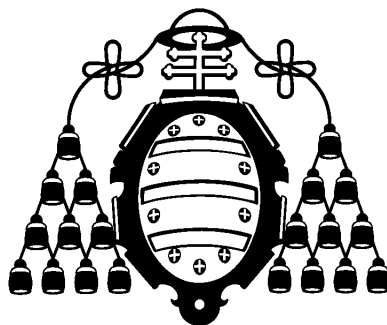


DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN FISIOTERAPIA  
PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA

Curso ..... / .....

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

22 de mayo de 2014  
Fis-Bioq-ng  
Laboratorio de Prácticas

## Normas generales

1. Las prácticas empiezan todos los días a la hora estipulada. Por favor, sea puntual.
2. El uso de la bata es obligatorio (algunos reactivos pueden ser corrosivos).
3. Sea cuidadoso con el material. Compruebe el primer y último día que el material está completo, según la lista que se adjunta. Si falta algo, comuníquelo de inmediato a los profesores de prácticas.
4. Antes de cada práctica, lea cuidadosamente el guión que le corresponde.
5. Al final de cada práctica, lave y guarde en la taquilla todo el material que haya utilizado.
6. Los tubos y pipetas se deben lavar con abundante agua corriente en el grifo, posteriormente aclararlos con agua destilada del frasco lavador, y luego dejarlos escurrir en posición invertida y estable.
7. Cada día se deberá presentar el cuaderno en el que se recojan los procedimientos, resultados y conclusiones de la práctica correspondiente. Complete **todos** los apartados en el laboratorio o en casa.

## MATERIAL DE LABORATORIO

Pipetas de 10 o 5 ml	3
Pipetas de 1 o 0,5 ml	3
Probeta de 100 ml	1
Frasco lavador	1
Vasos de precipitado de 250 o 100 ml	2
Tubos Falcon	7
Gradillas	2
Tubos de ensayo	20
Propipeta	1

# Índice general

1. Preparación de tampón fosfato y medida electrométrica del pH	1
2. Espectro de absorción	5
3. Efecto del pH sobre la actividad de una fosfatasa	9
4. Valoración enzimática de la glucosa: recta patrón	12

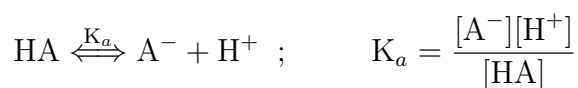
# Práctica N<sup>o</sup> 1

## Preparación de tampón fosfato y medida electrométrica del pH

### 1.1. Introducción.

Una disolución tampón es aquella que se opone a los cambios de pH cuando se le agregan concentraciones relativamente pequeñas de un ácido o una base. En la práctica, las disoluciones tampón consisten generalmente en una mezcla de un ácido, o base, débil y su sal (ácido débil y base conjugada o base débil y ácido conjugado).

En una disolución de un ácido débil (HA) y de su sal o base conjugada ( $A^-$ ), los iones  $H^+$  añadidos son neutralizados por los aniones de la sal ( $A^-$ ), la cual actúa por tanto como una base débil, y a la inversa, los iones  $OH^-$  añadidos resultan eliminados por neutralización con el ácido (HA), con lo que el pH de la disolución tampón *apenas* varía.



El pH de la disolución tampón se puede calcular mediante la *ecuación de Henderson-Hasselbach*, deducida de la expresión anterior:

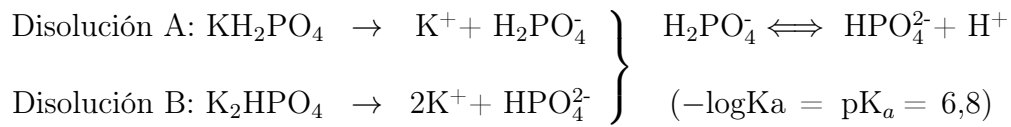
$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

donde la suma  $[A^-] + [HA]$  = concentración del tampón.

En la ecuación se puede observar que, para una concentración determinada, el pH del tampón depende no sólo del valor del pKa sino de la relación (cociente) entre las concentraciones molares de la base conjugada y el ácido débil.

