH al 30% (cuidado, provoca quemaduras).	2 ml		
	Mezclar e ir añadiendo gota a gota el sulfato cúprico al 1% (CuSO4), agitando después de cada adición, hasta la aparición de un color violeta, azul o amarillo. El color violeta indica la reacción positiva.			
millón	extracto problema	2 ml		
	Reactivo de millón	0.5 ml		
	Llevar a baño de agua hirviendo por 5min.Un color rojo oscuro es resultado positivo.			

xantoproteica	extracto problema	2 ml		
	HNO_3 concentrado por las paredes del tubo, (cuidado, provoca quemaduras).	1m		
	Mezclar bien, calentar a la baño maría y observar un color amarillo claro. Adicionar solución de NaOH al 40% lentamente sin agitar y observar un naranja intenso como resultado positivo.	2 ml		
Lieberman	extracto problema	2 ml		
	Cristales de sacarosa	Una pizca		
	HCl concentrado, (cuidado, provoca quemaduras).	5 ml		
	Calentar a en baño de agua hirviendo por 5 a 7 min. Un color rojo intenso, es prueba positiva.			
Grupos SH	extracto problema	1 ml		
	Hidróxido de sodio al 40 % (NaOH), (cuidado, provoca quemaduras).	1ml		
	Acetato de Plomo al 0.5 %	1 ml		
	Mezclar bien, calentar a baño de agua hirviendo por 4 min, un precipitado negro es prueba positiva.			
sakachi	extracto problema	2 ml		
	Reactivo de sakaguchi	0.5 ml		
	Mezcla bien y observar.			
reacción del ácido glioxílico	extracto problema	2 ml		
	Ácido acético glacial, (cuidado, provoca irritación en piel y fosas nasales).	2 ml		

	H_2SO_4 concentrado, (cuidado, provoca quemaduras). Dejar caer lentamente por las paredes del tubo inclinado, hasta que se formen dos capas. NO AGITE. Observe el cambio de color en la interfase. Si se forma un anillo violeta en la interfase de los dos líquidos, la reacción se considera positiva	2 ml		
reacción de la ninhidrina	Extracto problema, ajustar pH a 7.0	1 ml		
	Solución de ninhidrina, hervir a baño maría por 2 min. Observar coloración violeta o morado intenso.	1 ml		
prueba de Pauly	Acido sulfanílico	1 ml		
	Extracto problema	2 ml		
	Enfriar en hielo			
	Agregar solución de $NaNO_2$ y dejar enfriar por 3 min.	1 ml		
	Adicionar Na_2CO_3. Anotar colores formados.	2ml		
prueba del Nitroprusiato	Solución de nitroprusiato de sodio	0.5 ml		
	Mezclar con el extracto problema	2 ml		
	Adicionar Hidróxido de amonio (cuidado, provoca quemaduras y es irritante para piel y fosas nasales), deje reposar por 5 min.	0. 5 ml		

Marcha de la práctica parte 2:

prueba	procedimiento en un tubo de ensayo colocar:	cantidad a adicionar:	Anote aquí el resultado Obtenido.	Realice aquí apuntes importantes para el análisis de resultados.
Precipitación acídica	extracto problema	2 ml		
	ácido pícrico saturado	1 ml		
	Agite y observe la formación precipitado (enturbamiento)			
Precipitación acídica	extracto problema	2 ml		
	ácido acético al 30%	0.5 ml		
	Agite y observe la formación precipitado (enturbamiento)			
	Solución saturada de Cloruro de sodio (NaCl)	1 ml		
	Mezclar bien y calentar a la llama por 1 min. se presenta un enturbamiento más o menos intenso que persiste al enfriamiento, también puede observarse pequeños grumos en las paredes del tubo. Observe el tubo sobre un fondo oscuro.			
precipitación acídica	extracto problema	2ml		
	ácido tricloroacetico al 10%	2 ml		
	Agite y observe la formación precipitado (enturbamiento)			
Solventes orgánicos	extracto problema	2ml		
	Etanol al 95%.	2 ml		
	Observe la formación de precipitado (enturbamiento)			
Solventes orgánicos	extracto problema	2ml		
	Acetona	2 ml		
	Observe la formación de precipitado (enturbamiento)			

Sulfato de amonio	extracto problema	2ml		
	Solución de Sulfato de amonio al 50 %	2 ml		
	Mezclar bien. Dejar en reposo durante 10 min. Observe si se forma un Precipitado. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 10 min., observar. La reacción positiva se manifiesta por la formación de un precipitado, dependiendo directamente de la concentración de albúmina presente en la muestra.			
Desnaturalización por calor	extracto problema	2ml		
	Caliente en agua hirviendo durante 10 minutos asegurándose que la temperatura interna llegue a los 95 – 100ºC. Observe la formación de precipitado (enturbamiento).			
Metales pesados	Extracto problema	2 ml		
	Gotas del metal	5 gotas		
	Calentar suavemente a baño maría si no observa reacción inmediata.			

Tabla 2: Marcha de la práctica 1.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

1. Cuáles son los fundamentos químicos de las pruebas estudiadas para el reconocimiento de aminoácidos. En esta parte Usted tiene que analizar el fundamento teórico de la prueba y el resultado obtenido (de donde se obtiene el color obtenido, que indica cada prueba?.

2. Qué relación química tiene la cadena R de los aminoácidos y las pruebas realizadas?.

2. Explique con argumentos válidos el comportamiento observado de las proteinas en cada una de las pruebas de precipitación. Que indica la presencia de precipitado?

3. Determine mediante graficas el extracto que más pruebas positivas obtuvo y analice esta situación.

Sistema de Evaluación

Evaluación individual:

- cada estudiante debe presentar en forma escrita lo solicitado en el preinforme.
- Asistencia, desempeño y desenvolvimiento durante la sesión de laboratorio

Evaluación grupal:

- el grupo de trabajo debe presentar un informe de laboratorio en la fecha acordada por el tutor. (ver la descripción de "producto a entregar".

Informe o productos a entregar

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.
- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Rúbrica de evaluación

Ítem Evaluado	Valoración Baja	Valoración Media	Valoración Alta	Máximo Puntaje
Asistió y participó activamente del desarrollo de la práctica	El estudiante no asistió. **(Puntos = 0)**	El estudiante asistió pero su desempeño no fue en la habilidad del trabajo en grupo y desempeño de la práctica no fu excelente. **(Puntos =1.0)**	El estudiante participó de manera pertinente con la actividad durante el desarrollo del laboratorio **(Puntos = 3.2)**	3.2
Entrega del debido pre informe o presenta el debido quiz.	No hay entrega de los productos solicitados **(Puntos = 0)**.	Hay entrega de los productos solicitados pero su contenido no es pertinente. **(Puntos = 1.0)**	Hay entrega de los productos solicitados y contenido es pertinente. **(Puntos =3.2)**	3.2
Estructura del Informe escrito (¿tiene lo solicitado?, tiene normas APA?). Forma de la sustentación (tiene lo solicitado?).	El informe no presenta una excelente estructura. **(Puntos = 0)**	Aunque el informe presenta una estructura base, la misma carece de algunos elementos del cuerpo solicitado. **(Puntos = 1.0)**	El informe presenta una excelente estructura y presentación. **(Puntos =3.0)**	3.0
Profundidad y análisis del informe y/o sustentación.	El informe no da respuesta a los lineamientos de las prácticas de laboratorio. **(Puntos = 0)**	Aunque presenta resultados y análisis de resultados estos no son pertinentes. Se evidencia la ausencia de análisis y deducción. **(Puntos =3.0)**	El informe presenta una excelente articulación entre los resultados y el análisis de resultados. Se evidencia la profundidad de los análisis. **(Puntos = 6.6)**	6.6
TOTAL DE PUNTOS POSIBLES				**16**

Tabla 3: Rúbrica de la práctica 1.

Nota: La puntuación anterior esta pondera de acuerdo a: 6 sesiones de laboratorio/100 puntos= 16,6666. Se debe hacer la siguiente conversión para dar la calificación en escala de 0.0-5.0: puntos obtenidos*5.0/16

Retroalimentación

El tutor de la práctica tendrá diez (10) días hábiles para envía o entregar la respectiva retroalimentación del informe de laboratorio siguiendo lo estipulado en la rúbrica de evaluación.

PRACTICA No. 2 – FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS Y CEREALES POR SOLUBILIDAD [1]

Tipo de practica	Presencial **X** | Autodirigida | Remota
Porcentaje de evaluación	**17%**
Horas de la practica	**3 H**
Temáticas de la práctica	Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el capítulo 2, péptidos y proteínas, lección 10: Clasificación y Propiedades Fisicoquímicas.
Intencionalidades formativas	**Propósitos** Comprobar la teoría con la práctica en relación al comportamiento según la solubilidad de proteínas. Obtener las fracciones de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas a partir de tejidos biológicos. Calcular mediante espectrofotometría, la concentración de proteinas en cada una de las fracciones anteriores. **Objetivos** Que el estudiante compruebe la teoría con la práctica en relación al comportamiento según la solubilidad de proteínas. Que el estudiante obtenga las fracciones de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas a partir de tejidos biológicos. Que el estudiante calcule mediante espectrofotometría, la concentración de proteinas en cada una de las fracciones anteriores. **COMPETENCIAS** El estudiante describe y analiza de manera eficiente los resultados del fraccionamiento de proteínas con cada uno de los solventes utilizados. El estudiante conceptualiza en forma precisa la relación que tiene cada fracción de proteína y el solvente usado. El estudiante comunica los conocimientos adquiridos a través de la elaboración de informes escritos.

[1] Pérez, G. Navarro, Y. (1992). Bioquímica. Santa Fe de Bogotá DC: Unisur.

	Metas Al finalizar la práctica #2: El estudiante obtendrá su calificación del respectivo pre informe personal como resultado del estudio independiente. El estudiante resolverá los respectivos cuestionarios dados. El estudiante presentará en forma escrita el informe del respectivo laboratorio en forma grupal en donde sobresalga el análisis de resultados.

Fundamentación Teórica

El estudiante como parte de su autogestión en el desarrollo de su aprendizaje autónomo, se servirá investigar antes de la práctica y a manera de **actividad formativa** los siguientes temas, enfatizando en la reacciones químicas que tienen lugar y el principio del método:

1. Solubilidad y precipitación de las proteínas
2. Clasificación de Osborne de las proteínas, por el criterio de solubilidad
3. Métodos cuantitativos para la determinación de proteínas (Biuret, Folin- Lowry, Bradford).

Nota: algunas de las temáticas las encuentra en el módulo del curso.

Como fuentes documentales consulte:

Pérez, G. (1992). Ciclo de krebs. En G. Pérez, *BIOQUIMICA* (pág. 163). Bogotá DC: Unisur.

Rodney, B. (1999). El ciclo del ácido cítrico. En B. Rodney, *Conceptos de Bioquímica* (págs. 489-494). México: International Thomson Editores S.A de C.V.

Rawn, J (2005). Bioquímica. Madrid: Interamericana-McGraw_Hill.

Descripción de la practica

En esta práctica mediante prueba cuantitativa, se identifica y se calcula la extracción fraccionada de los componentes proteínicos de las semillas de leguminosas y cereales, utilizando para ello la diferencia de solubilidades de los diferentes tipos de proteínas.

Cuantificar cada una de las fracciones obtenidas utilizando el método de Folin- Lowry ó Biuret.

Se desarrolla pruebas para analizar el comportamiento y la solubilidad de proteínas en tratamientos de precipitación y desnaturalización salina.

Esta práctica corresponde a los temas que se tratan en la Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el

capítulo 2, péptidos y proteínas, lección 10: Clasificación y Propiedades Fisicoquímicas.

Es de vital importancia para los estudiantes de la formación profesional y técnica de los programas de ingeniería de alimentos, agroforestal, agronómica, zootecnia, producción animal y regentes de farmacia, el desarrollo de esta práctica, ya que identifican a partir de un tejido vegetal los diferentes tipos de proteínas de acuerdo a su solubilidad y analizar a partir de ello, la relación que guarda dicho comportamiento y su función biológica.

Recursos a utilizar en la práctica (Equipos / instrumentos)

Material de vidrio	Material biológico y otros (estudiantes)	Reactivos	Equipos
Tubos de ensayo	Harinas de diferentes cereales y leguminosas: soya, arveja, trigo y frijol.	Reactivo de folin.	Estufas (5)
gradillas	tapabocas	Solución de sulfato de cobre –tartrato sódico de potasio (5g/l de CuSO4.5H2O en tartrato sódico potásico 10 g/l).	Espectrofotómetro
espátulas	Libros de bioquímica	Carbonato de sodio en NaOH 0.1 mol/l.	Centrifuga
Pipetas 1, 5 y 10 ml	Marcador de vidrio	NaCl al 1%,	Balanza analítica
Balones aforados de 25 ml	Cinta para rotular	Etanol al 75%,	
Vasos de precipitado de 1000 ml plástico	Cuaderno de laboratorio	NaOH 0.1 N,	
Vasos de precipitado de 600 plástico	Bata blanca	Solución patrón de albúmina de huevo de concentración conocida. (0.25 mg/ml).	
Agitador de vidrio	Marcador para vidrio	Reactivo de Biuret.	
Erlenmeyers 100 y 250 ml			
Vasos de precipitado 250 ml			
Vasos precipitado 500 ml			
Probeta 100 ml			

Vidrios reloj grandes			

Tabla 4: reactivos práctica 2.

Software a utilizar en la practica

No hay un software recomendado.

Como complemento a la fundamentación teórica, se recomienda revisar :

Documento tutorial sobre el procedimiento de obtención del a ecuación de la recta a partir de la curva patrón de BSA (método de 2. Método de Folín- lowry).

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/ORIENTACIONES%20%20PARA%20EL%20DESARROLLO%20EJERCICIO%20FRACCIONES.pdf

Se recomienda observar el siguiente video sobre el uso del espectrofotómetro u otro material multimedia semejante:

http://www.youtube.com/watch?v=4KU8eqcjNeQ

Seguridad Industrial

Las situaciones o eventos de peligrosidad se pueden presentar en el manejo del reactivo de Folin, se recomienda usar guantes, tapabocas y gafas de seguridad.

Metodología

Conocimiento previo para el desarrollo de la práctica.

Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el capítulo 2, péptidos y proteínas, lección 10: Clasificación y Propiedades Fisicoquímicas. Métodos cuantitativos para la determinación de proteínas (Biuret, Folin-Lowry, Bradford).

