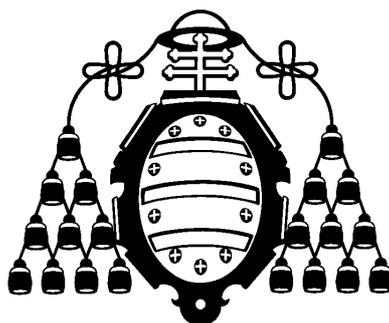


DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN ODONTOLOGÍA

PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y GENÉTICA

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

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

17 de octubre de 2013  
prbq-odo-201206-ev  
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
Pera para pipeta o propipeta	1

# Índice general

1. Preparación de tampones fosfato y medida electrométrica del pH	1
2. Espectro de absorción	5
3. Efecto del pH sobre la actividad de una fosfatasa	9

# Práctica N<sup>o</sup> 1

## Preparación de tampones 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 de 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 (AH) 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 (AH), con lo que el pH de la disolución tampón no varía.



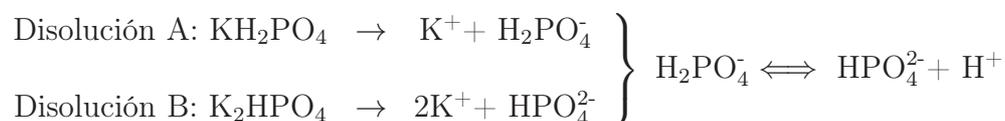
El pH de una disolución tampón se puede calcular mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK'_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

en la que se puede observar que el pH del tampón depende no sólo del valor de  $pK'_a$ , sino también de la relación de concentraciones molares entre la base conjugada y el ácido.

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 mide determinando la concentración de ácido fuerte (HCl) o de base fuerte (NaOH) requeridos para alterar el pH del tampón en una unidad. La capacidad de tamponamiento depende de la concentración total del tampón y es máxima cuando  $[base\ conjugada] = [ácido]$ , es decir, cuando  $pH = pK'_a$ .

En esta práctica se prepararán tres disoluciones de tampón fosfato que tendrán distintos pHs, puesto que están formadas por la base conjugada ( $HPO_4^{2-}$ ) y el ácido débil ( $H_2PO_4^-$ ) mezclados en **diferentes proporciones**. Además, se comprobará la capacidad de tamponamiento de dos de las disoluciones tampón preparadas.



## 1.2. Procedimiento.

Se parte de 60 ml de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M (disolución A) y 60 ml de fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 M (disolución B). Las disoluciones de tampón fosfato se forman mezclando las disoluciones ácida y básica citadas anteriormente, siendo el valor de pH dependiente de las proporciones en que intervienen ambas disoluciones.

Preparar los tres tampones que se indican mezclando las disoluciones A y B en las proporciones siguientes:

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

1. **Pipetear 3 ml de cada una de las disoluciones tampón anteriores en tubos de ensayo convenientemente rotulados y conservarlas para su utilización en la práctica siguiente.**
2. Medir los valores del pH de cada una de las disoluciones anteriores con un pH-metro y compararlos con los calculados teóricamente de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach, considerando que  $\text{pK}'_a = 6,8$ .
3. Comprobar la variación en el pH de los tampones producida por adición de HCl 0,2 N. Utilizar para ello los **tampones 1 y 2** adicionado a cada uno de ellos 0 ml (es decir, medir antes de añadir el HCl) y 2,5 ml de HCl 0,2 N, midiendo con el pH-metro el valor del pH resultante después de cada adición. Justifique los resultados obtenidos y compárelos con los resultados calculados teóricamente según la ecuación de Henderson-Hasselbach.

### 1.3. Resultados.

1. Cálculo del pH **teórico** de cada tampón:

**1**

**2**

**3**

Tampón	pH <sub>teórico</sub>	pH <sub>experimental</sub>
1		
2		
3		

2. Cálculo del pH teórico de los tampones 1 y 2, después de la adición de **HCl**:

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

3. ¿Cuál de las dos disoluciones es mejor tampón? ¿Por qué?

# 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.

Cuando se hace pasar un rayo de luz monocromática (de una determinada longitud de onda) de intensidad inicial  $I_0$  a través de una disolución de una sustancia colocada en un recipiente transparente, parte de la luz es absorbida de manera que la intensidad de la luz transmitida  $I$  es menor que  $I_0$ . El grado de absorción de la luz depende de la longitud de onda y de la concentración de soluto en la disolución, 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;
c	= Concentración del soluto (mol/l);
l	= Espesor del medio (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.

La absorbancia de una disolución se determina en un aparato denominado espectrofotómetro. Cuando la disolución tiene color, el espectro se puede realizar en

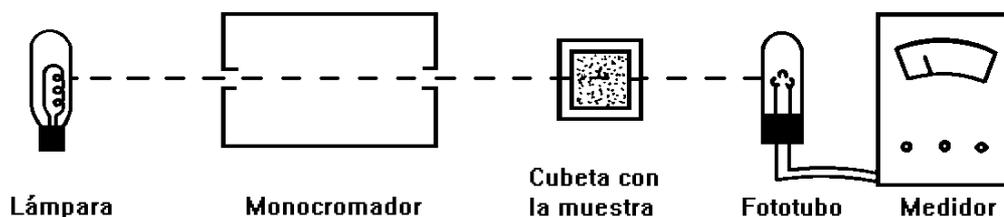
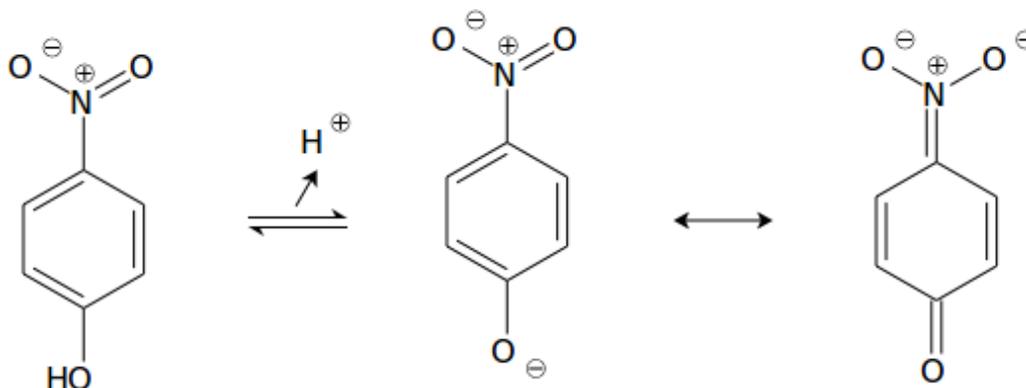


Figura 2.1: Esquema de un colorímetro

un colorímetro, que consta esquemáticamente de los componentes que muestra la figura 2.1.

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

En esta práctica, se determina 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 estructura quinoide, presente en el medio alcalino, sí lo hace.

## 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  $Na_2CO_3$  0,1 M y, a cada uno de ellos, se les añaden 0,1 ml de una disolución de p-nitrofenol 0,75 mM.

Compruébese la influencia del pH del medio valorando visualmente la aparición de color (anotarlo en el apartado 2 de los *Resultados*).

Con el contenido del 4<sup>o</sup> tubo, determínese el espectro de absorción del p-nitrofenol, **usando exclusivamente tubos especiales para colorímetro**. Para ello se selecciona la longitud de onda de 360 nm en el colorímetro y se comprueba que, antes

de introducir el tubo, 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 debida a todos los componentes excepto la del p-nitrofenol. Finalmente, se introduce otro tubo del colorímetro conteniendo la disolución de p-nitrofenol y se anota el valor correspondiente a su absorbancia. Repetir el proceso a 390, 400, 410, 420, 460, y 500 nm.

Representar gráficamente (en el reverso de la hoja) los valores de absorbancia frente a la longitud de onda. Calcular en el apartado 3 de los *Resultados*, con el valor máximo de absorbancia obtenido, el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol a ese pH y  $\lambda$  determinada.

## 2.3. Resultados.

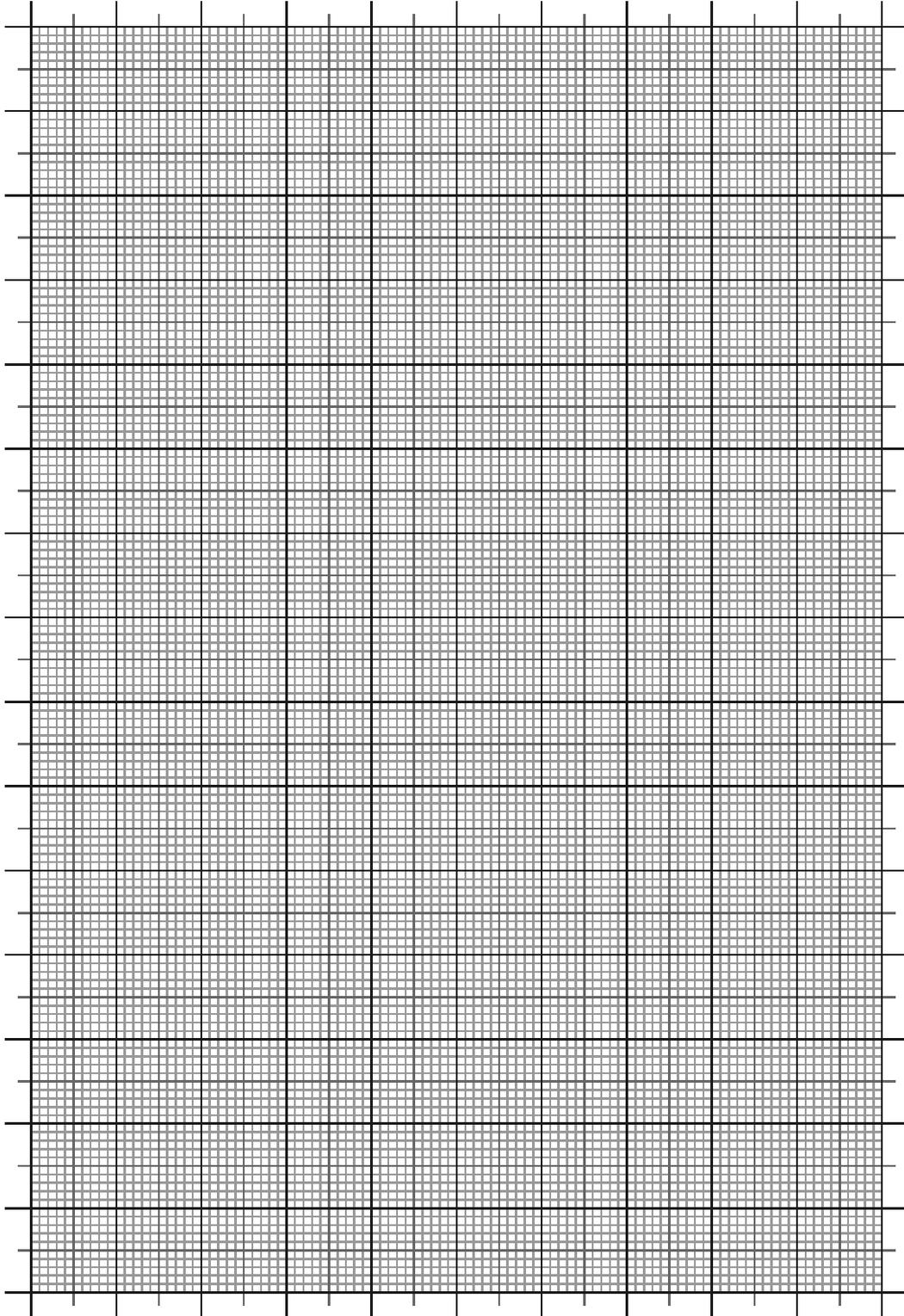
1. Determinación del espectro de absorción del **p-nitrofenol**:

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

2. Influencia del pH del medio en la aparición de color:

3. Cálculo del coeficiente de extinción molar para el máximo de absorbancia ( $\epsilon$ ):

**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 esta 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 midiendo la concentración o absorbancia de *p*-nitrofenol formado por acción del enzima durante un período de tiempo determinado, en las condiciones de ensayo especificadas. 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 una determinada longitud de onda.

### 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 = 3	0,2 ml de 0,05 mg/ml	—
2	0,6 ml de pH = 4	”	—
3	0,6 ml de pH = 5	”	—
4	0,6 ml de pH = 7	”	—
5	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 [2.3 en la página 7](#), calcular los  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol formados por minuto, cuando el enzima funciona en condiciones óptimas de ensayo (**unidades de actividad enzimática**).

### 3.3. Resultados.

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

1. Cálculo de los  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol liberado por minuto en condiciones óptimas de ensayo (**unidades de actividad enzimática**):



**Título:**