La capacidad de tamponamiento, es decir, la resistencia que opone una disolución tampón a que su pH varíe por adición de bases o de ácidos, se puede medir determinando la concentración de ácido fuerte (HCl) o de base fuerte (NaOH) requeridos para, sin cambiar la concentración del tampón, alterar su pH en una unidad. La capacidad de tamponamiento aumenta con la concentración del tampón y, para una concentración determinada, es máxima cuando  $[base\ conjugada] = [ácido]$ , es decir, cuando  $pH = pK_a$ .

En esta práctica **se prepararán tres disoluciones de tampón fosfato** que tendrán la misma concentración pero distintos pHs, puesto que estarán formadas por la base conjugada ( $HPO_4^{2-}$ ) y el ácido débil ( $H_2PO_4^-$ ) mezclados en diferentes proporciones. Además, **se comprobará la variación del pH de dos de estas disoluciones** después de añadirles HCl.



## 1.2. Procedimiento.

1. Se les entrega una disolución de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M (disolución A) y otra de fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 M (disolución B). Las disoluciones de tampón fosfato se formarán mezclando ambas disoluciones en diferentes proporciones, según indica la tabla:

Tampón	Solución A (ácida)	Solución B (básica)
1	30,0 ml	3,0 ml
2	16,5 ml	16,5 ml
3	3,0 ml	30,0 ml

2. Antes de utilizar las disoluciones tampón, se rotularán tres tubos de ensayo (1, 2 y 3) y se retirarán 3 ml de cada una de ellas para su utilización en la práctica del día siguiente. Guardar dichos tubos en la taquilla.

3. Con la ayuda de un pH-metro, se medirá el pH de cada una de las tres disoluciones tampón y se anotará en la tabla de resultados (pH experimental).

4. Se añadirá 2,5 ml de HCl 0,2 N a los tampones 1 y 2 y se medirá su pH, anotándolo en la otra tabla de resultados. A continuación se calculará la diferencia de pH.

## 1.3. Resultados.

1.

Tampón	$\text{pH}_{\text{experimental}}$	$\text{pH}_{\text{teórico}}$
1		
2		
3		

Comparar el pH de cada tampón con el valor del pKa (6,8). ¿Cuál de los tres posee un pH más cercano a dicho pKa?:

2.-

	HCl 0,2 N	Tampón 1		Tampón 2	
	añadido	pH <sub>experimental</sub>	pH <sub>teórico</sub>	pH <sub>experimental</sub>	pH <sub>teórico</sub>
	0 ml				
	2,5 ml				
variación del pH	—				

¿Cuál de las dos disoluciones es mejor tampón? ¿Por qué? ¿A qué es debido?

3.- Una vez finalizada la parte experimental, y con el fin de comprobar si los resultados obtenidos concuerdan con los esperados, se procederá a realizar el cálculo de los pH, anotándolo en las tablas:

a) Cálculo del pH (teórico) de cada tampón antes de añadir el HCl:

$$(V_{inicial}C_{inicial} = V_{final}C_{final})$$

1

2

3

b) Cálculo del pH (teórico) de los tampones 1 y 2, después de la adición del HCl:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-] - [\text{H}^+]}{[\text{HA}] + [\text{H}^+]}$$

1

2



# Práctica N<sup>o</sup> 2

## Espectro de absorción

### 2.1. Introducción.

Algunas sustancias disueltas presentan determinados colores porque absorben luz de ciertas longitudes de onda comprendidas entre 400 nm y 700 nm (región visible del espectro) y dejan pasar luz de otras longitudes de onda. Existen otras sustancias, incoloras a simple vista, que son capaces de absorber luz ultravioleta de longitud de onda inferior a 400 nm o la luz infrarroja con longitud de onda superior a 700 nm. Cada sustancia absorbe energía radiante de una u otra longitud de onda, siendo ésta una propiedad característica de dicha sustancia, tan invariable como pueden ser los puntos de ebullición o de fusión y que permite por lo tanto su identificación, además de su cuantificación.