Forma de trabajo: Estimado estudiante a continuación encontrará los pasos a seguir para el desarrollo de la práctica #2 del curso.

La metodología es la siguiente:

Quiz de laboratorio individual #1:

En esta práctica **no** hay preinforme, en su lugar el estudiante se prepara para un Quiz escrito.

La temática a evaluar es: Modulo: Lección 10: Clasificación y Propiedades Fisicoquímicas 10.1 Clasificación de proteínas (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas).

El contenido y forma de pregunta queda a disposición del tutor asignado de los laboratorios del curso.

Trabajo grupal

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Procedimiento: Preparación de la muestra

Pesar 2.0 g de muestra (en cada caso será una de las harinas de: arveja, soya, fríjol, haba, trigo, cebada, etc.); pasarla a un tubo de ensayo, agregar 10 ml de H2O desmineralizada, agitar manualmente durante 10 minutos y centrifugar la suspensión a 2500 rpm por 3 minutos. Vaciar el sobrenadante a un balón aforado de 25 ml. Al residuo agregar de nuevo otros 10 ml de H2O desmineralizada y repetir exactamente el proceso anterior.

Después de centrifugar, el sobrenadante de esta segunda extracción se adiciona al balón que contiene al primer sobrenadante. Se completa su volumen a 25 ml con H2O desmineralizada hasta el enrase. Así se tiene separada la fracción de las albúminas:

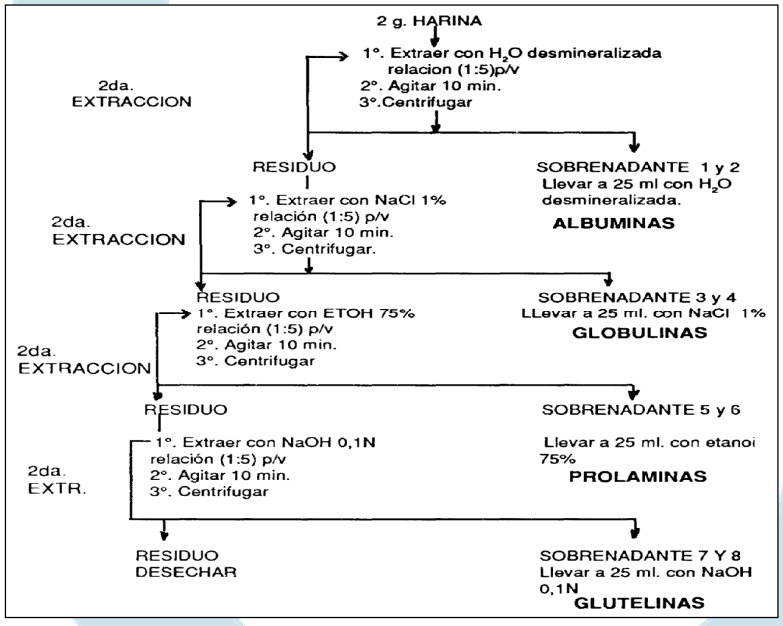


figura 1: fraccionamiento de proteínas en semillas de leguminosas y cereales por solubilidad

Sobre el residuo que queda de la separación de las albúminas, se repite ahora todo el proceso anterior, pero agregando esta vez NaCl al 1%. Después de centrifugar, los sobrenadantes de la primera y segunda extracción con NaCl al 1%, se llevan a otro balón aforado de 25 ml y se completa hasta el enrase con el mismo NaCl al 1%. Esta es la fracción de las globulinas.

Sobre el residuo anterior se extrae en idéntica forma la fracción de las prolaminas, usando esta vez alcohol etílico al 75% y una temperatura de extracción cercana a 60°C.

Por último sobre el mismo residuo, con la adición de solución de NaOH 0.1 N y aplicando el mismo procedimiento general, se separa la fracción de las glutelinas.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

1. **Método de Biuret :**

Sobre cada uno de los extractos que contienen las diferentes fracciones cada grupo procederá a la determinación de proteínas, aplicando el método de Biuret. La curva de calibración se hará utilizando como patrón una solución de albúmina de huevo de concentración conocida.

Para las muestras de soya, arveja y fríjol, de las fracciones de albúminas y glutelinas deberá tomarse para cada una y por aparte, una alícuota de 0,5 ml y llevarse a un volumen de 5 ml (dilución 1 a 10) con agua desmineralizada para las albúminas y con NaOH 0,1 N para las glutelinas. Estas diluciones se usarán como extractos problemas para dichas fracciones.

En 15 tubos de ensayo rotulados pipetear en c/u las cantidades de reactivos que se indican en el siguiente cuadro.

Condiciones	**Tubos**														
	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sol. patrón albumina, ml	––	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.2	—	—	—	—	—	—	—	—
Fracción albuminas, ml	––	—	––	—	—	—	—	0.5	1.0	—	—	—	—	—	—
Fracción globulinas, ml	––	—	––	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	—	—	—	—
Fracción prolaminas, ml	––	—	––	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	—	—
Fracción glutelinas, ml	––	—	––	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0
H_2O destilada, ml	2	1.9	1.7	1.5	1.3	1.1	0.8	1.5	1.0	1.5	1.0	1.5	1.0	1.5	1.0
Reactivo de Biuret en todos los tubos: 4 ml															

Tabla 5: batería de tubos método Biuret para la cuantificación de proteínas

Mezclar bien y dejar en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente o introducir los tubos en un baño de agua a 30°C durante 10 minutos para desarrollo del color. Leer en cada tubo porcentaje de transmitancia a 540 nm usando el tubo B para ajustar el 100% de transmitancia.

Cálculos y resultados

Consultar tablas de conversión para pasar porcentajes de transmitancia a los correspondientes valores de absorbancia o calcúlelos utilizando la fórmula:

A = 2 - log (%T)

Trazar en papel milimetrado la gráfica de calibración (absorbancia en ordenadas vs. concentración (mg/ml) en abcisas) e interpolar las Absorbancias de los tubos problemas; proceder, teniendo en cuenta las diluciones de cada caso, a calcular los porcentajes de cada fracción proteínica.

Deberán compararse los valores obtenidos con los que se hallen en la literatura consultada.

2. Método de Folín- lowry :

Para las muestras de soya, arveja y fríjol, de las fracciones de albúminas y glutelinas deberá tomarse para cada una y por aparte, una alícuota de 0,5 ml y llevarse a un volumen de 5 ml (dilución 1 a 10) con agua desmineralizada para las albúminas y con NaOH 0,1 N para las glutelinas. Estas diluciones se usarán como extractos problemas para dichas fracciones.

Preparación de los reactivos:

1. Solución alcalina de carbonato de sodio (Na_2CO_3 20 g/l en NaOH 0.1 mol/l).Se debe preparar primero el NaOH al 0.1 M y luego el carbonato se debe disolver en este, preparar 200 ml.

2. Solución de sulfato de cobre –tartrato-sódico potásico: Preparar una solución de sulfato de cobre SO_4Cu en tartrato sódico potásico 10 g/l) preparar de esta solución 300 ml.

3. El día de la práctica se debe preparar la solución salina: mezclar 50 ml de (1) y 1 ml (2).

4. El reactivo de Folin se debe diluir: en un volumen igual de agua, el mismo día que se va a utilizar. 1:1

5.Patrón de proteína: 0.25 mg/ml

Procedimiento: a 1 ml de muestra agregue 5 ml de una solución alcalina (mezclar 50 ml de la solución alcalina de carbonato de sodio más 1 ml de solución de sulfato de cobre –tartrato sódico potásico). Mezcle vigorosamente y deje reposar a temperatura ambiente por 10 min o más. Agregue 0. 5 ml del reactivo de Folin en forma rápida y mezclando inmediatamente. Después de 30 minutos lea la Absorbancia a 750 nm. Utilice un blanco de reacción.

REACTIVO	BLANCO	T1	T2	T3	T4	T5	T6	M1	M2
H_2O ml	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0	----	---
PATRON ml	---	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1	----	---
PROBLEMA	------	---	---	---	---	---	--	1ml	1ml
SOLUCION ALCALINA (ó Folin A+C)	5 ml en todos los tubos: agitar bien y esperar 10 minutos.								
REACTIVO DE FOLIN DILUIDO 1:1 Ó 1:2	0.5 ml, esperar 30 minutos en la oscuridad luego leer la absorbancia a 500 ó 750 nm.								

Tabla 6: batería de tubos método Folin Lowry para la cuantificación de proteínas.

Determine la concentración de proteínas de una solución problema después de preparar una curva patrón con BSA (albúmina sérica bovina).

Expresión de resultados:

Complete la siguiente tabla:

tubo	Absorbancia (nm=)	Concentración de proteína (mg/ml)
T1		
T2		
T3		
T4		
T5		
T6		
M1		
M2		

Tabla 7: presentación de resultados práctica 2.

Para hallar la concentración del patrón en mg/ml, debe realizar el respectivo análisis de la concentración de la solución patrón: 0.25 mg/ml y el volumen que se toma de la solución patrón.

Con los valores de Absorbancia y Concentración graficar:

Concentración de proteína en las abscisas (X) y Absorbancia en la ordenadas (Y).

Obtenga la ecuación de la recta por regresión lineal y el coeficiente de regresión. Ecuación del tipo

y = m x + b. Se recomienda que el valor del coeficiente de correlación sea como mínimo de 0.995.

La ecuación encontrada, servirá para realizar los cálculos de concentración de proteína en mg/ml de M1 y M2. Tengan en cuenta las diluciones realizadas en cada una de las muestras.

Sistema de Evaluación

Evaluación individual:

- cada estudiante debe presentar en forma escrita el quiz de laboratorio.
- Asistencia, desempeño y desenvolvimiento durante la sesión de laboratorio

Evaluación grupal:

El grupo de trabajo debe presentar un informe de laboratorio en la fecha acordada por el tutor. (Ver la descripción de "producto a entregar".

Informe o productos a entregar

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.
- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Rúbrica de evaluación

Ítem Evaluado	Valoración Baja	Valoración Media	Valoración Alta	Máximo Puntaje
Asistió y participó activamente del desarrollo de la práctica	El estudiante no asistió. (Puntos = 0)	El estudiante asistió pero su desempeño no fue en la habilidad del trabajo en grupo y desempeño de la práctica no fu excelente. (Puntos =1.0)	El estudiante participó de manera pertinente con la actividad durante el desarrollo del laboratorio (Puntos = 3.2)	3.2
Entrega del debido pre informe o presenta el debido quiz.	No hay entrega de los productos solicitados (Puntos = 0).		Hay entrega de los productos solicitados y contenido es pertinente. (Puntos =3.2)	3.2

Estructura del Informe escrito (¿tiene lo solicitado?, tiene normas APA?). Forma de la sustentación (tiene lo solicitado?).	El informe no presenta una excelente estructura. (Puntos = 0)	Aunque el informe presenta una estructura base, la misma carece de algunos elementos del cuerpo solicitado. (Puntos = 1.0)	El informe presenta una excelente estructura y presentación. (Puntos =3.0)	3.0
Profundidad y análisis del informe y/o sustentación.	El informe no da respuesta a los lineamientos de las prácticas de laboratorio. (Puntos = 0)	Aunque presenta resultados y análisis de resultados estos no son pertinentes. Se evidencia la ausencia de análisis y deducción. (Puntos =3.0)	El informe presenta una excelente articulación entre los resultados y el análisis de resultados. Se evidencia la profundidad de los análisis. (Puntos = 7.6)	7.6
TOTAL DE PUNTOS POSIBLES				**17**

Tabla 8: Rúbrica de la práctica 2.

Nota: La puntuación anterior esta pondera de acuerdo a: 6 sesiones de laboratorio/100 puntos= 16,6666. Se debe hacer la siguiente conversión para dar la calificación en escala de 0.0-5.0: puntos obtenidos*5.0/16

Retroalimentación

El tutor de la práctica tendrá diez (10) días hábiles para envía o entregar la respectiva retroalimentación del informe de laboratorio siguiendo lo estipulado en la rúbrica de evaluación.

PRACTICA No. 3 – ENSAYOS ENZIMATICOS CUALITATIVOS –ESTUDIO CINÉTICO DE LA UREASA

Tipo de practica	Presencial: **X** | Autodirigida: | Remota:
Porcentaje de evaluación	**17%**
Horas de la practica	**4H**
Temáticas de la práctica	Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el capítulo 3, Enzimas.
Intencionalidades formativas	**Propósitos** Entender el papel de las enzimas como catalizadores de los diferentes procesos bioquímicos y su importancia en los diferentes procesos metabólicos. Analizar, mediante reacciones cualitativas la actividad enzimática de la sacarasa y alfa-amilasa. Establecer relaciones entre la estructura y la función de las enzimas y pérdida de esta al variar al variar su temperatura óptima de trabajo. **Objetivos** Que el estudiante entienda el papel de las enzimas como catalizadores de los diferentes procesos bioquímicos y su importancia en los diferentes procesos metabólicos. Que el estudiante analice mediante reacciones cualitativas la actividad enzimática de la sacarasa y alfa-amilasa. Que el estudiante establezca relaciones entre la estructura y la función de las enzimas y pérdida de esta al variar al variar su temperatura óptima de trabajo. **COMPETENCIAS** El estudiante describe y analiza de manera eficiente los resultados observados en cada prueba cualitativa y relaciona el marco teórico y los resultados para dar el respectivo análisis. El estudiante conceptualiza en forma precisa la relación que tiene la prueba para carbohidratos y la actividad enzimática. El estudiante comunica los conocimientos adquiridos a través de la

	elaboración de informes escritos. **Metas** Al finalizar la práctica #3: El estudiante obtendrá su calificación del respectivo pre informe personal como resultado del estudio independiente. El estudiante resolverá los respectivos cuestionarios dados. El estudiante presentará en forma escrita el informe del respectivo laboratorio en forma grupal en donde sobresalga el análisis de resultados.

Fundamentación Teórica

El estudiante como parte de su autogestión en el desarrollo de su aprendizaje autónomo, se servirá investigar antes de la práctica como **actividad formativa** los siguientes temas:

1. Capítulo 3: enzimas, de la Unidad 1: Biomoléculas del módulo del curso.

2. Qué es la sacarasa, cual es su sustrato, a qué clase de enzima pertenece, cuáles son sus productos de hidrólisis. En qué consiste la prueba de Fehling y para qué clase de carbohidratos es indicativa, Por que se usa la prueba anterior en la actividad de la sacarasa?