Cuando se hace incidir un rayo de luz monocromática de una determinada longitud de onda ( $\lambda$ ), e intensidad inicial  $I_0$ , sobre una disolución de una sustancia colocada en una cubeta o tubo transparente, parte de la luz puede ser absorbida, en cuyo caso la intensidad de la luz transmitida,  $I$ , será menor que  $I_0$ . La absorbancia es *directamente proporcional* a la concentración de soluto y a la longitud del paso óptico ( $l$ ), de acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

siendo:

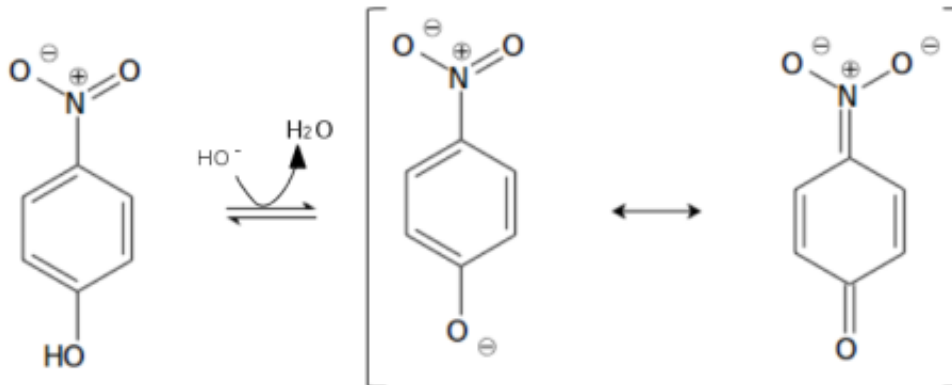
A	= Absorbancia;
$I_0$	= Intensidad de la luz incidente;
I	= Intensidad de la luz transmitida;
T	= Transmitancia (proporción de la luz incidente que es transmitida);
$\epsilon$	= Coeficiente de extinción molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ): absorbancia de una sustancia 1 M a un pH y $\lambda$ determinados cuando se mide en una cubeta de 1 cm de paso de luz.
c	= Concentración del soluto (mol/l);
l	= Longitud del paso de luz o paso óptico (suele ser 1 cm).

Para obtener el espectro de absorción de una sustancia se determina la absorbancia de una disolución de dicha sustancia a distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ).

La absorbancia de una disolución se determina en un aparato denominado espectrofotómetro o bien en un colorímetro, los cuales constan esquemáticamente de los componentes que muestra la figura 2.1.

El espectro de absorción de una sustancia depende de sus propiedades físicas y químicas. La absorbancia puede variar por modificaciones del pH, por el estado de óxido-reducción, por el solvente utilizado, etc.

En esta práctica, se **determinará el espectro de absorción del p-nitrofenol**. Este compuesto se disocia como se muestra en el esquema siguiente:



La forma no disociada, que está presente en medio ácido, no absorbe en el rango visible mientras que la disociada, presente en un medio alcalino, sí lo hace.

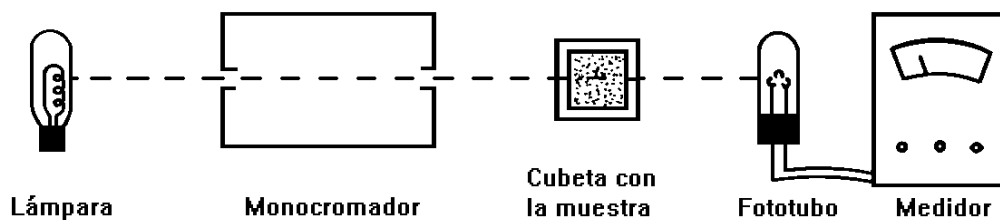


Figura 2.1: Esquema de un colorímetro

## 2.2. Procedimiento.

Se toman los 3 tubos de ensayo que contienen los 3 ml de cada una de las disoluciones tampón preparadas en la práctica anterior y un cuarto tubo con 3 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M y a cada uno de ellos se les añaden 0,1 ml de una disolución de p-nitrofenol 0,75 mM.

Con el cuarto tubo determínese el espectro de absorción del p-nitrofenol. Para ello se selecciona la longitud de onda de 360 nm en el colorímetro y se comprueba que la

aguja de la escala marca  $\infty$  de absorbancia. A continuación, se introduce un tubo del colorímetro conteniendo 3 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M y se ajusta el aparato para asignarle cero de absorbancia. Este tubo actúa como *blanco*, permitiendo restar, para cada longitud de onda, la absorbancia correspondiente a todos los componentes excepto el p-nitrofenol. Finalmente, se introduce otro tubo del colorímetro conteniendo la disolución de p-nitrofenol en carbonato sódico y se anota el valor correspondiente a su absorbancia. Repetir el proceso a 380, 390, 400, 410, 420, 440, 460, 480 y 500 nm.