3. Estructura química del substrato para la alfa-amilasa., enlaces que rompe o hidroliza la α- amilasa, clase de enzima que es la α- amilasa, Productos de la hidrólisis de la α- amilasa. En qué consiste la reacción de lugol con el almidón?¿ que entienden por temperatura óptima de una enzima, en el cuerpo humano donde se encuentra esta la α- amilasa?, que se entiende con pH óptimo de una enzima?.

4. estructura del almidón y su mecanismo de hidrólisis: enzimas implicadas.

5. ureasa, a qué clase de enzima pertenece, cuáles son sus productos de hidrólisis.

6. presencia de grupos SH.

7. Oxidación de los grupos SH

8. Qué tipo de azúcares es la glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa? .

Bibliografía de Consulta:

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Voet, V. (2004). Bioquímica, tercera edición. Montevideo, Uruguay.: Editorial Médica panamericana.

Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Campbell, M. Farrell, S. (2003). Bioquímica. México

Descripción de la practica

Ensayo cualitativo:

En esta práctica mediante pruebas coloreadas, se identifica los productos de hidrólisis de la acción de la sacarasa sobre la sacarosa, y la acción de la alfa- amilasa sobre el almidón.

Inicialmente se debe extraer la enzima sacarasa o sucrasa de la levadura mediante métodos utilizados en la separación de proteínas y determinar tanto su presencia como su actividad enzimática.

Demostrar que en la saliva existe actividad α - amilásica. Comprobar el efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de la reacción. Determinar el pH óptimo de la enzima α - amilasa Comprobar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Determinación de la Ureasa:

En esta práctica, se va a evaluar la presencia de la ureasa en leguminosas y tortas de oleaginosas midiendo su actividad biológica, mediante la hidrólisis de la urea. Se determinará su actividad, a través de dos métodos: el espectrofotométrico y por titulación con HCl. Se seleccionará el método que más se adecue al tiempo y recursos.

Estas prácticas corresponde a los temas que se tratan en la Unidad 1: Biomoléculas, específicamente el capítulo 3, Enzimas.

Es de vital importancia para los estudiantes de la formación profesional y técnica de los programas de ingeniería de alimentos, agroforestal, agronómica, zootecnia, producción animal y regentes de farmacia, el desarrollo de estas prácticas, ya que profundizan y analizan la relación e importancia que guardan las enzimas, las cuales son de naturaleza proteína, por lo tanto su la función biológica debe ser afectada por los mismos factores que las proteínas.

NOTA ACLARATORIA:

En esta sección de laboratorio hay dos prácticas: ensayos cualitativos y ensayos cuantitativos.
De los ensayos cualitativos, el tutor de práctica tomará la decisión de realizar la práctica 1 o 2. Esta decisión estará basada en la intensidad horaria asignada y de los recursos disponibles.

En las experiencias cuantitativas, el tutor de práctica tomará la decisión de realizar la práctica 1 o 2. Esta decisión estará basada en la intensidad horaria asignada y de los recursos disponibles.

Es importante que durante la sesión se realice un ensayo cualitativo y un ensayo cuantitativo.

Recursos a utilizar en la práctica (Equipos / instrumentos)

Material de vidrio	Material biológico (estudiantes)	Reactivos	Equipos
Vaso de precipitado de 50 ml Vaso de precipitado de 50 ml(para el grupo 2)	Levadura granulada comercial. (No sirve pulverizada).	300 ml Acetona. 100 ml de Solución de sacarosa al 5%.	Estufa a 38ºC
Mortero con mango	Solución de saliva.	Reactivo de Fehling	Balanzas (5)
espátula	100 gramos de leguminosas verdes (habas, frijoles, habichuelas., frijoles de soya).	100 ml TCA al 10% 200 ml Solución de almidón 2%.	Estufas (4)
Vidrio reloj		100 ml de KCl al 1.0%	Mallas (4)
Vaso de precipitado de 600 ml		100 ml de solución de lugol.	Termómetros (4)
Vaso de precipitado de 250 ml		50 ml Solución ácido tartárico al 1%	Baño termostatado a 38ºC previamente.
Vaso de precipitado de 500 ml		50 Solución de NaOH al 0.1 N	Papel filtro (5 para cada grupo)
Vaso de precipitado plástico de 1000 ml		50 Solución de NaOH al 0.5 N	pHmetro (2)
Vaso de precipitado plástico de 600 ml		50 ml de buffer fosfato pH 6.9-7.0	hielo
Agitador de vidrio		50 ml de ácido clorhídrico al 10%	Termómetro de mercurio(grupo 2)
Pipeta pasteur		100 ml de solución de glucosa al 5%	Equipo de filtración al vacio.
Probeta de 100 ml		Reactivo de selliwanoff	Espectrofotómetro.
Embudos y soporte		150 ml de ácido tartárico al 1%	
Erlenmeyers 250 ml		150 ml de NaOH 0.1 M	
Erlenmeyers 50 ml		Solución de HCl al 5%, Solución de NaOH al 5%	
Tubos de ensayo		Hielo y agua caliente	
gradillas		Buffer fosfato, a pH 5.0; 6.0; 7.2; 8.0 y 10.0 a 0.05 M.	
Pipetas 1, 5,10 ml		Solución de Urea 0.25 M Solución de HgCI2 1%	
Pinzas para tubos de		Indicador de tashiro	

Tabla 9: reactivos práctica 3

Software a utilizar en la practica

No hay un software recomendado.

Como complemento a la fundamentación teórica, se recomienda revisar la presentación:

Presentación: ensayos enzimáticos cualitativos.

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/Presentaci%C3%B3n_ensayos%20enzimaticos%20%20cualitativos.ppsx

Seguridad Industrial

REACTIVO	PROTECCION	RIESGO
Ácidos inorgánicos concentrados	Gafas de seguridad, tapabocas.	

Metodología

Conocimiento previo para el desarrollo de la práctica:

Capítulo 3: enzimas, de la Unidad 1: Biomoléculas del módulo del curso.

Forma de trabajo: Estimado estudiante a continuación encontrará los pasos a seguir para el desarrollo de la práctica #3 del curso.

La metodología es la siguiente:

Quiz de laboratorio individual #2:

En esta práctica **no** hay preinforme, en su lugar el estudiante se prepara para un Quiz escrito.

La temática a evaluar es: Capítulo 3: enzimas, de la Unidad 1: Biomoléculas del módulo del curso.

El contenido y forma de pregunta queda a disposición del tutor asignado de los laboratorios del curso.

Trabajo grupal

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Procedimiento:

1. Ensayos Cualitativos:

1. 1 Experimento No. 1 Sacarasa

Extracción de la enzima: Tome 17 gramos de levadura granulada (no utilice levadura molida) en un mortero y tritúrela. Una vez reducida a polvo, transfiérala a un vaso de precipitado que contenga 100 ml de agua destilada y agite durante 10 minutos. Filtre a través de tela y luego a través de papel de filtro en un embudo.

Vierta el filtrado en un vaso de precipitado y agregue 50 ml de acetona. Mezcle bien y deje la mezcla quieta durante 10 minutos. Decante parte del líquido cuidando de no perder el precipitado porque es donde esta la enzima sucrasa, colóquela en hielo para evitar la desnaturalización. Marque el recipiente como SOLUCIÓN DE ENZIMA.

Divida el contenido de la solución de enzima en dos partes, identifíquelas como enzima cruda y enzima hervida, a esta última llévela ebullición a 95 ºC internamente por 10 minutos. A la enzima cruda déjela en baño de hielo o en refrigeración.

1.2 marcha de la práctica

1.2.1 Actividad enzimática: realice las siguientes pruebas tanto en la enzima cruda como en la enzima hervida.

prueba	procedimiento en un tubo de ensayo colocar:	cantidad a adicionar:	Anote aquí el resultado Obtenido.	Realice aquí apuntes importantes para el análisis de resultados.
	Solución de enzima	3 ml		
	Sacarosa en solución fresca.	2 ml		
	Colocar el tubo a 38ºC durante 30 minutos			
	Realizar prueba de Fehling			
prueba de Fehling	En un tubo aparte colocar:			
	Solución A de Fehling	1 ml		
	Solución B de Fehling	1 ml		
	Agua destilada	3 ml		
	Solución problema (enzima + sacarosa).	3 ml		
	Colocar el tubo en una solución de			

	agua hirviendo por 5- 10 minutos			
	Observar			
Repetir la prueba de Fehling reemplazando la solución problema por glucosa al 2%. Fructosa y lactosa.				
seliwanoff	Enzima hervida	5 ml		
	Reactivo de selliwanoff	5 ml		
	Caliente a baño Maria			
	Observar.			

Tabla 10: Marcha de la práctica 3.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

1. Investigue los fundamentos químicos de las pruebas estudiadas para el reconocimiento de la hidrólisis de la sacarosa. En esta parte Ud tiene que analizar el fundamento teórico de la prueba y el resultado obtenido (de donde se obtiene el color obtenido, que indica cada prueba?
2. Qué le sucede a la sacarosa al ser tratada con la enzima sucrasa o sacarasa'.

2. Experimento No. 2: α-amilasa

2.1 Obtención de la enzima:

Se debe recolectar una muestra de saliva para obtener una solución de enzima. Para ello enjuáguese varias veces con agua de bolsa y proceda a recoger en un beaker de 50 ml aproximadamente 10 ml de saliva.

Rotule el erlenmeyer como **SOLUCIÓN DE ENZIMA α - AMILASA,** manténgala incubada a 37º - 38ºC.

2.2 **Marcha de la práctica:** actividad enzimática a diferentes tiempos de reacción.

prueba	procedimiento en un tubo de ensayo colocar:	cantidad a adicionar:	Anote aquí el resultado Obtenido.	Realice aquí apuntes importantes para el análisis de resultados.
Preparación de la solución de reacción	Alistar siete tubos de ensayo (marcar del 0-7):			
	Adicionar Acido tricloroacetico al 10%	0.5 ml		
	Aparte en un beaker de 50 ml Preparara la solución de reacción: tomar 40 ml almidón 2% (hervir durante 2 minutos). Enfriar y agregar agua destilada	40 ml 10 ml		
	Cloruro de potasio 1.0 % Incubar la preparación a 38ºC.	5 ml		
Cero minutos	Solución de reacción	10 ml		
	solución alfa- amilasa	6 ml		
	Agitar y tomar inmediatamente	3 ml		
	Colocarla en el tubo 0 que contiene ácido tricloroacético.			
	Gotas reactivo de lugol gota a gota hasta coloración rojiza o café. Observar.	Gotas		
10 minutos	Solución de reacción+ amilasa *(la misma cantidad de arriba). Dejar en incubación 10 min (38ºC)			
	tomar de esta solución a los 10 minutos	3 ml		
	Colocarla en el tubo 1 que contiene ácido tricloroacético			
	Gotas reactivo de lugol. Observar	Gotas		

20 minutos	Solución de reacción+ amilasa *(la misma de arriba). Dejar en incubación 20 min (38ºC)			
	Tomar de esta solución a los 20 minutos .	3 ml		
	Colocarla en el tubo 3 que contiene ácido tricloroacético			
	Gotas reactivo de lugol gota a gota hasta coloración rojiza o café.	Gotas 5		
30, 40, 50 y 60 minutos	Solución de reacción+ amilasa *(la misma de arriba). Repetir el procedimiento en los tubos y tiempos indicados			
	tomar de esta solución en los tiempos indicados	3ml		
	Colocarla en el tubo los tubos 4, 5, 6 y 7 respectivamente y que contienen ácido tricloroacético.			

Tabla 11: Marcha de la práctica 3 alfa- amilasa.



<u>Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:</u>

- Explique y analice los resultados obtenidos
- cuando reacciona con el lugol, que resultados se obtiene?
- Que coloración produce los productos de la hidrólisis del almidón y cuáles son?
- Grafique los resultados: eje x el tiempo de reacción y en el eje Y escala de colores según reacción de lugol.

2.3 Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de reacción

Prepare cuatro tubos de ensayo de la siguiente forma:

Tubo reactivo	1	2	3	4
Cloruro de potasio	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Solución de almidón	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Agua destilada	1.2 ml	1.1ml	1.0	0.9

Tabla 12: batería de tubos efecto de la concentración, alfa-amilasa.

Adicione a cada tubo: (no se olvide agitar)

Tubo reactivo	1	2	3	4
enzima	0.5ml	2 ml	3.5 ml	5 ml

Coloque cada tubo a incubar a 38ºC por 30 minutos. Transcurrido 30 minutos en cada tubo de ensayo adicionar 0.2 ml de acido triclorácetico al 10% y adicione de manera inmediata a cada tubo (o hasta el 4) gotas del reactivo de lugol.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

- Cuál es la relación del efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de reacción en la enzima según el experimento?
- Cuál es el papel del ácido tricloroacético?. Ver nota 1.

2.4 Determinación del pH óptimo de la α - amilasa salival

Mida el pH de:

Ácido tartárico al1%. Tomar pH _____

Acido clorhídrico al 10%. Tomar pH

NaOH al 0.1 N Tomar pH ____

NaOH al 0.5 N Tomar pH ____

Prepare cinco tubos de ensayo así:

Tubo reactivo	1	2	3	4	5
Ácido clorhídrico al 10%	1.0 ml				
Ácido tartárico al 1%		1.0 ml			
Buffer fosfato pH 6.9			1.0 ml		
NaOH 0.1 N				1.0 ml	
NaOH 0.5 N					1.0 ml
KCl	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Solución de almidón	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Agua destilada	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Tabla 13: batería de tubos efecto del pH, alfa-amilasa.

Adicione a cada minuto a cada tubo: (no se olvide agitar)

Tubo reactivo	1	2	3	4 y 5
enzima	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml

Coloque cada tubo a incubar a 38ºC por 30 minutos. Transcurrido 20 minutos en cada tubo de ensayo colocar 0.2 ml de acido triclorácetico al 10% y adicione de manera inmediata a cada tubo (o hasta el 4) tres gotas del reactivo de lugol.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

- Cuál es el papel del lugol en la reacción
- de acuerdo a los resultado grafique el comportamiento de la enzima frente a los cambios de pH.
- Escriba el valor óptimo de pH de la enzima y explique cómo llega Ud. A esa conclusión.

2.5 efecto de la temperatura sobre el efecto de la actividad enzimática.

Prepare tres tubos de ensayo así:

Tubo reactivo	1	2	3
Agua destilada	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
KCL	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Solución de almidón	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Tabla 14: batería de tubos efecto de la temperatura, alfa-amilasa.