Representar gráficamente (en la mitad de la página siguiente) los valores de absorbancia frente a la longitud de onda. Indicar cuál es la  $\lambda$  a la que el p-nitrofenol presenta un máximo de absorción y calcular, con el valor máximo de absorbancia, su coeficiente de extinción molar aplicando la ecuación de Lambert-Beer.

**Compruébese la influencia del pH del medio en la aparición del color del p-nitrofenol**, midiendo su absorbancia en las tres disoluciones tampón del experimento del día anterior. Para ello habrá que seleccionar la  $\lambda_{\text{máx}}$  y después ajustar el cero de absorbancia con los 3 ml del carbonato sódico. Representar (en la otra mitad de la página siguiente) dicha absorbancia frente al pH experimental de cada una de las 3 disoluciones tampón.

### 2.2.1. Resultados.

1. Determinación del espectro de absorción del p-nitrofenol:

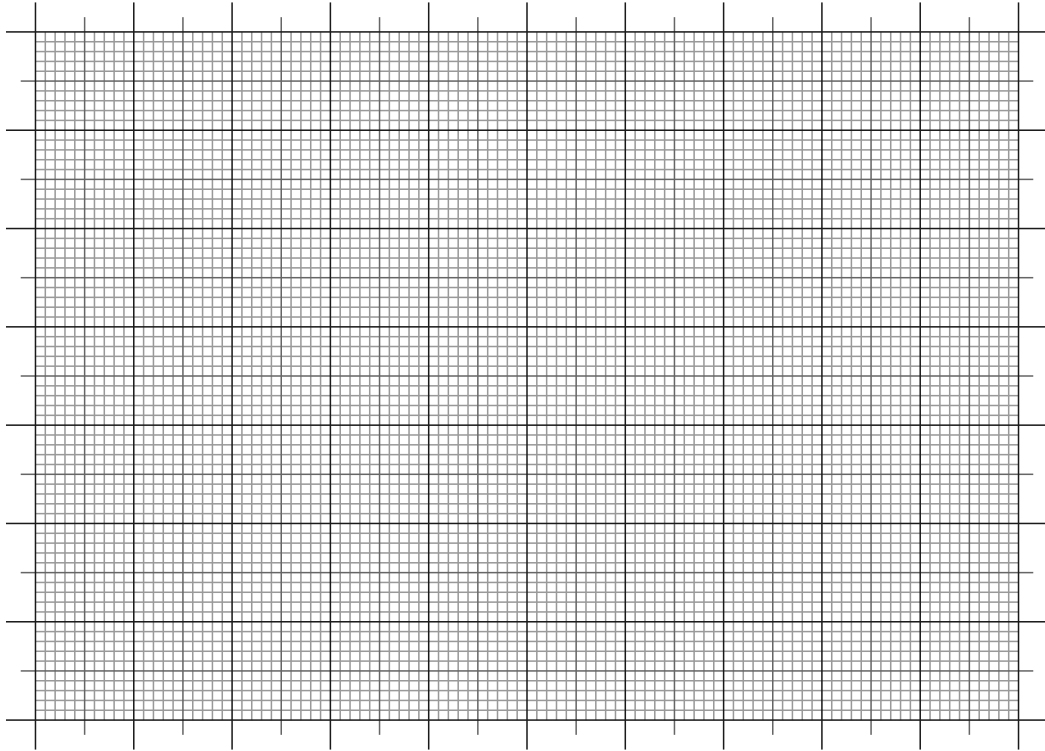
$\lambda$ (nm)	A	$\lambda$ (nm)	A
360		420	
380		440	
390		460	
400		480	
410		500	