Coloque el tubo #3 en baño con hielo por 20 minutos

Coloque el tubo # 1 por 10 minutos a 90ºC

Coloque el tubo # 2 a temperatura ambiente.

Anote las temperaturas respectivas en cada tubo. Después de este tiempo añada a cada tubo:

Tubo reactivo	1	2	3
enzima	**2 ml**	**2 ml**	**2 ml**

Coloque cada tubo a incubar a 38ºC por 20 minutos. Transcurrido 30 minutos en cada tubo de ensayo añadir 0.2 ml de acido tricloracetico al 10% y adicione de manera inmediata a cada tubo (o hasta el 4) tres gotas del reactivo de lugol.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

- Cuál es el papel de cloruro de potasio (KCL) presente en todo los experimentos al igual que el ácido tricloroacetico?
- de acuerdo a los resultado grafique el comportamiento de la enzima frente a los cambios de temperatura.
- Escriba el valor de la temperatura óptima de la enzima y explique cómo llega Ud. A esa conclusión

Experimento No. 3: Degradación Enzimática De Polisacáridos[2] (Práctica Opcional).

1. Coloque 3.0 mL de solución de almidón y 2 gotas de saliva en tres tubos de ensayo previamente marcados A, B y C.
2. Determine el pH en cada tubo, utilizando un pHmetro o papel indicador universal. Registre los resultados.
3. Agregue al tubo A 1.0 mL de ácido clorhídrico al 5%; al tubo B 1.0 mL de NaOH al 5%; y al tubo C 1.0 mL de agua.
4. Prepara un baño María con una temperatura de 37 ºC y coloque los tres tubos de ensayo durante 10 minutos.
5. Retire los tubos de ensayo del baño María y añada cinco gotas de lugol a cada uno. Registre los cambios de color, olor, temperatura, etc. En otros tres tubos de ensayo, previamente marcados como D, E y F, adicione tres mL de almidón y dos gotas de saliva, a cada uno.
6. Durante diez minutos coloque el tubo D en hielo, el tubo E en el baño María a 37 ºC y el tubo F en agua hirviendo.
7. Retire los tubos de ensayo D, E y F de las anteriores condiciones y agregue cinco gotas de lugol a cada uno. Registre todos los cambios que observe.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

1. ¿En qué situación se registró la mayor actividad enzimática y como la evidencia?

Experimento 4: Estudio Cinético del a Ureasa.

Procedimiento:

Extracción de la ureasa :

Pesar 5 g de muestra (en cada caso será una de las harinas de leguminosas o de las tortas de oleaginosas), pasarla a un erlenmeyer, agregar 10 ml de NaCl 1%; agitar mecánicamente durante 15 minutos y centrifugar la suspensión a 2.500 rpm por 15 minutos; transferir el sobrenadante a un balón aforado de 25 ml. Al residuo agregar de nuevo otros 10 ml de NaCl 1% y repetir exactamente el procedimiento anterior.

Reunir los dos sobrenadantes y completar a 25 ml con NaCl 1%. Este es el extracto que contiene ureasa. Dejar en baño con hielo.

Si se dispone de ureasa comercial, preparar una solución de 2 M.

[2] Munera, R: (2008). GUÍA PARA PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA. Palmira: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

4.1 Determinación de la actividad a diferentes pH: pH óptimo de una enzima:

4.1.1 Método 1:

Si se dispone de ureasa comercial, preparar una solución de 2 M o realice la extracción del materia vegetal:

Extracto enzimático de material vegetal:

El extracto que contenga la ureasa se puede obtener de una serie de leguminosas, las recomendadas son: frijol, habas, habichuela y frijol soya. Pese aproximadamente 5,0 g del material vegetal a utilizar, colóquelo en un mortero y macere con 20ml de NaCl 1% previamente enfriado en un baño de hielo-agua y realice la extracción por 15 minutos; luego Centrifuge por 10min a 2500 rpm.

Transfiera el sobrenadante a un balón aforado de 50ml y el residuo transfiéralo nuevamente al mortero y realice una segunda extracción con 10ml de NaCl al 1% y frío, por 15 min. Centrifuge a 2500 rpm por 10 min y coloque el sobrenadante en el balón aforado y complete a volumen con NaCl al 1%. Guarde el extracto enzimático refrigerado en un baño agua-hielo.

Marque doce tubos de ensayo y adicione a cada uno las siguientes soluciones:

TUBO	B1	1	B2	2	B3	3	B4	4	B5	5	B6	6
Urea 0,1M (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Solución HCl 1,0 M	2	2										
Buffer pH 4,0 (ml)			2	2								
Buffer pH 5,5 (ml)					2	2						
Buffer pH 7,0 (ml)							2	2				
Buffer pH 8,5 (ml)									2	2		
Beffer pH 10,0 (ml)											2	2
Incubar a 40° C por 5 minutos												
Extracto de Ureasa comercial		0,5		0,5		0,5		0,5		0,5		0,5
Agua destilada	0,5		0,5		0,5		0,5		0,5		0,5	
Incubar a 40°C por 25 min												
Fenol-nitroprusiato de sodio	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Hipoclorito alcalino	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Mezclar bien el contenido de los tubos de ensayo y colocarlos en un baño termostatado entre 50 y 60o C por 10 min para el desarrollo del color. Dejar enfriar y leer la absorbancia a 630 nm; si la absorbancia es mayor a 2.0, realizar la dilución adecuada y volver a leer.

4.1.2 Método 2:

Prepárese 2 series de 5 tubos: 5 servirán como blanco y 5 para determinar el efecto de pH. (Tubos p) rotulados claramente. Agregue lo indicado en el cuadro, incubándolos como se indica. Terminada la incubación transfiera el contenido de cada tubo a un erlenmeyer diferente, agregando a cada uno 3 gotas de indicador de tashiro; finalmente titule con HCl de normalidad conocida.

Primera Serie **TUBOS BLANCO**

Condiciones	**Tubo**				
	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5
Buffer Fosfato pH 5, ml	4.5	—	—	—	—
Buffer Fosfato pH 6, ml	—	4.5	—	—	—
Buffer Fosfato pH 7.2, ml	—	—	4.5	—	—
Buffer Fosfato pH 8, ml	—	—	—	4.5	—
Buffer Fosfato pH 10, ml	—	—	—	—	4.5
$HgCl_2$ 1%, gotas	4	4	4	4	4
Incubar a 50 ºC durante cinco minutos agitando.					
Extracto de Ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50 ºC durante 25 minutos. Titular con HCl 0.1 N					
Volumen de HCl gastado en la titulación					

Tabla 15: baterías de tubos pH óptimo de la ureasa tubos blanco

Segunda Serie **TUBOS PROBLEMA**

Condiciones	**Tubos P**				
	1p	2p	3p	4p	5p
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5
Buffer Fosfato pH 5, ml	4.5	—	—	—	—
Buffer Fosfato pH 6, ml	—	4.5	—	—	—
Buffer Fosfato pH 7.2, ml	—	—	4.5	—	—
Buffer Fosfato pH 8, ml	—	—	—	4.5	—
Buffer Fosfato pH 10, ml	—	—	—	—	4.5
Extracto de Ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50 ºC durante 30 minutos. Titular con HCl 0.1 N					
$HgCl_2$ 1%, gotas	4	4	4	4	4
Titular con HCl 0.1N					

Tabla 16: baterías de tubos pH óptimo de la ureasa, tubos problema

Expresión de resultados

Tabular los resultados obtenidos así:

Tubo número	ml de HCl gastado	Titulación corregida	Micromoles /ml de HCl gastado
1p			
2p			
3p			
4p			
5p			

Tabla 17: resultados pH óptimo de la ureasa, tubos problema

El valor corregido de la titulación es la diferencia entre el volumen de HCl 0.1 N gastado en el blanco y el gastado en el problema (p) al mismo pH.

Tubo número	Micromoles de urea hidrolizada	pH correspondiente
1p		
2p		
3p		
4p		
5p		

Tabla 17: resultados pH óptimo de la ureasa, tubos problema



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

Del método 1: exprese gráficamente en papel milimetrado, los micromoles de urea hidrolizados (en las ordenadas Y) Vs el pH en las abscisas (X).

Del método 2: Haga una gráfica de pH vs Absorbancia e identifique el pH óptimo de la urea.

Compare los resultados del método 1 y 2 y realice su propio análisis y conclusiones.

Que efecto tiene el pH sobre la actividad biológica de una enzima?.

Las soluciones buffers, que papel juegan en cada método?

4.2 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción enzimática

En 8 tubos de ensayo marcados, pipetear en cada uno las cantidades de reactivos que a continuación se indican:

Condiciones	**Tubos**							
	B	1	2	3	4	5	6	7
Urea 0.25 M, ml	5	1.0	1.5	2.0	3.0	6.0	8.0	9.5
Buffer de fosfato pH óptimo, ml	5	8.5	8.0	7.5	6.5	3.5	1.5	—
$HgCl_2$, gotas	4	—	—	—	—	—	—	—
Colocar todos los tubos en un baño maría a 50 ºC por cinco minutos y sin sacarlos agregar:								
Ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dejar en baño maría a 50 ºC durante 25 minutos y al final agregar:								
$HgCl_2$ 1%, gotas	4	4	4	4	4	4	4	4
Mezclar y sacar los tubos del baño								

Tabla 18: baterías de tubos variación concentración de sustrato, tubos problema

Transferir cuantitativamente el contenido de cada tubo a un erlenmeyer marcado, agregar a cada uno 3 gotas de indicador, titular con el HCl (normalidad conocida) y comparar las diferentes titulaciones con el blanco.

Expresión de resultados : Tabular los resultados obtenidos así:

Tubo número	**Micromoles de urea**	**ml de HCl gastados**	**Titulación corregida**	**Micromoles de HCl gastados**
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

Titulación corregida, corresponde a: ml de HCl gastados - ml de HCl del blanco.

Tubo número	Micromoles de urea hidrolizada	Velocidad en moles/min	1/v	[S] moles de urea inicia/ml	1/[S]
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

Tabla 19: expresión de resultados variación concentración de sustrato

En papel milimetrado y con datos de la tabla anterior construir las siguientes gráficas:

- Gráfica No. 2 de su informe: En ordenadas datos de y o sea micromoles de urea hidrolizados por minuto. En abscisas datos de [S] o sea micromoles de urea iniciales/ml.
- Gráfica No. 3 de su informe: Siguiendo el procedimiento Lineweaver-Burk, en ordenadas datos de 1/v y en abscisas 1 / [S].

De estas dos gráficas, deducir la constante de Michaelis y la velocidad máxima para esta reacción. El valor de K_m (constante de Michaelis) debe expresarse en moles/litro.

4.3 Determinación de la actividad a diferentes temperaturas

Se usarán cinco baños de agua a diferentes temperaturas y cada tubo se incubará como se indica a continuación:

Tubo número	Incubar en:
1	baño de agua con hielo
2	baño de agua a temperatura ambiente aproximadamente 16 °C
3	baño de agua a 37 °C
4	baño de agua a 60 °C
5	baño maría (92 °C)

Luego proceda a agregar los reactivos y a mantener las condiciones que se indican enseguida:

Condiciones	Tubos					
	B	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5	5
Buffer de fosfato pH óptimo, ml	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
$HgCl_2$, gotas	4	—	—	—	—	—
Temperatura de incubación, ºC	16	0	16	37	60	92
Colocar cada tubo en baño de agua a la temperatura indicada por cinco minutos y sin sacarlos agregar.						
Solución de ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar e incubar por 25 minutos a la temperatura correspondiente						
$HgCl_2$ 1%, gotas	—	4	4	4	4	4
Titular con HCl (normalidad conocida)						
Resultados, ml de HCl						

Tabla 20: baterías de tubos variación de la temperatura

Expresión de resultados

Con los resultados de la anterior serie de temperaturas y el obtenido a 50 °C (ver determinación de la actividad a diferentes pH, tubo No. 3p), grafique en papel milimetrado (gráfica No. 4 de su informe) los micromoles de urea hidrolizada (ordenadas) vs temperatura °C (abscisas). Explique el efecto de cada temperatura en la actividad de la ureasa.

4.3 Actividad enzimática de la ureasa variando la concentración de enzima.

En 5 tubos de ensayo marcados pipetear en cada uno las cantidades de reactivos como en la tabla siguiente se indica. Mezclar y sacar los tubos del baño. Transferir cuantitativamente el contenido de cada tubo a un erlenmeyer marcado, titular con el HCI (normalidad conocida) y comparar las diferentes titulaciones con el blanco.

Condiciones	Tubos				
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5
Buffer de PO_4 pH óptimo, ml	5	5	4.5	4	2.5
$HgCl_2$ 1%, gotas	4	—	—	—	—
Colocar todos los tubos en baño maría a 50 ºC por cinco minutos y					

sin sacarlos agregar:					
Extracto de ureasa, ml	0.5	0.5	1	1.5	3
Dejar en baño maría a 50 ºC durante 25 minutos y al final agregar:					
$HgCl_2$ 1%, gotas	—	4	4	4	4

Tabla 21: baterías de tubos extracción de ureasa de leguminosas

Nota: Si la actividad de la enzima es muy baja con las alícuotas utilizadas, repetir el ensayo usando una alícuota del extracto de ureasa mayor. Por el contrario si la enzima presenta una actividad afta repita el ensayo utilizando una dilución del extracto de ureasa (por ejemplo: 1:5 v/v).

2.2 Expresión de resultados

Determine la actividad ureásica de la leguminosa o la torta analizada, expresándola como micromoles de urea hidrolizado / ml del extracto de ureasa.

Compare la actividad ureásica de su extracto con los obtenidos por los demás grupos y con los datos bibliográficos.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

1. ¿Qué tipo de inhibición enzimática se presenta con el uso de metales pesados?
2. ¿Qué representan los valores de V_m y K_m?
3. ¿Qué entiende por metalo-enzimas? Dé ejemplos.
4. ¿Qué sucedería si se reemplaza el $HgCl_2$ por $CaCl_2$? Explique su respuesta.
5. ¿Todas las enzimas tienen CySH en su sitio activo? Especifique cuáles son los aminoácidos presentes en el sitio activo de las enzimas cuyos sitios activos usted conoce.

Sistema de Evaluación

Evaluación individual:

- cada estudiante debe presentar en forma escrita el quiz 2.
- Asistencia, desempeño y desenvolvimiento durante la sesión de laboratorio

Evaluación grupal:

El grupo de trabajo debe presentar un informe de laboratorio en la fecha acordada por el tutor. (ver la descripción de "producto a entregar".