2. Cálculo del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del p-nitrofenol:

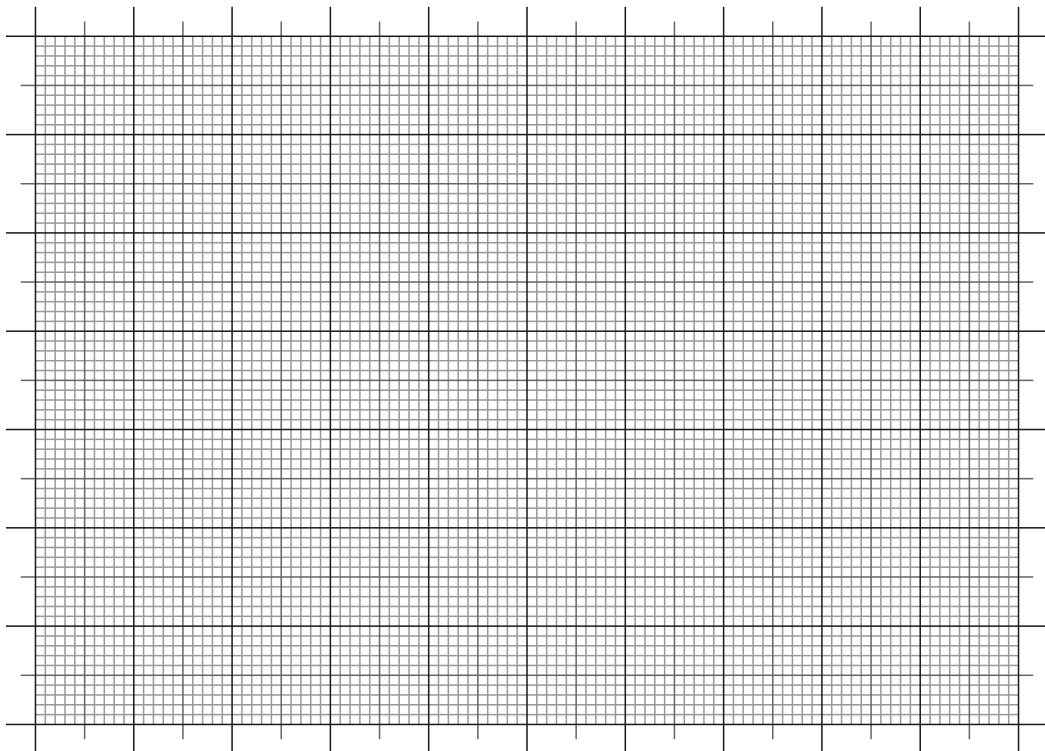
3. Influencia del pH del medio en la aparición del color del p-nitrofenol:

	pH	A ( nm)
Tampón 1		
Tampón 2		
Tampón 3		

**Título:**



**Título:**



# Práctica N<sup>o</sup> 3

## Efecto del pH sobre la actividad de una fosfatasa

### 3.1. Introducción.

La mayor parte de los enzimas poseen un pH característico al que su actividad es máxima: por encima y por debajo de ese pH la actividad disminuye. En esta práctica se va a averiguar el pH óptimo al que actúa una fosfatasa. Este enzima cataliza la reacción siguiente:



#### 3.1.1. Determinación del pH óptimo de la fosfatasa.

Con objeto de averiguar el pH óptimo al que tiene lugar la hidrólisis del *p*-nitrofenil-fosfato catalizada por la fosfatasa, se incuban a 30°C concentraciones fijas de enzima y de sustrato en diferentes tubos a diferentes pHs.

En el tubo cuyo pH sea óptimo para la acción de la fosfatasa, la cantidad de *p*-nitrofenil-fosfato hidrolizado será mayor, y por tanto, el *p*-nitrofenol formado será más elevado.

#### 3.1.2. Determinación de la actividad de la fosfatasa.

La determinación de la actividad de la fosfatasa se realiza a partir de la medida de la absorbancia del *p*-nitrofenol formado por acción del enzima sobre el sustrato, durante un período de tiempo determinado, en las condiciones de ensayo. El *p*-nitrofenol, como se expuso en la práctica n<sup>o</sup> 2, posee un color amarillo característico en disolución alcalina, con un máximo de absorbancia a 400 nm.

### 3.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo, colocarlos en la gradilla y poner en cada tubo los siguientes reactivos:

Tubo	Tampón a ensayar	Fosfatasa	Agua
1	0,6 ml de pH = 2	0,2 ml de 0,05 mg/ml	—
2	0,6 ml de pH = 3	”	—
3	0,6 ml de pH = 4	”	—
4	0,6 ml de pH = 5	”	—
5	0,6 ml de pH = 6	”	—
6	0,6 ml de pH = 7	”	—
7	0,6 ml de pH = 8	”	—
8	0,6 ml de pH = 9	”	—
Blanco	—	—	0,8 ml

A continuación, introducir la gradilla con los tubos conteniendo el tampón correspondiente y la fosfatasa en un baño graduado a 30°C.