Informe o productos a entregar

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos,

introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Rúbrica de evaluación

Ítem Evaluado	Valoración Baja	Valoración Media	Valoración Alta	Máximo Puntaje
Asistió y participó activamente del desarrollo de la práctica	El estudiante no asistió. (Puntos = 0)	El estudiante asistió pero su desempeño no fue en la habilidad del trabajo en grupo y desempeño de la práctica no fu excelente. (Puntos =1.0)	El estudiante participó de manera pertinente con la actividad durante el desarrollo del laboratorio (Puntos = 3.2)	3.2
Entrega del debido pre informe o presenta el debido quiz.	No hay entrega de los productos solicitados (Puntos = 0).		Hay entrega de los productos solicitados y contenido es pertinente. (Puntos =3.2)	3.2
Estructura del Informe escrito (¿tiene lo solicitado?, tiene normas APA?). Forma de la sustentación (tiene lo solicitado?).	El informe no presenta una excelente estructura. (Puntos = 0)	Aunque el informe presenta una estructura base, la misma carece de algunos elementos del cuerpo solicitado. (Puntos = 1.0)	El informe presenta una excelente estructura y presentación. (Puntos =3.0)	3.0
Profundidad y análisis del informe y/o sustentación.	El informe no da respuesta a los lineamientos de las prácticas de laboratorio. (Puntos = 0)	Aunque presenta resultados y análisis de resultados estos no son pertinentes. Se evidencia la ausencia de análisis y deducción. (Puntos =3.0)	El informe presenta una excelente articulación entre los resultados y el análisis de resultados. Se evidencia la profundidad de los análisis. (Puntos = 7.6)	7.6
TOTAL DE PUNTOS POSIBLES				**17**

Tabla 22: Rúbrica de la práctica 3.

Nota: La puntuación anterior esta pondera de acuerdo a: 6 sesiones de laboratorio/100 puntos= 16,6666. Se debe hacer la siguiente conversión para dar la calificación en escala de 0.0-5.0: puntos obtenidos*5.0/16

Retroalimentación

El tutor de la práctica tendrá diez (10) días hábiles para envía o entregar la respectiva retroalimentación del informe de laboratorio siguiendo lo estipulado en la rúbrica de evaluación.

PRACTICA No. 4- HIDRÓLISIS DE POLSACARIDOS, MÉTODO DEL REACTIVO 3,5-DINITROSALICILATO [3]

Tipo de practica	Presencial: X | Autodirigida: | Remota:
Porcentaje de evaluación	17%
Horas de la practica	3 H
Temáticas de la práctica	Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 7, Metabolismo de glúcidos.
Intencionalidades formativas	**Propósitos** Comparar tres métodos de hidrólisis de polisacáridos, determinando la cantidad de azúcar reductor formado mediante la reacción de la glucosa con 3,5-dinitrosalicilato de sodio. Reconocer los productos de hidrólisis de polisacáridos. Cuantificar la concentración de glucosa residual como producto de las hidrólisis ácida, enzimática por el método 3,5-dinitrosalicilato de sodio del almidón y celulosa. **Objetivos** Que los estudiantes comparen tres métodos de hidrólisis de polisacáridos, determinando la cantidad de azúcar reductor formado mediante la reacción de la glucosa con 3,5-dinitrosalicilato de sodio. Que los estudiantes rreconozcan los productos de hidrólisis de polisacáridos. Que los estudiantes cuantifiquen la concentración de glucosa residual como producto de las hidrólisis ácida, enzimática por el método 3,5-dinitrosalicilato de sodio del almidón y celulosa. **COMPETENCIAS** El estudiante describe y analiza de manera eficiente los resultados observados en cada prueba cualitativa y relaciona el marco teórico y los resultados para dar el respectivo análisis.

[3] Pérez, G. Navarro, Y. (1992). Bioquímica. Santa Fe de Bogotá DC: Unisur.

	El estudiante conceptualiza en forma precisa la relación que tiene cada prueba y los procesos de hidrólisis de polisacáridos. El estudiante comunica los conocimientos adquiridos a través de la elaboración de informes escritos. **Metas** Al finalizar la práctica #9: El estudiante obtendrá su calificación del respectivo pre informe personal como resultado del estudio independiente. El estudiante resolverá los respectivos cuestionarios dados. El estudiante presentará en forma escrita el informe del respectivo laboratorio en forma grupal en donde sobresalga el análisis de resultados.

Fundamentación Teórica

El estudiante como parte de su autogestión en el desarrollo de su aprendizaje autónomo, se servirá investigar antes de la práctica y a manera de **pre informe** los siguientes temas, enfatizando en la reacciones químicas que tienen lugar y el principio del método:

1. estructura y función biológica del almidón, glucógeno y celulosa.

2. método del reactivo 3,5-dinitrosalicilato para cuantificación de azúcares.

Bibliografía de Consulta:

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Voet, V. (2004). Bioquímica, tercera edición. Montevideo, Uruguay.: Editorial Médica panamericana. Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Campbell, M. Farrell, S. (2003). Bioquímica. México. Thomson Editores. Cuarta Edición.

Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.

Descripción de la practica

En esta práctica se compara tres métodos de hidrólisis de polisacáridos, determinando la cantidad de azúcar reductor formado mediante la reacción de la glucosa con 3,5-dinitrosalicilato de sodio.

Esta práctica es un apoyo para la comprensión de los temas se tratan en la Unidad 3: Metabolismo:

catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 7, Metabolismo de glúcidos.

Es de vital importancia para los estudiantes de la formación profesional y técnica de los programas de ingeniería de alimentos, agroforestal, agronómica, zootecnia, producción animal y regentes de farmacia, el desarrollo de estas prácticas, ya que profundizan y analizan la relación e importancia que guardan los carbohidratos en las reacciones catabolismo y anabolismo para el aporte de energía metabólica. Es importante además que los estudiantes adquieran la competencia básica de cuantificar carbohidratos por los métodos tradicionales como el DNS y Somogy-Nelson.

Recursos a utilizar en la práctica (Equipos / instrumentos).

Material de vidrio	Material biológico	Reactivos	Equipos
Tubos de ensayo,	saliva	Solución de almidón soluble (6 mg/ml) en buffer fosfato de sodio 0.02 M y pH 6.9	espectrofotómetro
Vasos de precipitado de 1000, 600, 50 ml.	200 gramos de maizena.	$NaOH_2$, 4 N, HCl 4 N. NaOH 20%	Balanza
Pipetas de 10 ml, probetas de 100 ml, agitadores de vidrio.		Reactivo 3,5-dinitro salicilato de sodio: (disolver 5 g de ácido 3,5-dinitro salicílico en 100 ml de NaOH 2N, calentar. Por separado, adicionar 150 g de tartrato de sodio y potasio a 250 ml de H_2O, calentar. Mezclar las dos soluciones y completar a 500 ml)	centrifuga
		Buffer fosfato de sodio 0.02 M pH 6.9 en NaCl 0.005 M.	
		Reactivo de Lucas. (134 g de $ZnCl_2$ en 89 ml de HCl concentrado).	

Tabla 23: reactivos de la práctica 4.

Software a utilizar en la practica

No hay un software recomendado, en internet, el estudiante puede consultar videos ilustrativos de las pruebas a realizar.

Como complemento a la fundamentación teórica, se recomienda revisar las siguientes presentaciones virtuales:

Presentación: Generalidades de Carbohidratos haciendo clic en el siguiente enlace:

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/GENERALIDADES%20SOBRE%20CARBOHIDRATOS.zip

Objeto de Aprendizaje virtual: Estructura ciclica de carbohidratos.

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/ESTRUCTURA%20CICLICA%20DE%20LOS%20CARBOHIDRATOS_1.zip

Dar clic en los archivos Index html.

Seguridad industrial

REACTIVO	PROTECCION	RIESGO
Ácidos inorgánicos concentrados. Sustancias irritantes.	Gafas de seguridad, tapabocas. Lo que estipula el reglamento de laboratorio.	

.

Metodología

Conocimiento previo para el desarrollo de la práctica: Los conceptos sugeridos en la fundamentación teórica.

Forma de trabajo: Estimado estudiante a continuación encontrará los pasos a seguir para el desarrollo de la práctica #4 del curso.

La metodología es la siguiente:

Trabajo individual

El estudiante obtiene las guías de laboratorio, prepara un pre informe que contenga:

1. estructura y función biológica del almidón, glucógeno y celulosa.

2. método del reactivo 3,5-dinitrosalicilato para cuantificación de azúcares.

3. Otros métodos para la determinación de azúcares reductores

4. diagrama de flujo de la marcha de la práctica y tabla de resultados en blanco.

Entréguelo a su tutor de laboratorio en formato Word (no se debe evidenciar copias tácitas de internet) o a mano alzada.

Trabajo grupal

En grupo de trabajo (máximo 4 estudiantes), todos los estudiantes realizan la práctica #1 de laboratorio, para ello previamente deben identificar los materiales que se requiere. Tenga presente que el desempeño individual como grupal, serán tenidos en cuenta en la rúbrica de evaluación del informe de laboratorio.

Producto a entregar:

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Procedimiento:

El tutor en el momento de la práctica distribuirá el trabajo de tal manera que cada grupo realice una hidrólisis diferente sobre el mismo polisacárido; por ejemplo el grupo 1 efectuará hidrólisis ácida sobre almidón proveniente de maizena y el grupo 2 efectuará la hidrólisis enzimática sobre la misma muestra a fin de que puedan comparar los resultados.

La solución del polisacárido tendrá una concentración de 6 mg/ml y se preparará en Buffer fosfato de sodio 0.02 M pH = 6,9.

Todos los grupos realizarán la hidrólisis ácida de la celulosa en presencia de $ZnCl_2$ (o reactivo de Lucas)

1. **Hidrólisis ácida**

Rotular ocho tubos de ensayo y agregar en orden los siguientes reactivos:

Condiciones	**Tubos**							
	B	0	1	2	3	4	5	6
Solución almidón, ml	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Agua destilada, ml	0.4	—	—	—	—	—	—	—
NaOH, 2.4 N	1	1	—	—	—	—	—	—
HCl 4N, ml	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Colocar los tubos 1 a 6 en un baño maría a ebullición y dejarlos en los siguientes tiempos:								
Tiempo de incubación, minutos	0	0	3	6	9	12	15	25
Finalizado el tiempo de incubación, sacar cada tubo y detener la hidrólisis agregando:								
NaOH, 2.4N, ml	—	—	1	1	1	1	1	1
Reactivo 3,5-dinitrosalicilato, ml	1	1	1	1	1	1	1	1
Introducir todos los tubos en el baño a ebullición durante cinco minutos, enfriar y agregar 7 ml de agua destilada. Agitar y medir transmitancia a 540 nm. Utilice el B para ajustar el 100% de transmitancia o a cero de absorbancia.								

Tabla 24: baterías de tubos cuantificación de glucosa DNS hidrólisis química.

2. **Hidrólisis enzimática**

Recoger 2 ml de saliva en un vaso de precipitados. Cuando esté todo listo para la hidrólisis enzimática, diluya la saliva original tomando 0.3 ml de saliva y 19.7 ml de buffer de fosfato de sodio pH 6.9 en NaCl 0.005 M. Use inmediatamente la saliva diluida.

Si la velocidad de hidrólisis es muy rápida para obtener una rata lineal en los primeros minutos o demasiado lenta, para observar una rata apreciable, repita el ensayo usando otra dilución de saliva.

Rotular ocho tubos de ensayo y agregar los siguientes reactivos:

Condiciones	**Tubos**							
	B	0	1	2	3	4	5	6
Solución almidón, ml	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Agua destilada, ml	0.4	—	—	—	—	—	—	—
Saliva diluida, ml	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Inmediatamente adicione la saliva a los tubos B y 0, agregue el siguiente reactivo:								
Reactivo 3,5-dinitrosalicilato, ml	1	1	—	—	—	—	—	—
Agite todos los tubos y deje incubar a temperatura ambiente:								
Tiempo de incubación, minutos	0	0	3	6	9	12	15	25
Luego de terminar la incubación, agregue:								
Reactivo 3,5-dinitrosalicilato, ml	—	—	1	1	1	1	1	1
Coloque todos los tubos en un baño a ebullición durante cinco minutos, enfríe y agregue 8 ml de agua destilada. Mida la transmitancia a 540 nm y use el tubo B para ajustar el 100% de transmitancia o a cero de absorbancia.								

Tabla 25: baterías de tubos cuantificación de glucosa DNS hidrólisis enzimática.

3. **Hidrólisis ácida de la celulosa en presencia de $ZnCl_2$**

Colocar en una cápsula un trozo de algodón bien desmenuzado o vanos pedacitos pequeños de papel de filtro. Agregue 3 ml del reactivo de Lucas y caliente durante tres minutos, agitando energéticamente. Deje enfriar y neutralice rápidamente con NaOH al 20%. Si se forma un precipitado centrifugue a 2.500 rpm durante 10 minutos y luego pase 0.5 ml del sobrenadante a un tubo, adicione 1 ml de NaOH 2,4 N y 1 ml del reactivo, 3,5-dinitro salicilato (DNS) y proceda en igual forma a la utilizada en las hidrólisis anteriores. Repita el procedimiento calentando durante 6, 9, 12, 15 y 18 minutos. Elabore un blanco de reacción: 3 ml del reactivo de Lucas y neutralización con NaOH (el mismo volumen que en los tubos) y adicione 1 ml de 3,5-DNS.

Coloque todos los tubos en un baño a ebullición durante cinco minutos, enfríe y agregue 8 ml de agua

destilada. Mida la transmitancia a 540 nm y use el tubo B para ajustar el 100% de transmitancia o a cero de absorbancia.

Expresión de resultados

La glucosa libre que queda después de la hidrólisis completa del almidón, (tubo No. 6 de la hidrólisis ácida), representa el 100% de conversión del polisacárido en glucosa.

Tomando el valor de absorbancia de este tubo como el 100% de hidrólisis, calcule el porcentaje de hidrólisis en los demás tubos de las diferentes hidrólisis.

Grafique el porcentaje de hidrólisis o formación de azúcar reductor vs tiempo para la hidrólisis ácida y enzimática del almidón.

Compare el porcentaje de hidrólisis a los 3 minutos de cada polisacárido para la hidrólisis ácida, la hidrólisis ácida en presencia de $ZnCl_2$ e hidrólisis enzimática.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

1. ¿Cuáles son los productos de la hidrólisis enzimática parcial y total del almidón, del glicógeno y de la celulosa?
2. ¿Cuál es el efecto de la adición de NaCl al buffer fosfato usado para diluir la saliva?
3. Explique la diferencia estructural entre la celulosa y el almidón. ¿Cómo puede degradarse enzimáticamente la celulosa?
4. ¿Qué son los compuestos llamados dextrinas y cuál es su importancia en la elaboración de alimentos?

Sistema de Evaluación

Evaluación individual:

- cada estudiante debe presentar en forma escrita lo solicitado en el preinforme.
- Asistencia, desempeño y desenvolvimiento durante la sesión de laboratorio

Evaluación grupal:

El grupo de trabajo debe presentar un informe de laboratorio en la fecha acordada por el tutor. (Ver la descripción de "producto a entregar".

Informe o productos a entregar

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos,

introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Rúbrica de evaluación

Ítem Evaluado	Valoración Baja	Valoración Media	Valoración Alta	Máximo Puntaje
Asistió y participó activamente del desarrollo de la práctica	El estudiante no asistió. **(Puntos = 0)**	El estudiante asistió pero su desempeño no fue en la habilidad del trabajo en grupo y desempeño de la práctica no fu excelente. **(Puntos =3.0)**	El estudiante participó de manera pertinente con la actividad durante el desarrollo del laboratorio **(Puntos = 7.0)**	3.2
Entrega del debido pre informe o presenta el debido quiz.	No hay entrega de los productos solicitados **(Puntos = 0)**.	Hay entrega de los productos solicitados pero su contenido no es pertinente. **(Puntos = 5.0)**	Hay entrega de los productos solicitados y contenido es pertinente. **(Puntos =10)**	3.2
Estructura del Informe escrito (¿tiene lo solicitado?, tiene normas APA?). Forma de la sustentación (tiene lo solicitado?).	El informe no presenta una excelente estructura. **(Puntos = 0)**	Aunque el informe presenta una estructura base, la misma carece de algunos elementos del cuerpo solicitado. **(Puntos = 0.5)**	El informe presenta una excelente estructura y presentación. **(Puntos =1.0)**	3.0
Profundidad y análisis del informe y/o sustentación.	El informe no da respuesta a los lineamientos de las prácticas de laboratorio. **(Puntos = 0)**	Aunque presenta resultados y análisis de resultados estos no son pertinentes. Se evidencia la ausencia de análisis y deducción. **(Puntos =4)**	El informe presenta una excelente articulación entre los resultados y el análisis de resultados. Se evidencia la profundidad de los análisis. **(Puntos = 8)**	7.6
TOTAL DE PUNTOS POSIBLES				**17**

Tabla 26: Rúbrica de la práctica 4.

Nota: La puntuación anterior esta pondera de acuerdo a: 6 sesiones de laboratorio/100 puntos= 16,6666. Se debe hacer la siguiente conversión para dar la calificación en escala de 0.0-5.0: puntos obtenidos*5.0/16

Retroalimentación

El tutor de la práctica tendrá diez (10) días hábiles para envía o entregar la respectiva retroalimentación del informe de laboratorio siguiendo lo estipulado en la rúbrica de evaluación.

PRÁCTICA No. 5 - RECONOCIMIENTO DEL GLUCOGENO

Tipo de practica	Presencial ☐ Autodirigida ☐ Remota ☐
Porcentaje de evaluación	16%
Horas de la practica	3H
Temáticas de la práctica	Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 7, Metabolismo de glúcidos.
Intencionalidades formativas	**Propósitos** Extraer el glucógeno presente en materiales biológicos como el hígado. Reconocer cualitativamente la presencia de glucógeno en hígado mediante su hidrólisis enzimática. Analizar, mediante reacciones cualitativas los productos de la hidrólisis del glucógeno extraído. Establecer relaciones entre la estructura y la función del glucógeno y las reacciones metabólicas en las cuales participa. **Objetivos** Que el estudiante aprenda a extraer el glucógeno presente en materiales biológicos como el hígado. Que el estudiante reconozca cualitativamente la presencia de glucógeno en hígado mediante su hidrólisis enzimática. Que el estudiante analice mediante reacciones cualitativas los productos de la hidrólisis del glucógeno extraído. Que el estudiante relaciones la estructura y la función del glucógeno y las reacciones metabólicas en las cuales participa. **COMPETENCIAS** El estudiante describe y analiza de manera eficiente los resultados observados en cada prueba cualitativa y relaciona el marco teórico y los resultados para dar el respectivo análisis. El estudiante conceptualiza en forma precisa la relación que tiene cada prueba y la estructura y función del glucógeno.. El estudiante comunica los conocimientos adquiridos a través de la

	elaboración de informes escritos. **Metas** Al finalizar la práctica #10: El estudiante obtendrá su calificación del respectivo pre informe personal como resultado del estudio independiente. El estudiante resolverá los respectivos cuestionarios dados. El estudiante presentará en forma escrita el informe del respectivo laboratorio en forma grupal en donde sobresalga el análisis de resultados.

Fundamentación Teórica

El estudiante como parte de su autogestión en el desarrollo de su aprendizaje autónomo, se servirá investigar antes de la práctica y a manera de actividad formativa los siguientes temas, enfatizando en la reacciones químicas que tienen lugar y el principio del método:

1. Glucógeno: que es el glucógeno, donde se encuentra el glucógeno y cuál es su función biológica, cuál es la composición química del glucógeno, cuáles son los productos de la hidrólisis del glucógeno vía enzimática. De qué organismos es característicos el glucógeno?. En qué otros tejidos fuera del hígado se almacenan glúcidos en forma de glucógeno?

2. Escriba con fórmulas la estructura química del glucógeno y el almidón. Mencione las diferencias encontradas. Porque se relaciona la alfa amilasa con el glucógeno. Porque se usa la prueba de Tollens y Fehling en el experimento?

3. Resumen Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 7, Metabolismo de glúcidos.

Descripción de la practica

En esta práctica se va a extraer glucógeno a partir del hígado para realizar reconocimiento de azucares a partir del glucógeno.

Esta práctica es un apoyo para la comprensión de los temas se tratan en la Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 7, Metabolismo de glúcidos.

Es de vital importancia para los estudiantes de la formación profesional y técnica de los programas de ingeniería de alimentos, agroforestal, agronómica, zootecnia, producción animal y regentes de farmacia, el desarrollo de esta práctica, ya que profundizan y analizan la relación e importancia que guardan los carbohidratos en las reacciones catabolismo y anabolismo para el aporte de energía metabólica. En esta práctica, los estudiantes profundizan la relación que tiene el

glucógeno como reserva energética en las reacciones de generación de ATP.

Recursos a utilizar en la práctica (Equipos / instrumentos)

MATERIALES DE VIDRIO	MATERIALES BIOLOGICO	REACTIVOS	EQUIPOS
Vasos de precipitado 200 ml	100 g de hígado fresco de cerdo	Solución de KOH 30% 50 ml	Balanza analítica (1)
Vasos de precipitado de 1000 ml (vidrio y plástico)		Solución de tricloroacetico TCA 10%.	Incubadora
Erlenmeyers 250 ml		50 ml Solución saturada de Na2SO4	Centrifuga y tubos
Pipetas de 5 y 10 ml		Solución amortiguadora: tampón fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,005 M pH	Estufas (1)
Agitadores de vidrio		Reactivo de Fehling A y B.	Mallas
micro pipetas		Reactivo de tollens.	
Probetas 100 ml		10 ml de tolueno	
Vidrio reloj		Reactivo de Benedict	
espátulas		Acido acético glacial	
Tubos de ensayo		hielo	
gradillas		Sacarosa , Lactosa	
Pinzas para tubos de ensayo		Diastasa 2%	
		Tollens	
		Fehling A y B.	

Tabla 26: reactivos de la práctica 5.

Software a utilizar en la practica

No hay un software recomendado, en internet, el estudiante puede consultar videos ilustrativos de las pruebas a realizar.

Como complemento a la fundamentación teórica, se recomienda revisar las siguientes presentaciones virtuales:

Presentación: Generalidades de Carbohidratos haciendo clic en el siguiente enlace:

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/GENERALIDADES%20SOBRE%20CARBOHIDRATOS.zip

Objeto de Aprendizaje virtual: Estructura ciclica de carbohidratos.

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/ESTRUCTURA%20CICLICA%20DE%20LOS%20CARBOHIDRATOS_1.zip

Presentación Glucógeno:

https://dl.dropboxusercontent.com/u/51764879/glucogeno.ppsx

Dar clic en los archivos Index html.

Seguridad industrial

REACTIVO	PROTECCION	RIESGO
Proceso de digestión con KOH al 30%	Gafas de seguridad, tapabocas.	 Irritante

Metodología

Conocimiento previo para el desarrollo de la práctica:

Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 7, Metabolismo de glúcidos.

Forma de trabajo: Estimado estudiante a continuación encontrará los pasos a seguir para el desarrollo de la práctica #5 del curso.

La metodología es la siguiente:

Quiz de laboratorio individual #3:

En esta práctica **no** hay preinforme, en su lugar el estudiante se prepara para un Quiz escrito.

La temática a evaluar es: Modulo: Lección 10: Clasificación y Propiedades Fisicoquímicas 10.1 Clasificación de proteínas (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas).

El contenido y forma de pregunta queda a disposición del tutor asignado de los laboratorios del curso.

Trabajo grupal

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Procedimiento:

EXTRACCION DE GLUCOGENO		**OBSERVACIONES**
Pese un erlenmeyer de 50 ml. Se ponen 3 ml de la solución de hidróxido potásico al 30% en un erlenmeyer de 50 ml. Se pesan 8 g de tejido (aproximadamente) y se introducen en el erlenmeyer. Se pesa este conjunto. Se calienta en un baño de agua hirviendo, agitando con cuidado para acelerar el proceso, durante 20 minutos (o hasta su digestión). Se enfría el tubo una vez acabada la digestión. Una vez enfriado el tubo de se añaden 0,2 ml de la solución saturada de Na2SO4 y se mezclan fuertemente. Reposar 5 minutos. Se precipita el glucógeno que está en solución por adición de 7 m de etanol al 95%. Se agita y deja en frío en un baño de hielo durante 5 minutos.		
Primera centrifugación:	Se pesan los tubos de centrifuga. Se pasa la solución a tubos de centrífuga se centrifuga 3000 rpm durante 5 minutos. Se desecha el **sobrenadante** Se añaden 5 ml de la solución de TCA al 10% al tubo y se disuelve totalmente el sedimento agitando fuertemente.	
Segunda centrifugación:	Se centrifuga de nuevo. Se añade el **sobrenadante** a un tubo de ensayo largo, al que previamente se han añadido 10 mL de etanol al 95%, **desechando el sedimento de la centrifugación**. Se deja reposar 5 minutos para que se produzca la precipitación del glucógeno.	

Tercera centrifugación:	Se traslada la solución al tubo de centrífuga previamente pesado, y se centrifuga durante 5 minutos Una vez acabada la centrifugación se **tira el sobrenadante**. El sedimento obtenido representa el glucógeno prácticamente exento de sustancias contaminantes. Secar en la estufa a 35°C hasta su utilización.	
Cantidad de glucógeno	Se pesa en la balanza el tubo con el glucógeno desecado, obtenido en la parte anterior, y se anota el resultado.(determinar la cantidad de glucógeno obtenido).	
Solución de glucógeno	De acuerdo a la cantidad de glucógeno obtenido hacer la siguiente relación: 8 mg de glucógeno por 0.5 ml de solución tampón fosfato 0,02 M pH 7,0 que contenga NaCl 0,005 M, De esta manera queda preparado el glucógeno para las siguientes determinaciones.	

Hidrólisis enzimática del glucógeno por la enzima alfaamialsa o diastasa.

prueba	procedimiento en un tubo de ensayo colocar:	cantidad a adicionar:	Anote aquí el resultado Obtenido.	Realice aquí apu importantes par análisis resultados.
Recolección de la alfa amilasa	Recoja 20 ml de alfa amilasa salival fresca.			
Adición de la alfa amilasa sobre el glucógeno (este procedimiento se repite reemplazando la alfa-amilasa salival por una solución de diastasa al 2%.	Tome cuatro tubos de ensayo y en cada uno agregue:			
	de solución de glucógeno	1 ml		
	solución de saliva	3 ml		
	Incubar a 37 ºC por 45 minutos			
	AL cabo del tiempo adicionar a caca tubo TCA (ácido tricloroacético `para parar la reacción)	1 ml.		
	Realice las pruebas respectivas para determinar los productos de la hidrólisis del almidón.			

Prueba de FEHLING	Solución A de Fehling	1 ml		
	Solución B de Fehling	1 ml		
	Agua destilada	1 ml		
	Solución de glucógeno + enzima	2 ml		
	Colocar el tubo en una solución de agua hirviendo por 5- 10 minutos			
Prueba de TOLLENS	Reactivo de tollens	2ml		
	Solución de glucógeno + enzima	2 ml		
	Agite los tubos y déjelo un baño de agua a 35º C, durante 5 minutos			
	Un espejo de plata o un precipitado negro es prueba positiva indica la presencia de glucosa proveniente de la hidrólisis del glucógeno.			

Tabla 27: Marcha de la práctica extracción de glicógeno.

Sistema de Evaluación

Evaluación individual:

- cada estudiante debe presentar en forma escrita el quiz 3.
- desempeño y desenvolvimiento durante la sesión de laboratorio

Evaluación grupal:

El grupo de trabajo debe presentar un informe de laboratorio en la fecha acordada por el tutor. (ver la descripción de "producto a entregar".

Informe o productos a entregar

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Rúbrica de evaluación

Tabla 28: Rúbrica de la práctica 5.

Ítem Evaluado	Valoración Baja	Valoración Media	Valoración Alta	Máximo P
Asistió y participó activamente del desarrollo de la práctica	El estudiante no asistió. **(Puntos = 0)**	El estudiante asistió pero su desempeño no fue en la habilidad del trabajo en grupo y desempeño de la práctica no fu excelente. **(Puntos =3.0)**	El estudiante participó de manera pertinente con la actividad durante el desarrollo del laboratorio **(Puntos = 7.0)**	3.2
Entrega del debido pre informe o presenta el debido quiz.	No hay entrega de los productos solicitados **(Puntos = 0)**.	Hay entrega de los productos solicitados pero su contenido no es pertinente. **(Puntos = 5.0)**	Hay entrega de los productos solicitados y contenido es pertinente. **(Puntos =10)**	3.2
Estructura del Informe escrito (¿tiene lo solicitado?, tiene normas APA?). Forma de la sustentación (tiene lo solicitado?).	El informe no presenta una excelente estructura. **(Puntos = 0)**	Aunque el informe presenta una estructura base, la misma carece de algunos elementos del cuerpo solicitado. **(Puntos = 0.5)**	El informe presenta una excelente estructura y presentación. **(Puntos =1.0)**	3.0
Profundidad y análisis del informe y/o sustentación.	El informe no da respuesta a los lineamientos de las prácticas de laboratorio. **(Puntos = 0)**	Aunque presenta resultados y análisis de resultados estos no son pertinentes. Se evidencia la ausencia de análisis y deducción. **(Puntos =4)**	El informe presenta una excelente articulación entre los resultados y el análisis de resultados. Se evidencia la profundidad de los análisis. **(Puntos = 8)**	6.6
TOTAL DE PUNTOS POSIBLES				**16**

Nota: La puntuación anterior esta pondera de acuerdo a: 6 sesiones de laboratorio/100 puntos= 16,6666. Se debe hacer la siguiente conversión para dar la calificación en escala de 0.0-5.0: puntos obtenidos*5.0/16

Retroalimentación

El tutor de la práctica tendrá diez (10) días hábiles para envía o entregar la respectiva retroalimentación del informe de laboratorio siguiendo lo estipulado en la rúbrica de evaluación.

PRACTICA No. 6 - RECONOCIMIENTO CUALITATIVO DE LIPIDOS

Tipo de practica	Presencial [ ] Autodirigida [ ] Remota [ ]
Porcentaje de evaluación	17%
Horas de la practica	3 H
Temáticas de la práctica	Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 8, Metabolismo de lípidos.
Intencionalidades formativas	**Propósitos** Reconocer los diferentes tipos de lípidos que se encuentran en los tejidos biológicos. Analizar, mediante reacciones cualitativas la presencia de algunos de los tipos de lípidos como fosfolípidos, ácidos grasos, colesterol y glucolipidos en cada una de las muestras. Establecer relaciones entre la estructura y la función de las los lípidos y su participación en los diferentes procesos metabólicos. **Objetivos** Que el estudiante reconozca los diferentes tipos de lípidos que se encuentran en los tejidos biológicos. Que el estudiante analice los resultados obtenidos en las reacciones cualitativas, la presencia de algunos de los tipos de lípidos como fosfolípidos, ácidos grasos, colesterol y glucolipidos en cada una de las muestras. Que el estudiante establezca relaciones entre la estructura y la función de las los lípidos y su participación en los diferentes procesos metabólicos. **COMPETENCIAS** El estudiante describe y analiza de manera eficiente los resultados observados en cada prueba cualitativa y relaciona el marco teórico y los resultados para dar el respectivo análisis. El estudiante conceptualiza en forma precisa la relación que tiene

	cada prueba y la estructura y función con el tipo de lípido. El estudiante comunica los conocimientos adquiridos a través de la elaboración de informes escritos. **Metas** Al finalizar la práctica #11: El estudiante obtendrá su calificación del respectivo pre informe personal como resultado del estudio independiente. El estudiante resolverá los respectivos cuestionarios dados. El estudiante presentará en forma escrita el informe del respectivo laboratorio en forma grupal en donde sobresalga el análisis de resultados.

Fundamentación Teórica

Marco teórico

El estudiante como parte de su autogestión en el desarrollo de su aprendizaje autónomo, se servirá investigar antes de la práctica y a manera de **pre informe** los siguientes temas, enfatizando en la reacciones químicas que tienen lugar y el principio del método:

1. Qué son los lípidos simples compuestos, ejemplos de cada caso.
2. Qué es el colesterol, cuál es la importancia biológica del colesterol, estructura del colesterol, que pruebas coloreadas existen para identificar el colesterol. a qué tipo de lípidos pertenece el colesterol.
3. que son los fosfolípidos, Cuál es la estructura química de los fosfolípidos, cuál es la importancia biológica de los fosfolípidos.
4. composición química de la yema de huevo, que tipo de fosfolípidos tiene?.

Descripción de la practica

En esta práctica se extraer y separar entre sí lípidos compuestos de la yema de huevo y reconocerlos y se reconocen mediante su composición química.

Esta práctica se relaciona con la Unidad 3: Metabolismo: catabolismo y Biosíntesis de Biomoléculas, específicamente el capítulo 8, Metabolismo de lípidos.

Es de vital importancia para los estudiantes de la formación profesional y técnica de los programas de ingeniería de alimentos, agroforestal, agronómica, zootecnia, producción animal y regentes de farmacia, el desarrollo de esta práctica, ya que profundizan y analizan la relación e importancia que guardan los lípidos en las reacciones del catabolismo y anabolismo para el aporte de energía metabólica. En esta práctica, los estudiantes profundizan en los diferentes tipos de lípidos que se encuentran en los tejidos biológicos.

Recursos a utilizar en la práctica (Equipos / instrumentos)

MATERIALES DE VIDRIO	MATERALES BIOLOGICO	REACTIVOS	EQUIPOS
Probeta de 100 ml	3 huevos	180 ml de etanol	Estufa y malla
Agitador de vidrio	20 gramos de cerebro fresco de res.	200 ml de éter	centrifuga
Vaso de precipitado de 600 ml		50 ml de KOH 1.5N	Perlas de vidrio
Vaso de precipitado de 1000 ml		50 ml de acetona	Varilla para reflujo
Vaso de precipitado de 600 ml plástico		50 ml de HNO3	Corchos con orificios
Vaso de precipitado de 1000 ml plástico		Solución de molibdato de amonio	Microcoscopio (1)
Vaso de precipitado de 50 ml		50 ml de acetona	Plancha de calentamiento
espátula		20 ml de etanol	Papel filtro
Erlenmeyer de 250 ml		20 ml de éter	mechero
Pipetas de 10 ml			
Soporte universal y pinzas.		10 ml de acetona	
Pinzas para la varilla refrigerante		10 ml de HNO3	
Pinzas para crisol		Solución de molibdato de amonio	
Crisol o cápsula mediana y pequeña.		30 ml de acetona	
Pinzas de madera		10 ml de HCl	
Embudos		50 ml de NaOH al 30 %	
		Reactivo Ay B DE Fehling	

Tabla 29: reactivos práctica 6

Software a utilizar en la practica

Ninguno.

Seguridad Industrial

REACTIVO	PROTECCION	RIESGO
Solventes orgánicos: acetona, éter	Gafas de seguridad, tapabocas.	
Ácidos inorgánicos concentrados	Gafas de seguridad, tapabocas.	

Metodología

Conocimiento previo para el desarrollo de la práctica:

1. Capítulo 1 y 2 de la Unidad 1: Biomoléculas del módulo del curso**.**

Forma de trabajo: Estimado estudiante a continuación encontrará los pasos a seguir para el desarrollo de la práctica #6 del curso.

Trabajo individual " preinforme":

El estudiante obtiene las guías de laboratorio, prepara un pre informe que contenga:

1. Qué son los lípidos simples compuestos, ejemplos de cada caso.
2. Qué es el colesterol, cuál es la importancia biológica del colesterol, estructura del colesterol, que pruebas coloreadas existen para identificar el colesterol. a qué tipo de lípidos pertenece el colesterol.
3. que son los fosfolípidos, Cuál es la estructura química de los fosfolípidos, cuál es la importancia biológica de los fosfolípidos.
4. composición química de la yema de huevo, que tipo de fosfolípidos tiene?.
5. diagrama de flujo de la marcha de la práctica y tabla de resultados en blanco.

Entréguelo a su tutor de laboratorio en formato Word (no se debe evidenciar copias tácitas de internet) o a mano alzada.

Trabajo grupal

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Procedimiento #1: reconocimiento de colesterol y fosfolípidos a partir de la yema de huevo

Preparar una solución de alcohol éter así: 40 ml de alcohol y 20 ml de éter.

Tome un huevo, hacer un orifico en uno de los extremos y a través de él deje salir la clara. Luego transfiera la yema a un vaso de precipitado que contenga una mezcla de 40 ml de etanol y 20 ml de éter, disuelva bien la yema, agitando durante 10 minutos, filtre a través de papel filtro y recoja el filtrado en un vaso de precipitado seco.

Prepare una solución de mezcla de etanol- éter (2:1), tome 14 ml de etanol y mezcle con 7 ml de éter.

Lave el residuo con 20 ml de de la mezcla de etanol- éter (2:1).

Evapore a sequedad el filtrado anterior sobre una plancha de calentamiento o a baño maría, cuidando de no dejar quemar el residuo. Disuelva el residuo en 5 ml de éter y viértalo poco a poco y agitando en un vaso de precipitado que contenga 20 ml de acetona. Se debe formar un precipitado que generalmente es fosfolipidos. Centrifugue y recoja el sobrenadante en un vaso de precipitado de 50 ml. El precipitado debe recogerlo guardarlo para la prueba de fosfolipidos.

1.1 Reconocimiento de colesterol

Evapore el liquido anterior a baño maría, hasta que se forme una pasta Agregue 15 ml de de solución de KOH al 1.5 N, agite bien y transfiera a un erlenmeyer de 250 ml y deposite en él perlas de vidrio y caliente la mezcla a reflujo durante 20 minutos. Enfriar y añadir 20 ml de éter, agitar durante 10 minutos y centrifugar. El precipitado es jabón, descartar. Guardar el sobrenadante que contiene colesterol.

Tome el sobrenadante, evapórelo en una baño de vapor, lejos de la llama, cuando ya quede sólo el residuo, adicionar

5 ml de alcohol y pasar la solución a un tubo de centrifuga y centrifugar durante 5 minutos. Pasar el líquido sobrenadante a otro tubo de centrifuga y añadir agua gota a gota hasta que se forma bastante precipitado. Dejar en reposo durante 15 minutos y centrifugar nuevamente y decantar el líquido sobrenadante, guardar y marcar como sobrenadante de colesterol. Recoger el precipitado.

1.2 Reconocimiento de fosfoglicéridos o fosfolípidos

Utilice el resto del precipitado. Paséelo a un crisol y caliente sobre un mechero hasta convertirlo completamente en cenizas. Disolver el residuo en 5 ml de agua destilada y 5 gotas de HNO_3 concentrado, filtren y agregue al filtrado 1 ml de solución de Molibdato de amonio. Observe la coloración y la formación de precipitado.



Cuestionamientos que sirven de guía para la redacción del análisis de resultados:

- Describa microscópicamente el colesterol
- es el colesterol una sustancia saponificable? explique su respuesta.
- que significa la prueba del glicerol sobre los lípidos de la yema de huevo?
- que significa la prueba para fosfato sobre los lípidos de la yema de huevo?
- Explique los resultados.

Sistema de Evaluación

Evaluación individual:

- cada estudiante debe presentar en forma escrita u oral lo solicitado en el pre informe.
- desempeño y desenvolvimiento durante la sesión de laboratorio

Evaluación grupal:

Hay dos formas de presentar el informe de laboratorio. La forma definitiva deber ser concertada entre el tutor asignado y el grupo de estudiantes:

- Informe escrito: mediante entrega personal al tutor de laboratorio: el contenido será: objetivos, introducción, marco teórico (máximo 2 hojas), resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.
- Sustentación Oral con ayudas audiovisuales: el contenido será: objetivos, resultados (tabulados, se puede incluir registros fotográficos), confrontación de resultados y marco teórico para dar el respectivo análisis de resultados, conclusiones, bibliografía.

Rúbrica de evaluación

Ítem Evaluado	Valoración Baja	Valoración Media	Valoración Alta	Máximo Puntaje
Asistió y participó activamente del desarrollo de la práctica	El estudiante no asistió. (Puntos = 0)	El estudiante asistió pero su desempeño no fue en la habilidad del trabajo en grupo y desempeño de la práctica no fu excelente. (Puntos =3.0)	El estudiante participó de manera pertinente con la actividad durante el desarrollo del laboratorio (Puntos = 7.0)	3.2
Entrega del debido pre informe o presenta el debido quiz.	No hay entrega de los productos solicitados (Puntos = 0).	Hay entrega de los productos solicitados pero su contenido no es pertinente. (Puntos = 5.0)	Hay entrega de los productos solicitados y contenido es pertinente. (Puntos =10)	3.2
Estructura del Informe escrito (¿tiene lo solicitado?, tiene normas APA?). Forma de la sustentación (tiene	El informe no presenta una excelente estructura. (Puntos = 0)	Aunque el informe presenta una estructura base, la misma carece de algunos elementos del cuerpo solicitado.	El informe presenta una excelente estructura y presentación.	3.0

lo solicitado?).		(Puntos = 0.5)	(Puntos =1.0)	
Profundidad y análisis del informe y/o sustentación.	El informe no da respuesta a los lineamientos de las prácticas de laboratorio. (Puntos = 0)	Aunque presenta resultados y análisis de resultados estos no son pertinentes. Se evidencia la ausencia de análisis y deducción. (Puntos =4)	El informe presenta una excelente articulación entre los resultados y el análisis de resultados. Se evidencia la profundidad de los análisis. (Puntos = 8)	7.6
TOTAL DE PUNTOS POSIBLES				17

Tabla 30: Rúbrica de la práctica 6.

Nota: La puntuación anterior esta pondera de acuerdo a: 6 sesiones de laboratorio/100 puntos= 16,6666. Se debe hacer la siguiente conversión para dar la calificación en escala de 0.0-5.0: puntos obtenidos*5.0/16

Retroalimentación

El tutor de la práctica tendrá diez (10) días hábiles para envía o entregar la respectiva retroalimentación del informe de laboratorio siguiendo lo estipulado en la rúbrica de evaluación.

NOTAS

Separación de los constituyentes básicos de los tejidos biológicos

Debido a las diferencias químicas que existen entre las moléculas de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, éstas presentan diferente solubilidad en solventes orgánicos y además en ácidos semejantes al tricloroacetico (ATA) de acuerdo con la temperatura. Es posible entonces utilizar tales solubilidades diferenciales para separarlos, una vez que los tejidos han sido triturados y se han roto sus membranas.

Nota 1: Acción del ácido tricloroacetico a baja temperatura sobre los tejidos biológicos

- **Sobre carbohidratos**

A baja temperatura los monosacáridos son estables en medio ácido, mientras que si se tratan en caliente, sufren deshidratación produciéndose los furfurales.

Los polisacáridos en medio ácido sufren hidrólisis del enlace glicosídico, reacción que aumenta su velocidad a medida que se eleva la temperatura. A temperaturas interiores a 4°C, la velocidad de hidrólisis es tan lenta que para fines prácticos se considera que no ocurre reacción.

En general se puede decir que los carbohidratos son solubles en solución de ácido tricloroacetico al 20% a temperaturas inferiores a 4°C y que no sufren cambios químicos en estas condiciones.

- **Sobre lípidos**

Según sus propiedades fisicoquímicas, estos compuestos son poco solubles en soluciones acuosas y no son extraídos si se trata el tejido con soluciones acuosas de ácido tricioroacético.

- **Sobre proteínas**

Forman sales insolubles en ácidos como tricloroacetico o perclórico, por tanto no son solubles en soluciones de ácido tricloroacetico al 20% en frío.

- **Sobre ácidos nucleicos**

Lo mismo que las proteínas, estos ácidos son insolubles en soluciones frías de ácido tricloroacetico. Por otra parte el ácido desoxirribonucleico (DNA) está unido a histonas, lo cual lo hace más insoluble en estas condiciones.

En conclusión, al tratar un tejido previamente triturado con ácido tricioroacético al 20% y a 4°C y someter a centrifugación la suspensión resultante, en el sobrenadante se obtienen los azúcares, mientras que los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos quedan en el residuo.

Nota 2: Acción del etanol-éter-cloroformo (2: 2: 1 v/v) sobre los tejidos.

Si el residuo de la extracción con ácido tricloroacetico a 4°C, se trata con solución de etanol-éter-cloroformo, al solvente solo pasan los lípidos, mientras que las proteínas y los ácidos nucleicos quedan en la fase sólida.

Nota 3: Acción del cloruro de sodio al 10% en caliente sobre los tejidos.

Si el residuo anterior se suspende en una solución de NaCI al 10% y se calienta en baño maría (92°C) durante 40 minutos, se desnaturalizan las proteínas, en tanto que los ácidos nucleicos, principalmente el ribonucleico (RNA), quedan en solución. Por este procedimiento es posible separar las proteínas de los ácidos nucleicos. Si al sobre nadante se le agrega ahora etanol absoluto en un volumen igual al doble de la solución original y se enfría en baño de hielo durante 10 minutos, se obtiene un precipitado que puede ser separado por centrifugación y que contiene los ácidos nucleicos.

CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DE DIFERENTES TEJIDOS

Carbohidratos

Los organismos vivos contienen carbohidratos que pueden estar formando polisacáridos de reserva, pueden ser componentes estructurales o pueden estar participando en el metabolismo en forma monomérica.

Las propiedades químicas de tales compuestos permiten diferenciarlos, así:

- Los polisacáridos son solubles en soluciones acuosas ácidas, pero insolubles en etanol.
- Los polisacáridos como el almidón, el glicógeno y los dextranos, forman compuestos coloreados característicos cuando se combinan con yodo molecular.

A pesar de que la naturaleza de estos complejos no está bien definida, la evidencia disponible indica a formación de complejos de absorción entre las cadenas helicoidales del polisacárido y el yodo. Para que haya estructura helicoidal se necesita por lo menos una cadena con ocho unidades de monosacárido.

Los polisacáridos que a todo lo largo de su molécula muestran estructura helicoidal, dan coloración azul intensa, ej. la amilosa. Aquellos que son ramificados con hélices interrumpidas, producen coloraciones menos intensas, ej. la amilopectina. Los altamente ramificados con segmentos cortos de ramificación, producen color pardo o rojizo, ej. el glicógeno.

Nota 4: Reacción de Molisch: Un azúcar tratado con a-naftol y ácido sulfúrico concentrado, produce una coloración violeta. Se presume que el ácido sulfúrico actúa como deshidratante formando derivados del tipo de los furfurales que reaccionan con el a-naftol para dar productos coloreados.

Nota 5: Reacción de Benedict : Azúcares reductores tratados con solución alcalina suave (citrato-carbonato de sodio) de ión cúprico, lo reducen a óxido cuproso de color ladrillo.

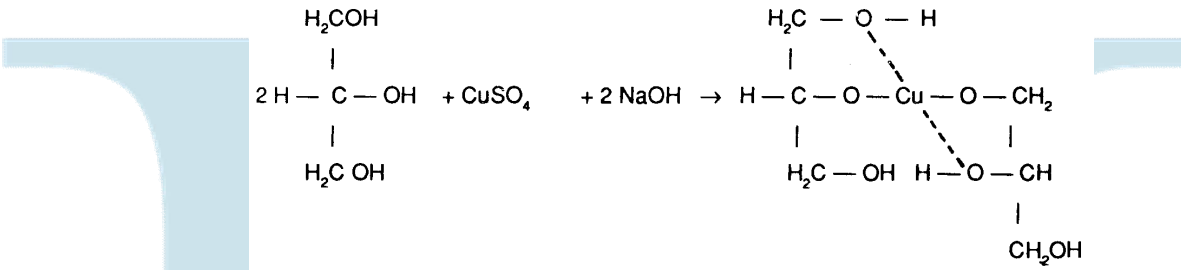
Lípidos

En cuanto a solubilidad, los lípidos son insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos. Los triglicéridos forman un complejo coloreado (vino tinto) con el ácido hidroxámico y el hierro en medio ácido y oxidante.

Los hidroxiesteroides con insaturación en la posición 5 reaccionan con el anhídrido acético para dar ésteres, que en medio sulfúrico se deshidratan produciendo una coloración verde.

Los fosfolípidos por acción del NaOH se hidrolizan produciendo fosfatos inorgánicos, que con el ácido molíbdico dan fosfomolibdato y estos, por acción de reductores como el ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico o el ácido ascórbico, producen complejos de óxidos de molibdeno de color azul.

Si los jabones resultantes de la hidrólisis alcalina se someten a la acción del éter, los jabones se sedimentan y en el sobrenadante queda el glicerol. Los compuestos que en su estructura tienen grupos $(> CHOH)_n$ forman complejos con iones metálicos como el Cu^{+2} por tanto si el sobrenadante anterior se evapora al baño de maría el residuo se disuelve en agua caliente y se acidifica con HCI; si los jabones no se habían separado totalmente, los ácidos grasos de estos se separan en una capa insoluble en agua. Después de evaporar la capa acuosa, el residuo se disuelve en etanol y por la adición de solución de sulfato de cobre se formará un quelato de cobre de color verde, luego de agregar NaOH 0.1 N.



Nota 6: Ácidos nucleicos: Hidrólisis

Los álcalis diluidos (0.3 a 1.0 N) hidrolizan los enlaces éster del ácido ribonucleico.

En cambio los enlaces éster del ácido desoxirribonucleico son relativamente estables, lo mismo que los enlaces N-glicosídicos de DNA y RNA. La facilidad de hidrólisis en el RNA parece estar asociada a la presencia de hidroxilos en los carbonos 2' y3', lo cual permite la formación de intermedios cíclicos 2', 3'-fosfonucleótidos, que finalmente dan los complejos monofosfonucleótidos- 2' o 3'. Como la deoxirribosa del DNA no forma tales intermediarios, es relativamente estable en presencia de álcali diluido. La acidificación de la solución después del tratamiento alcalino precipita las moléculas de DNA intactas.

Los nucleótidos obtenidos en la hidrólisis anterior fluorecen a la luz ultravioleta.

Con orcinol: Los nucleótidos del RNA, debido a la presencia de ribosa, reaccionan con el reactivo ácido de orcinol (cloruro férrico en HCI concentrado + solución alcohólica de orcinol), dando coloración verdosa.

Nota 7: Desnaturalización de proteínas

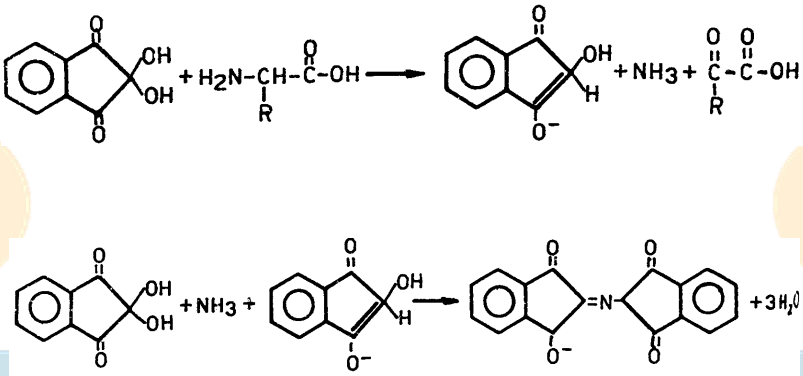
Por acción de pHs extremos se destruyen los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura secundaria de las proteínas. Las proteínas a temperaturas mayores de 50°C precipitan, por formación de agregados que resultan de la destrucción de la estructura secundaria y terciaria.

Millon

Las proteínas que contienen tirosina reaccionan con mercurio disuelto en ácido nítrico, produciendo nitroderivados mercuriales de color rojo.

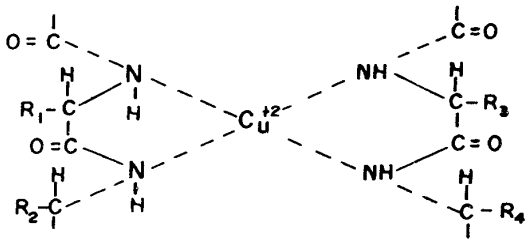
Ninhidrina

Los grupos amino terminales de las proteínas reaccionan con la ninhidrina en caliente, dando complejos de color violeta. En ellos, el amoníaco desprendido reacciona con una molécula de ninhidrina en estado oxidado y con otra en estado reducido.



Biuret

Los nitrógenos del enlace peptídico forman complejos coloreados con los iones cúpricos en medio alcalino.



Reacción Xantoproteica

Esta reacción se basa en la nitración del anillo bencénico por el HNO_3 concentrado, dando derivados amarillos de nitrobenceno. Las proteínas que contienen tirosina y triptófano dan esta reacción, pero el color amarillo resultante se transforma en naranja si se le adiciona NH_4OH. Para nitrar la fenilalanina se requiere H_2SO_4 como catalizador.

EXTRACCIÓN DE LA YEMA DE LÍPIDOS DEL HUEVO

La separación de los lípidos es extremadamente difícil por extracción con vanos solventes orgánicos puros. Se hace uso de la propiedad que tienen la mayoría de los lípidos de ser solubles en mezclas de etanol: éter o etanol: cloroformo. La yema de huevo contiene buenas cantidades de grasas neutras, lecitinas y colesterol.

Las lecitinas tienen un pH aproximadamente neutro, ya que contienen grupos ácidos (HPO_4^{-2}) y básicos (Colina) formando Zwiteriones muy polares. Se dispersan coloidalmente en agua en contraste con las grasas neutras que no se emulsionan. Las lecitinas se precipitan a partir de una solución etérea por adición de acetona y su reconocimiento se basa en un test para saponificación y en un test para Colina. Las esfingomielinas también tienen Colina pero son solubles en éter y se presentan en cantidades despreciables en el huevo crudo.

El colesterol no precipita por tratamiento con acetona de una solución etérea y como no es saponificable después del tratamiento con KOH puede extraerse con éter, en tanto que los triglicéridos se han saponificado dando jabones solubles en agua. Para el reconocimiento del colesterol se aplica el test de Liebermann-Burchard. El colesterol requiere de 15 a 20 minutos para el desarrollo de un color verde profundo, precedido de un color lila.

Se requieren condiciones completamente anhidras para esta reacción.

Nota 7: Ácidos hidroxámicos: A una fracción de las muestras, agregue 1 ml de hidroxilamina al 10% a la cual se le ha incorporado 0.01% del indicador timolftaleína. Adicione lentamente solución de NaOH al 10% hasta color azul permanente. Caliente en baño maría por 10 minutos, enfríe al chorro y adicione HCI al 10% lentamente y con agitación, hasta desaparición del color azul. Agregue unas 2 gotas del mismo ácido en exceso. Por último adicione 0.5 ml de solución de $FeCl_3$ al 5%. Observe los cambios de coloración que ocurren y anote los resultados.

Nota 8: Prueba de Lieberman-Burchard: Tome una fracción de cada una de las muestras, agrégueles 3 ml de cloroformo, mezcle bien. Agregue después 1 ml de anhídrido acético, agite y adicione con cuidado 3 gotas de ácido sulfúrico, por las paredes del tubo. Observe la coloración en la interfase al minuto y a los 15 minutos. Explique.

Nota 9: Saponificación: A una cantidad análoga a la anterior de las fracciones, agregue 3 ml de NaOH al 15% coloque en la boca del tubo una estera de vidrio y ponga al baño maría durante 20 minutos. Añada 15 ml de éter etílico y filtre los jabones resultantes. Después de la hidrólisis neutralizar con ácido acético al 10% usando fenolftaleína como indicador.

Nota 10: Colina: A 10 ml del filtrado anterior añadir 6 ml de Reineckato de amonio al 2% en etanol y colocarlo en nevera por 30 minutos hasta que cristalice.

7. FUENTES DOCUMENTALES

Miguez, J. (1997). Prácticas de Bioquímica. Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Munera, R: (2008). GUÍA PARA PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA. Palmira: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

Pérez, G. Navarro, Y. (1992). Bioquímica. Santa Fe de Bogotá DC: Unisur.

Plummer, D. (1981). Bioquímica Práctica. Londres: Editorial McGraw-Hill.

Rawn, J (2005). Bioquímica. Madrid: Interamericana-McGraw_Hill.

Rodney, B. (1999). El ciclo del ácido cítrico. En B. Rodney, *Conceptos de Bioquímica* (págs. 489-494). México: International Thomson Editores S.A de C.V.

Universidad Nacional de Colombia (2003). Laboratorio de Bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional.

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Voet, V. (2004). Bioquímica, tercera edición. Montevideo, Uruguay.: Editorial Médica panamericana. Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.

Baynes, J. Dominiczak, M (2011). Bioquímica Médica. Tercera Edición.. Barcelona, España.: Elsevier, Mosby. Ubicación: Google libros.

Campbell, M. Farrell, S. (2003). Bioquímica. México. Thomson Editores. Cuarta Edición.

Ubicación: Google libros/ biblioteca virtual UNAD.