Añadir a todos los tubos, **incluido el blanco**, 0,2 ml de *p*-nitrofenil-fosfato 50 mM con un **intervalo de 30 s** entre tubo y tubo. Mezclar bien los componentes con un agitador tras iniciar la reacción en cada tubo. Dejar transcurrir la reacción durante 15 min en estas condiciones.

Detener la reacción con 3 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, también con intervalos de 30 segundos, y empezando en el mismo orden que en la etapa anterior.

Sacar la gradilla con los tubos del baño y medir la absorbancia a 400 nm en un colorímetro frente al blanco, anotando los datos correspondientes a los distintos pHs ensayados.

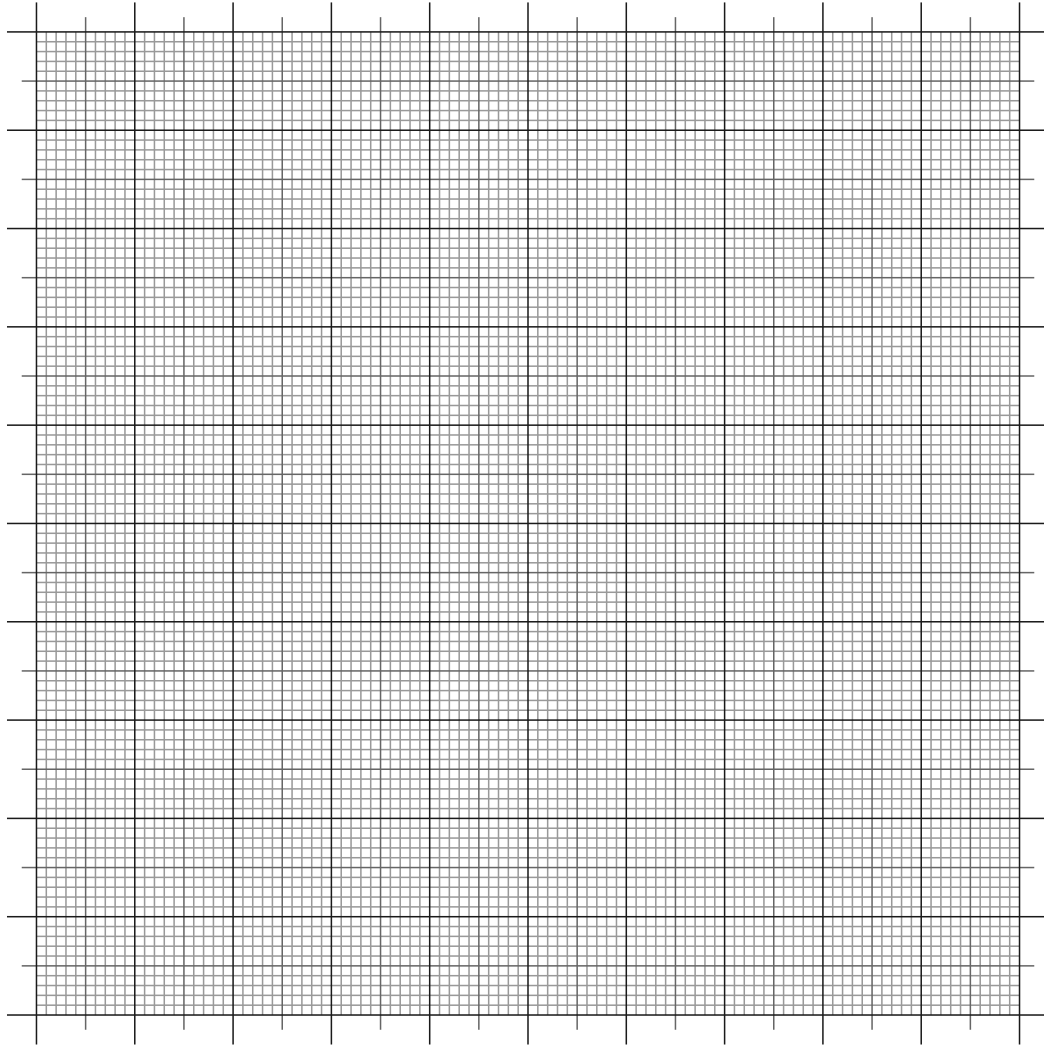
Representar gráficamente los resultados, poniendo en abscisas el pH y en ordenadas la absorbancia a 400 nm.

Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del *p*-nitrofenol, determinado en [2.2.1 en la página 7](#), calcular los  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol liberados por minuto (unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas de pH y a temperatura prefijada.

### 3.3. Resultados.

Tubo	pH	A <sub>400nm</sub>
1	2	
2	3	
3	4	
4	5	
5	6	
6	7	
7	8	
8	9	

**Título:**



1. Cálculo de los  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberado por minuto para el valor óptimo de pH (unidades de actividad enzimática):

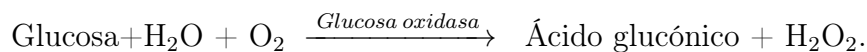
## Práctica N<sup>o</sup> 4

# Valoración enzimática de la glucosa: recta patrón

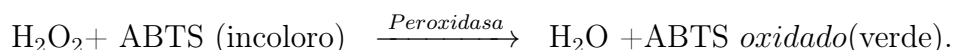
Una de las aplicaciones más frecuentes de la Enzimología en Clínica, consiste en la utilización de enzimas como reactivos para medir la concentración de metabolitos de interés clínico, tales como glucosa, colesterol, etc. En estas condiciones, el metabolito cuya concentración se intenta determinar es el sustrato de una reacción enzimática, mediante la cual se transforma en un producto fácilmente detectable.

Si la reacción enzimática se realiza en unas condiciones (muy baja concentración de sustrato o muy alta concentración de enzima) en las cuales el orden de la misma sea uno, la velocidad de la reacción será directamente proporcional a la concentración del sustrato (metabolito que se intenta determinar) y por tanto midiendo la velocidad ( $\mu\text{M}$  de producto formado/min) se puede calcular la concentración de sustrato.

En esta práctica se determina la concentración de glucosa existente en una muestra mediante la reacción enzimática siguiente:



Como ninguno de los productos de la reacción es fácilmente detectable se utiliza un enzima auxiliar, que transforma a uno de ellos en otro fácilmente detectable, de acuerdo con la reacción:



En este sistema acoplado, cada molécula de glucosa que funciona como sustrato del primer enzima da lugar a una molécula de ABTS oxidado, de coloración verdeazulada y con un máximo de absorción a 420 nm. El ABTS o sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) es incoloro hasta que resulta oxidado.

### 4.1. Procedimiento.

Numerar tubos de 10 ml, colocarlos en la gradilla y poner en cada tubo los reactivos que se indican a continuación:



Tubo	Muestra	Agua
1	50 $\mu$ l Glucosa 0,5 mM	200 $\mu$ l
2	100 $\mu$ l Glucosa 0,5 mM	150 $\mu$ l
3	150 $\mu$ l Glucosa 0,5 mM	100 $\mu$ l
4	200 $\mu$ l Glucosa 0,5 mM	50 $\mu$ l
5	250 $\mu$ l Glucosa 0,5 mM	0 $\mu$ l
6	125 $\mu$ l Problema	125 $\mu$ l
Blanco	—	250 $\mu$ l

Introducir la gradilla en un baño termostatzado a 30°C. Comenzar la reacción añadiendo a cada tubo, incluido el blanco, 1 ml del reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa-ABTS<sup>1</sup> con intervalos de 30 segundos entre tubo y tubo.

Dejar incubar durante 15 minutos y detener la reacción por adición de 2,5 ml de HCl 0,2 N también con intervalos de 30 segundos y empezando en el mismo orden que al iniciar la reacción. Medir la absorbancia a 420 nm.

Al representar, en ordenadas, la absorbancia a 420 nm de cada tubo conocido y en abscisas la cantidad de glucosa (nmoles) que se adicionó a cada tubo, se obtiene una recta patrón, en la cual por interpolación conociendo la absorbancia del problema se puede calcular la concentración de glucosa en el mismo.

## 4.2. Resultados.

Tubo	Glucosa (nmoles)	A <sub>420nm</sub>
1		
2		
3		
4		
5		
6	Problema	

1. Concentración (mM) de glucosa en la disolución problema:

<sup>1</sup>Reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa-ABTS: disolución de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 con 1 ml de glucosa oxidasa comercial por litro y 5 mg/l de peroxidasa. En el momento de usar se añaden a cada litro 0,6 g de ABTS.

Título:

