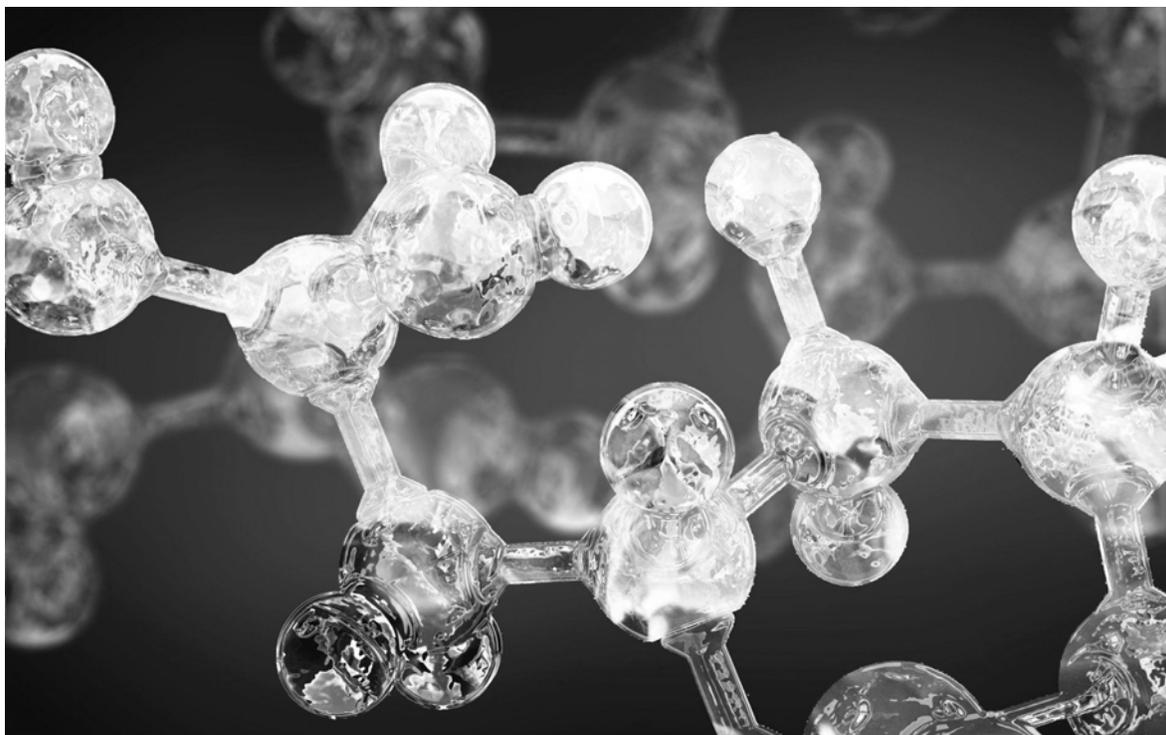




**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE BIOLOGÍA



**MANUAL DEL LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA**

Actualizado en febrero 2016 por:

QFB. Jaime Chávez Torres

Dra. Patricia Ríos Chávez

QFB. Rita Sandra Mendoza Olivares

M. C. Sebastián Sánchez Suárez

ÍNDICE

Introducción.....	1
Práctica #1. <i>Determinación de carbohidratos por un método fotométrico.....</i>	3
Práctica #2. <i>Hidrólisis de polisacáridos.....</i>	9
Práctica #3. <i>Cromatografía en papel de carbohidratos.....</i>	19
Práctica #4. <i>Obtención de lípidos y distinción de algunas de sus propiedades.....</i>	25
Práctica #5. <i>Cuantificación espectrofotométrica de proteínas.....</i>	32
Práctica #6. <i>Separación de proteínas.....</i>	38
Bibliografía.....	44

Trabajo en el laboratorio

Durante el trabajo en el Laboratorio de Bioquímica realizará experimentos que deberá llevar a cabo con cuidado si quiere obtener resultados satisfactorios. Se recomienda que **lea las prácticas antes de presentarse al laboratorio**, para conocer qué material deberá aportar a la sesión y de esta manera poder organizar el trabajo a realizar. En las hojas en blanco del manual de prácticas se elaborará el reporte como se indica más adelante.

Reglamento

Los lineamientos que a continuación se enumeran deberán observarse en todas las sesiones:

1. Sea puntual en la entrada a la sesión de laboratorio, pues se pasará lista de asistencia dentro de los primeros 15 minutos. Después de esa hora, aunque el alumno se presente se contará falta.
2. Mantenga su lugar limpio, depositando los desechos en los cestos de basura y no en la tarja o el suelo. Lave su material de vidrio antes y después de usarlo. La limpieza es un índice del cuidado en su trabajo.
3. Trabaje en orden, evitando distraer a sus compañeros con pláticas o bromas. El alumno desordenado será suspendido de la sesión en curso.

Recuerde que el uso de bata es obligatorio.

Reporte de práctica

1. Deberá revisarse en la siguiente sesión del laboratorio.
2. El reporte consta de las siguientes partes:
 - a. Resultados (Gráficas, Cálculos, Tablas o lo que se indique)
 - b. Esquemas, dibujos, fotos
 - c. Cuestionario
 - d. Conclusiones
 - e. Bibliografía

Evaluación

1. Se requiere el 80% de asistencia a las sesiones de laboratorio.
2. Se calificará de 0 a 10 cada reporte de práctica, de acuerdo a la calidad del mismo.
3. El total de las calificaciones de: trabajo en el laboratorio, reportes de práctica y exámenes de laboratorio, tendrán un puntaje máximo de 3, que será sumado a la calificación teórica final de la materia.
4. Tanto la calificación del laboratorio como de la teoría deben ser aprobatorias para poder aprobar el curso.

PRÁCTICA No. 1

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR UN MÉTODO FOTOMÉTRICO

INTRODUCCIÓN

Los hidratos de carbono, sacáridos o glúcidos se definen como **polihidroxialdehídos** o **polihidroxiacetonas** y sus derivados. La fórmula empírica de los monosacáridos es $(\text{CH}_2\text{O})_n$, en la que $n=3$ o un número mayor. Un carbohidrato que no es hidrolizable a compuestos más simples se denomina **monosacárido**, mientras aquel que por hidrólisis nos da dos moléculas de monosacáridos se llama **disacárido**; así mismo, aquel que por hidrólisis nos da muchas moléculas de monosacáridos se conoce como **polisacárido**.

Los monosacáridos o carbohidratos monoméricos se nombran de acuerdo al número de átomos de carbono que poseen en su cadena: así, las **triosas** contienen 3, **tetrosas** 4, **pentosas** 5, **hexosas** 6, **heptosas** 7 y las **octosas** 8. Estos monosacáridos son sólidos, blancos, cristalinos, muy solubles en agua e insolubles en disolventes no polares; la mayor parte de ellos son dulces.

El monosacárido más abundante es la **D-glucosa**, una hexosa; es el combustible principal para la mayoría de los seres vivos, así como la unidad estructural básica de los polisacáridos más abundantes, tales como el almidón, la celulosa, el glucógeno y la quitina.

El método de **Nelson-Somogyi** para la determinación de carbohidratos es un análisis cuantitativo; para la realización de

este, se calienta el azúcar con una solución alcalina de tartrato de cobre, produciéndose así óxido cuproso, que reacciona con arsenomolibdato; el color azul intenso originado se mide en un espectrofotómetro (se mide la absorbancia de la solución). En la mezcla de reacción se incluye sulfato de sodio para minimizar la entrada de oxígeno atmosférico a la solución, que podría causar reoxidación del óxido cuproso.

La curva de calibración (curva patrón) obtenida depende en cierto grado del azúcar determinado, así que el método no es apropiado para la determinación de una mezcla compleja de azúcares reductores.

OBJETIVO

Aprender un método fotométrico para determinación de carbohidratos, elaborar una curva estándar y conocer su manejo.

MATERIAL

Ⓐ Por equipo

- ✓ 1 Mechero Bunsen
- ✓ 1 Tripié
- ✓ 1 Tela de asbesto
- ✓ 1 Recipiente para Baño María
- ✓ 1 Gradilla
- ✓ 12 Tubos de ensaye de 15 x 150 mm
- ✓ 1 Hoja de papel aluminio
- ✓ 1 Pipeta de 1 ml
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ 1 Pinzas
- ✓ 1 Piceta para agua destilada

ⓑ Por grupo de trabajo

- ✓ Espectrofotómetros
- ✓ 2 Celdas para el espectrofotómetro

ⓒ Reactivos

- ✓ Reactivo de Nelson-Somogyi
- ✓ Reactivo de Arsenomolibdato
- ✓ Glucosa 0.0032 M
- ✓ Sacarosa 0.0032 M

PROCEDIMIENTO

Para realizar su curva estándar de glucosa se utilizan las concentraciones enlistadas a continuación:

- Tubo 1 0.0032 M
- Tubo 2 0.0016 M
- Tubo 3 0.0008 M
- Tubo 4 0.0004 M
- Tubo 5 0.0002 M
- Tubo 6 0 M (Tubo blanco)

Para preparar estas concentraciones, se procede de la siguiente manera:

Tubo 1: 0.5 ml de glucosa 0.0032 M

Tubo 2: 0.5 ml de glucosa 0.0032 M más 0.5 ml de agua destilada, se agita bien

Tubo 3: 0.5 ml de glucosa 0.0016 M del tubo 2 + 0.5 ml de agua destilada, agitar bien

Tubo 4: 0.5 ml de glucosa 0.0008 M del tubo 3 + 0.5 ml de agua destilada, agitar bien

Tubo 5: 0.5 ml de glucosa 0.0004 M del tubo 4 + 0.5 ml de agua destilada, agitar bien y extraer y desechar 0.5 ml

Tubo 6: 0.5 ml de agua destilada

Después de preparar las diferentes concentraciones de glucosa, se procede con la metodología de Nelson-Somogyi. Se añade a los 6 tubos 0.5 ml de agua destilada y 1 ml del Reactivo de Somogyi. Se tapan los tubos con papel aluminio y luego se colocan en Baño María hirviendo durante 15 minutos. Enseguida se enfría completamente y se adiciona 1 ml del reactivo de arsenomolibdato a cada tubo (**PRECAUCIÓN. es sumamente TÓXICO**). Se agita bien y cuando la efervescencia haya cesado, se añaden 7 ml de agua destilada para completar un volumen final a 10 ml.

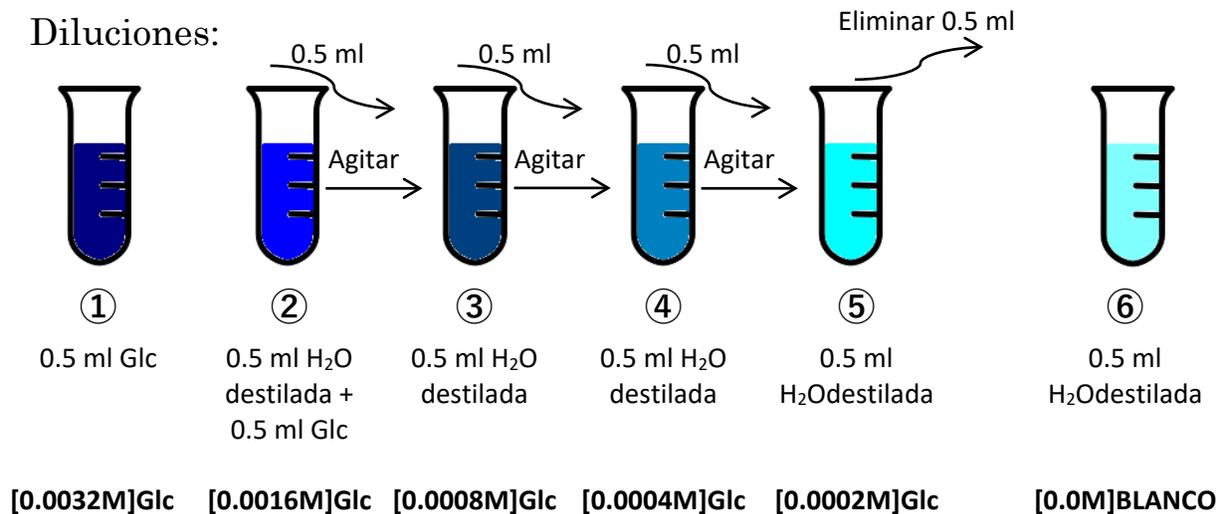
Con el tubo blanco se calibra el espectrofotómetro a 0 de absorbancia a una longitud de onda de 525 nm. Enseguida se mide la absorbancia de los tubos 5, 4, 3, 2 y 1 (en orden ascendente de concentración).

Una vez que se haya completado de manera satisfactoria la determinación de glucosa, se repite todo el procedimiento utilizando ahora la solución de sacarosa.

La curva estándar del azúcar se obtiene graficando la concentración (eje x) contra la absorbancia (eje y).

Práctica #1. Determinación de carbohidratos por un método fotométrico

Diluciones:



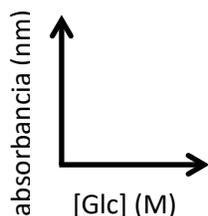
Método de Nelson-Somogyi:

- ① Añadir a los 6 tubos 0.5 ml de H₂O destilada
- ② Adicionar 1 ml del reactivo Nelson-Somogyi a cada tubo
- ③ Tapar los tubos con papel aluminio
- ⑤ Colocar los tubos en Baño María (hirviendo) durante 15 minutos
- ⑥ Dejar enfriar
- ⑦ Añadir 1 ml del reactivo de arsenomolibdato a los 6 tubos
- ⑧ Agitar, y cuando la efervescencia haya cesado, llevar a un volumen final de 10 ml con H₂O destilada (añadir 7 ml de agua)

Determinación espectrofotométrica:

- ① Utilizar el tubo blanco para calibrar a 0 de absorbancia a 525 nm
- ② Leer los tubos en orden ascendente de [Glc] (tubo 5, 4, 3, 2, 1)

Gráfica:



RESULTADOS

Tubo	Concentración (M)	Absorbancia (525 nm)	
		Glucosa	Sacarosa
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Reporte sus resultados en forma de gráfica, correctamente trazada, de la curva de carbohidratos.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la utilidad de elaborar una curva estándar?
2. ¿En qué propiedad química de los azúcares está fundamentada la determinación colorimétrica?
3. Utiliza la curva estándar que realizaste para resolver lo siguiente:
Por el método de Nelson-Somogyi, una solución de glucosa tiene una absorbancia de 1.0 a 525 nm, calcula la concentración de la glucosa.
4. Discuta los resultados de la sacarosa.
5. De acuerdo a la respuesta anterior, describa qué proceso o método utilizaría para cuantificar la sacarosa.
6. Describe la importancia biológica de los carbohidratos.

PRÁCTICA No. 2

HIDRÓLISIS DE POLISACÁRIDOS

INTRODUCCIÓN

Los polisacáridos son azúcares constituidos por un gran número de unidades de monosacáridos, unidos mediante el **enlace glucosídico**. La hidrólisis de polisacáridos da lugar a moléculas de monosacáridos. La D-glucosa es el monosacárido predominante en los polisacáridos, pero también podemos encontrar a la D-manosa, D-fructosa, D- y L-galactosa, D-xilosa y D-arabinosa.

La hidrólisis la podemos llevar a cabo de forma **ácida, ácida catalizada** y por **enzimas hidrolíticas**. Las enzimas hidrolíticas son específicas en su mecanismo de acción, tienen la particularidad de acelerar el desdoblamiento de diversas moléculas de polisacáridos, como el glucógeno, introduciendo una molécula de agua entre las uniones glucosídicas.

En la saliva poseemos este tipo de enzimas hidrolíticas, específicamente la **amilasa** o **ptialina**, que es especialmente digestiva y se encuentra también en el jugo pancreático. Esta enzima degrada al almidón en secciones lineales, hidrolizando las uniones glucosídicas entre los enlaces α -1,4 de la **amilosa**. Mientras que la enzima desramificante α -1,6 glucosidasa hidroliza en los enlaces α -1,6 de la **amilopectina** rompiendo las fracciones ramificadas de este carbohidrato; y como producto final de la

hidrólisis del almidón se obtienen residuos de maltosa, maltotriosa y α -dextrina.

Los tres polisacáridos más importantes para el hombre son: el **almidón**, la **celulosa** y el **glucógeno**, los cuales podemos encontrar en forma natural en plantas y animales.

El almidón desempeña la función de almacenamiento energético en las plantas, lo encontramos principalmente en tejido parenquimatoso en forma de gránulos, siendo el glucógeno su equivalente funcional en animales, localizado en el hígado y en músculos. La celulosa, por otro lado, desempeña un papel estructural, otorgando rigidez a la pared celular de las plantas.

OBJETIVO

En esta práctica se ilustran algunos métodos de hidrólisis, verificando la producción de la reacción mediante determinaciones cualitativas. Podrán compararse la diferencia de tiempos requeridos por cada método y la diferencia en las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la hidrólisis.

MATERIAL

Ⓐ Por equipo

- ✓ 1 Mechero Bunsen
- ✓ 1 Tripié
- ✓ 1 Tela de asbesto
- ✓ 1 Recipiente para Baño María
- ✓ 1 Gradilla
- ✓ 2 Tubos de ensaye de 15 x 150 mm
- ✓ 1 Vaso de precipitados
- ✓ 1 Pipeta de 1 ml

- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ 1 Pipeta Pasteur con goma
- ✓ 1 Agitador de vidrio
- ✓ 1 Placa de porcelana

ⓑ Por grupo de trabajo

- ✓ 2 Baños María
- ✓ 2 Termómetros
- ✓ Papel pH
- ✓ Papel aluminio

ⓒ Reactivos

- ✓ Preparar 1000 ml de solución de almidón soluble al 2%. Pese 20 g de almidón y mézclelos bien con un poco de agua destilada mientras hace hervir alrededor de 500 ml de agua destilada. Cuando haya formado una pasta con el almidón humedecido, agregue a dicha pasta el agua hirviendo, agitando intensamente. Deje enfriar un poco y complete a 1000 ml; filtre si es necesario.
- ✓ 50 ml HCl concentrado
- ✓ 500 ml NaOH al 20%
- ✓ 100 ml de solución indicadora de Lugol (preparar 50 ml en dos vasos de 100 ml). Mezcle bien 2 g de KI y 1 g de Yodo; disuelva esta mezcla en agua destilada, calentando ligeramente si es necesario. Complete a 100 ml.
- ✓ Reactivo de Lucas. Disuelva 136 g de $ZnCl_2$ en 89 ml de HCl concentrado.
- ✓ 100 ml de reactivo de Benedict. Disuelva 17.3 g de citrato de sodio y 10 g de Na_2CO_3 en 60 ml de agua caliente. Filtre a través de papel filtro en una probeta de 100 ml y complete con agua hasta 70 ml; en otro recipiente disuelva 0.86 g de $CuSO_4$ en aproximadamente 20 ml de agua destilada y complete hasta 30 ml. Al momento de utilizarse añada

lentamente la solución de CuSO_4 a la primera solución, agitando continuamente.

ⓓ Material biológico

- ✓ Amilasa salival. Recolectar unos 5 ml de saliva, evitando la espuma.

Pruebas cualitativas para monitorear y corroborar la hidrólisis

I. Prueba de Lugol. Se lleva a cabo mezclando una gota de muestra y una de Lugol en un pocillo de la placa excavada de porcelana y observando la coloración resultante.

NOTA: El tono azul señala la presencia de almidón, mientras el rojo y el amarillo señalan hidrólisis parcial y total respectivamente.

Color producido en la reacción	Presencia de almidón	Significado en términos de hidrólisis
AZUL	+	No hay hidrólisis
ROJO	±	Hidrólisis parcial
AMARILLO	-	Hidrólisis total

II. Prueba de Benedict.

Se coloca en un tubo de ensaye 1 ml de la disolución hidrolizada que queda en el vaso, verifique el pH con tiras reactivas hasta alcalinidad usando NaOH al 20% adicionar 1 ml. de reactivo de Benedict, tapándose con papel aluminio y llevándose a Baño María en agua muy caliente.

NOTA: La aparición de un color ROJO indica la presencia de **AZUCARES REDUCTORES SENCILLOS**, demostrando así la hidrólisis total de la muestra. Si a los 15 minutos no ha aparecido el color, significa que no hay azúcares reductores en la solución problema.

PROCEDIMIENTO

Hidrólisis ácida del almidón

En un vaso de 250 ml coloque 20 ml de disolución de almidón al 2%. Agregue 1 ml de HCl concentrado y caliente en baño María de modo que hierva suavemente. Agite continuamente. Cada 5 minutos **realice la prueba de Lugol**, hasta hidrólisis total.

Pase a un tubo de ensaye 1 ml de la disolución hidrolizada que queda en el vaso, verifique el pH con tiras reactivas hasta ligera alcalinidad usando NaOH al 20 % y corrobore la hidrólisis total del polisacárido mediante la **reacción de Benedict**.

Hidrólisis ácida catalizada del almidón

En un vaso de precipitados coloque 10 ml de almidón y agregue 3 ml de reactivo de Lucas (CUIDADO, causa quemaduras graves); caliente en baño María de modo que la mezcla hierva suavemente; cada 3 minutos **realice la prueba de Lugol**, hasta hidrólisis total.

Pase a un tubo de ensaye 1 ml de la disolución hidrolizada que queda en el vaso, verifique el pH con tiras reactivas hasta ligera alcalinidad usando NaOH al 20 % y corrobore la hidrólisis total del polisacárido mediante **la reacción de Benedict**.

Hidrólisis enzimática del almidón

En un vaso de precipitados coloque aproximadamente 5 ml de saliva SIN ESPUMA, mantenga en Baño María a 35-37°C agregue rápidamente 2 ml de solución de almidón al 2%. Cada 30 segundos tome del vaso una gota para llevar a cabo **la prueba de Lugol**, hasta hidrólisis total.

Pase a un tubo de ensaye 1 ml de la disolución hidrolizada que queda en el vaso, corrobore la hidrólisis total del polisacárido mediante **la reacción de Benedict**.

NOTA: Para detectar la presencia de azúcares reductores, se puede utilizar el reactivo de Benedict o el reactivo de Nelson-Somogyi.

Práctica #2. Hidrólisis de polisacáridos

Hidrólisis ácida del almidón

20 ml almidón al 2%
+
1 ml HCl concentrado

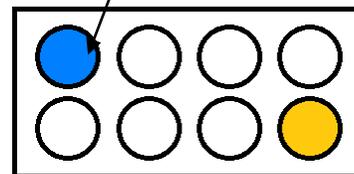


Ebullición en BM

Tomar 1 gota cada
5 minutos

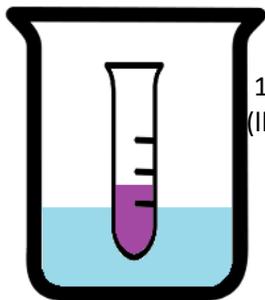
Prueba de Lugol

1 gota almidón + 1 gota Lugol



Color azul (presencia de almidón) → amarillo (hidrólisis total)

Prueba de Benedict



Ebullición en BM

1 ml almidón hidrolizado
(llevado a pH alcalino con
NaOH 20%)
+
1 ml reactivo Benedict

Color rojo observado en
no más de 15 minutos → Hidrólisis total

Hidrólisis ácida catalizada del almidón

10 ml almidón al 2%
+
3 ml reactivo Lucas

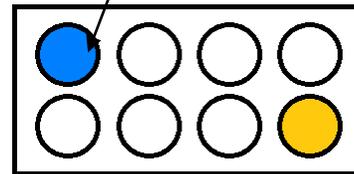


Ebullición controlada

Tomar 1 gota cada
3 minutos

Prueba de Lugol

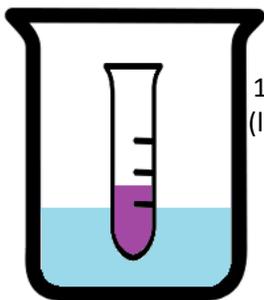
1 gota almidón + 1 gota Lugol



Color azul
(presencia
de almidón)

→ amarillo
(hidrólisis total)

Prueba de Benedict



Ebullición controlada

1 ml almidón hidrolizado
(llevado a pH alcalino con
NaOH 20%)

+

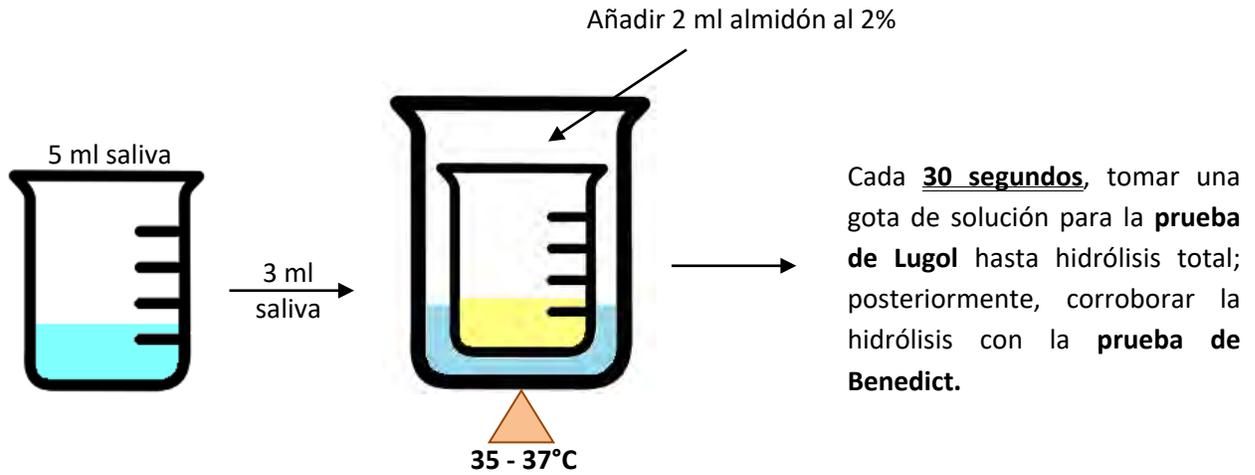
1 ml reactivo Benedict

Color rojo observado en
no más de 15 minutos

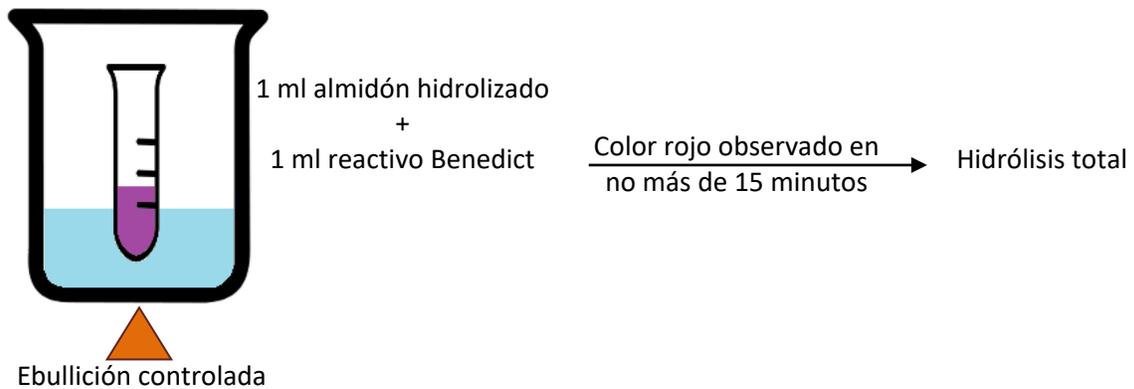
→ Hidrólisis total

Nota: No agitar el tubo en baño maría

Hidrólisis enzimática del almidón



Prueba de Benedict



RESULTADOS***Experimento #1. Hidrólisis ácida del almidón***

<u>Tiempo (min)</u>	<u>Prueba de Lugol (color producido)</u>	<u>Significado en términos de hidrólisis</u>
0	_____	_____
5	_____	_____
10	_____	_____
15	_____	_____
20	_____	_____
25	_____	_____
30	_____	_____
35	_____	_____
40	_____	_____
45	_____	_____
50	_____	_____
55	_____	_____
60	_____	_____

Resultados de la prueba de Benedict: _____

Tiempo requerido para la hidrólisis ácida total del almidón: _____

Experimento #2. Hidrólisis ácida catalizada del almidón

<u>Tiempo (min)</u>	<u>Prueba de Lugol (color producido)</u>	<u>Significado en términos de hidrólisis</u>
0	_____	_____
3	_____	_____
6	_____	_____
9	_____	_____
12	_____	_____
15	_____	_____

Resultados prueba de Benedict: _____

Tiempo requerido para la hidrólisis ácida catalizada del almidón: _____

Experimento #3. Hidrólisis enzimática del almidón

<u>Tiempo (seg)</u>	<u>Prueba de Lugol (color producido)</u>	<u>Significado en términos de hidrólisis</u>
0	_____	_____
30	_____	_____
60	_____	_____
90	_____	_____

Resultados prueba de Benedict: _____

Tiempo requerido para la hidrólisis enzimática del almidón: _____

CUESTIONARIO

1. En forma de tabla indique cuál es el producto de la hidrólisis parcial y total del almidón y de la celulosa.
2. Esquematice y explique las diferencias estructurales y tipo de enlace entre la celulosa, el almidón y el glucógeno.
3. Explique cuál es el modo de acción de un catalizador.

PRÁCTICA No. 3

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL (ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS)

INTRODUCCIÓN

La cromatografía fue inventada y nominada por el botánico ruso Mijaíl Tsveta principios del siglo pasado. Los métodos cromatográficos son empleados en la identificación, cuantificación, separación y purificación de aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. La aplicación de la cromatografía ha incrementado de manera impresionante en las últimas cinco décadas, debido no sólo al desarrollo de varios tipos diferentes de técnicas cromatográficas, sino también a la necesidad creciente de los científicos de disponer de mejores métodos para el análisis de mezclas complejas.

La separación de compuestos que son fácilmente solubles en solventes orgánicos y sólo ligeramente solubles en agua se efectúa por **cromatografía de adsorción**, mientras que los compuestos ionizables hidrosolubles se separan mejor por **cromatografía de intercambio iónico**. Intermedia a estos dos tipos, está la **cromatografía de partición**, empleada en la separación de compuestos que se disuelven tanto en agua como en solventes orgánicos.

La eficiencia de la separación depende de factores como la naturaleza química de los componentes a separar, del disolvente y

del adsorbente, de la geometría de la columna, la velocidad y el flujo de la disolución en la misma, y hasta de condiciones ambientales, entre otras.

Cuando se agita un compuesto con dos disolventes que no se mezclan, este se distribuye en las dos fases en equilibrio, la razón de la concentración del compuesto en los dos solventes es constante y se conoce como el **coeficiente de partición** (δ):

$$\delta = \frac{\text{Concentración de X en el solvente 1}}{\text{Concentración de X en el solvente 2}}$$

En la cromatografía de partición, uno de los solventes, usualmente el agua, permanece en la fase estacionaria que consiste en una columna o película de material inerte. La otra fase consiste en un líquido orgánico móvil, saturado con agua, que fluye en relación con la fase estacionaria. Los componentes de una mezcla se separan si los coeficientes de partición entre los solventes son lo suficientemente diferentes.

Gordon, Martín y Synge han propuesto una modificación de la cromatografía por partición que utiliza tiras de papel como adsorbente. La celulosa en forma de hojas de papel constituye un medio de soporte muy útil, donde el agua es adsorbida entre las fibras de celulosa y forma la fase hidrofílica estacionaria. La relación entre la distancia recorrida por el solvente se conoce como el valor R_f y es más o menos constante para compuestos, sistemas de solventes y clase de papel determinados bajo condiciones cuidadosamente controladas de concentración de soluto, temperatura y pH.

La utilización del método de separación de compuestos por cromatografía sobre papel presenta muchas ventajas sobre los métodos tradicionales de separación como la destilación, la cristalización, la extracción con disolventes, precipitación química o electrónica.

OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento de separación de biomoléculas, e identificarlas por un método químico.

MATERIAL

Ⓐ Por equipo

- ✓ 3 Capilares
- ✓ 1 Par de guantes de hule
- ✓ 1 Atomizador
- ✓ 1 Regla
- ✓ 1 Lápiz *
- ✓ 1 Cinta masking

NOTA: * Material que el equipo debe aportar.

Ⓑ Por grupo de trabajo

- ✓ Papel aluminio
- ✓ Tijeras
- ✓ Tanques para cromatografía
- ✓ Papel para cromatografía
- ✓ Horno

Ⓒ Reactivos

- ✓ 175 ml de mezcla de solventes en cada tanque para cromatografía (**butanol, ác. acético, agua 4:1:2 v/v**)
- ✓ 1 litro de **solución reveladora** (NaOH al 1% en etanol al 60%, disolver calentando si es necesario).
- ✓ 500 ml de glucosa al 4%
- ✓ 500 ml de lactosa al 4%
- ✓ Soluciones problema 1 y 2

PROCEDIMIENTO

Empiece por saturar la cámara para cromatografía, vertiendo la mezcla de solventes en la misma, al menos dos horas antes de utilizarla.

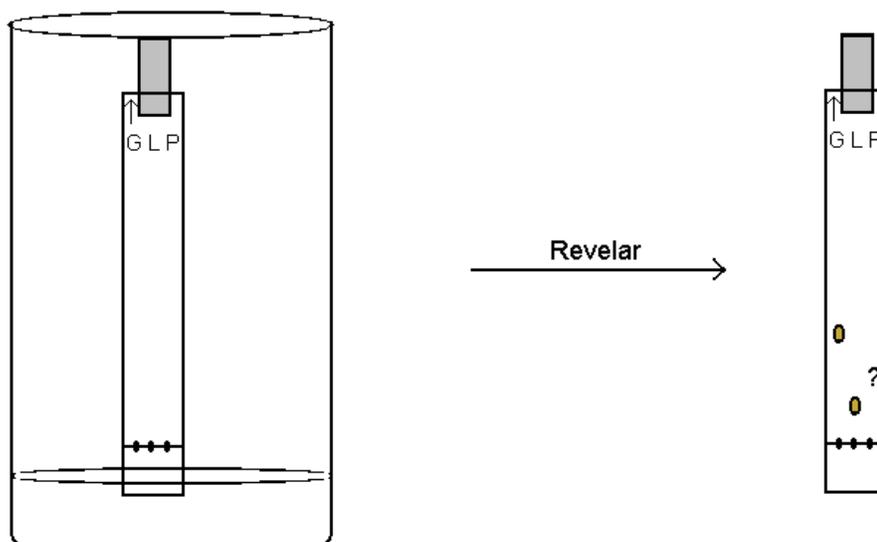
Para llevar a cabo el experimento de cromatografía en papel de carbohidratos, se utiliza una tira de papel Whatman No. 1 de 18 x 6 cm. Verifique que el sentido de las fibras del papel corresponda al sentido en que se va a correr el disolvente. No toque el papel con los dedos, use guantes de hule o pinzas. Trace con lápiz una línea a tres centímetros de la base del rectángulo del papel. Sobre la línea basal hay que marcar tres puntos. El primero de ellos se coloca a una distancia de 1.5 cm de uno de los bordes, los dos puntos siguientes se colocan a intervalos de 1.5 cm a partir del primer punto.

Utilice un capilar para aplicar 5 gotas pequeñas de solución de glucosa al 4% en el primer punto marcado. **Entre cada gota aplicada debe existir un tiempo prudente que permita el secado de la misma.** De igual manera se aplican la lactosa al 4% y una de las soluciones problema en el segundo y tercer punto respectivamente.

Después de la aplicación de cada uno de los carbohidratos y la muestra problema, introduzca la tira de papel en la cámara previamente saturada. Tenga especial cuidado en que la línea basal donde se colocaron los carbohidratos esté por encima del nivel del sistema de solventes. Utilice cinta masking para fijar el borde superior de la tira de papel a la cámara. Tape herméticamente la cámara con papel aluminio y tome nota del tiempo de inicio del corrimiento de los solventes, espere a que asciendan hasta cerca de 2 o 3 cm del borde superior del papel, o bien hasta una hora antes de que se dé por concluida la sesión de laboratorio, y saque la tira de papel marcando la altura hasta la que llegaron. Anote el tiempo en el que detuvo el corrimiento y deje secar al aire. Cuando la hoja

esté perfectamente seca, rocíe homogéneamente con la solución reveladora sin que escurra en el papel. Manténgala en posición horizontal y deje que seque al aire el exceso de revelador para posteriormente colocarla sobre una hoja de papel dentro de una charola metálica. Introduzca la charola en un horno Pasteur a 100°C hasta que aparezcan manchas bien delineadas. Utilice un lápiz para marcar las manchas y determine los valores de Rf de cada una de ellas.

Práctica #3. Cromatografía en papel (análisis de carbohidratos)



Mezcla de solventes: butanol, ác. acético, agua 4:1:2 v/v

Solución reveladora: NaOH, Etanol, H₂O destilada

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migró la muestra}}{\text{Distancia que migró la mezcla de solventes}}$$

RESULTADOS

- I. Reporte el color de las manchas reveladas y el tiempo de corrida.
- II. Calcule el valor R_f para la glucosa, la lactosa y la solución problema.
- III. Con base a los valores de R_f determinados, identifique la solución problema utilizada.

CUESTIONARIO

1. Explique cuál es la función del papel filtro en este método cromatográfico.
2. ¿Qué es el coeficiente de partición de una sustancia?
3. ¿Qué aplicación tiene en la cromatografía el coeficiente de partición?
4. Describa a detalle la técnica de cromatografía por intercambio iónico y mencione las aplicaciones de importancia biológica.

PRÁCTICA No 4

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS Y DISTINCIÓN DE ALGUNAS DE SUS PROPIEDADES

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son un grupo de sustancias que se definen en términos de sus características de solubilidad; son solubles en solventes orgánicos como el benzol, éter, acetona, tetracloruro de carbono, cloroformo, entre otros; e insolubles en agua, aunque algunos lípidos, como los jabones y las sales biliares, se dispersan coloidalmente en ella. Otros, en cambio, apenas son solubles en éter, entre ellos sobresalen; cerebrósidos, esfingomielinas y saponinas.

Generalmente, los lípidos se encuentran distribuidos en la naturaleza como ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Su hidrólisis alcalina (conocida como saponificación) origina un alcohol y la sal de sodio o potasio de los ácidos grasos constituyentes; los productos de esta hidrólisis pueden ser solubles en agua.

A los lípidos se les puede dividir en tres grandes grupos:

- 1.- Lípidos simples. Comprenden los lípidos más abundantes, grasas, triglicéridos y ceras, estas últimas no son muy abundantes.
- 2.- Lípidos compuestos. Comprenden los fosfolípidos, que contienen fosforo, y los galactolípidos, que contienen galactosa.
- 3.- Lípidos derivados. Comprenden productos de la hidrólisis de las dos primeras clases y otros compuestos, como estéridos, aldehídos

grasos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, aceites esenciales, vitaminas liposolubles, entre otros, que son producidas por las células vivas.

Una de las funciones biológicas fundamentales de los lípidos es la estructural, conformando gran parte de las membranas celulares. Así mismo, energéticamente son las moléculas más importantes, pues su combustión no sólo aporta el doble de energía que los carbohidratos, también son almacenados como moléculas de reserva de una manera más eficaz y prácticamente ilimitada.

En resumen, los lípidos fungen una gran cantidad de papeles biológicos, como componentes estructurales de la membrana, formas de transporte y almacenamiento de combustible catabólico, cubierta protectora sobre la superficie de muchos organismos, componente de la superficie celular relacionada con el reconocimiento de las células, la especificidad de especie y la inmunidad de los tejidos.

Así mismo, los grupos principales de los lípidos tienen características de solubilidad diferentes y esta propiedad se usa en su extracción y purificación a partir de materiales biológicos.

OBJETIVO

Iniciar al alumno en las técnicas de aislamiento de lípidos a partir de materiales biológicos y separar dos lípidos importantes: lecitina y cefalina.

MATERIAL

Ⓐ Por equipo

- ✓ 6 Tubos de ensaye de 15 X 150 mm
- ✓ 1 Pipeta Pasteur con goma

- ✓ 2 Vasos de precipitado
- ✓ 1 Agitador de vidrio
- ✓ 1 Gradilla
- ✓ 1 Embudo
- ✓ 1 Placa de calentamiento
- ✓ 1 Piceta para agua destilada
- ✓ 1 Pinzas

Ⓑ Por grupo de trabajo

- ✓ 1 Horno
- ✓ 1 Balanza analítica o granataria
- ✓ Papel filtro
- ✓ Hielo

Ⓒ Reactivos

- ✓ Acetona
- ✓ Etanol
- ✓ Éter etílico
- ✓ Cloroformo

NOTA: Estos reactivos deben mantenerse perfectamente tapados y en recipientes secos.

Ⓓ Material biológico

- ✓ 1 Yema de huevo *
- ✓ 10 g de mantequilla *
- ✓ 10 g de margarina *
- ✓ 10 g de aceite de olivo *
- ✓ 10 g de manteca de cerdo *

NOTA: * Material que cada equipo deberá aportar.

PROCEDIMIENTO

Extracción y separación de cefalina y lecitina de huevo

Separe la yema de huevo y colóquela en un vaso de precipitados previamente pesado de 100 ml. Agregue al vaso de 15 a 20 ml de éter etílico y agite suavemente con una varilla de vidrio para homogeneizar bien la mezcla. Añada lentamente, sin dejar de agitar, un volumen de acetona igual al de éter.

Observará que la acetona provoca la precipitación de los fosfolípidos, en tanto que las grasas y el colesterol permanecen disueltos. Después de dejar la mezcla en reposo unos minutos, filtre a través de papel filtro previamente pesado. El precipitado (que contiene cefalina y lecitina) se lava con 15 a 20 ml de alcohol frío, recibiendo el filtrado en un vaso seco y limpio previamente pesado. La lecitina es más soluble en el alcohol frío, por lo tanto en el papel filtro queda únicamente la cefalina.

Con la varilla de vidrio extienda la cefalina obtenida sobre el papel filtro, luego colóquelo sobre una hoja de papel dentro de una charola metálica. Introduzca en un horno Pasteur a 60°C hasta que la cefalina esté completamente seca. Se deja enfriar y se pesa. Calcular el rendimiento.

Para obtener la lecitina, se coloca el vaso con el filtrado en una placa de calentamiento evaporando lentamente el alcohol por agitación con una varilla de vidrio. Luego se deja enfriar el vaso con la lecitina y se pesa. Calcular el rendimiento.

Solubilidad de los lípidos

Examine la solubilidad de los lípidos en agua y en los solventes orgánicos otorgados en el laboratorio; anote cuidadosamente las diferencias entre los grupos principales de lípidos. Use 2 ml de solvente en un tubo de ensaye para cada prueba de solubilidad.

NOTA: no descartar los tubos con pruebas de solubilidad hasta que se indique

Prueba de traslucidez

Con base en los resultados de las pruebas de solubilidad, coloque sobre papel filtro algunas gotas de uno de los lípidos más solubles en un solvente dado y déjelas secar. Repita con el resto de los lípidos solubles. Observe el resultado colocando el papel filtro frente a una fuente de luz.

Micelas

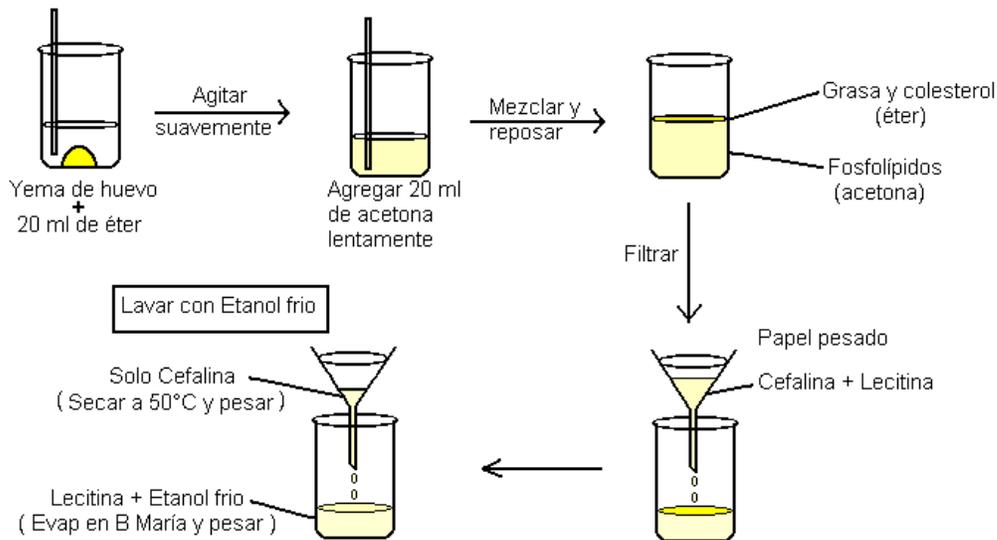
Prepare una mezcla de aceite de olivo y lecitina (obtenida del experimento 1) de la siguiente manera: agregue al vaso que contiene la lecitina 2 ml de aceite de olivo y agite vigorosamente.

NOTA: utilice la lecitina después de pesarla.

Mezcle en un tubo de ensaye 3 ml de agua con 20 gotas de aceite de oliva; en otro tubo, mezcle 3 ml de agua con 20 gotas de la solución de lecitina disuelta en aceite de oliva; agite suavemente para observar micelas y después vigorosamente para comparar la solubilidad.

Práctica #4. Obtención de lípidos y distinción de algunas de sus propiedades

Extracción y separación de cefalina y lecitina



NOTA: Para calcular el rendimiento, pese tanto el papel como el vaso con y sin cefalina y lecitina respectivamente.

Solubilidad de los lípidos

	Margarina	Mantequilla	Manteca	Aceite
Agua				
Acetona				
Éter				
Cloroformo				
Etanol				

Prueba de traslucidez

Cloroformo + aceite = gotas en papel filtro > secar > observar a contraluz

Micelas

- ① Diluir lecitina en 2 ml de aceite de oliva
- ② 3 ml agua + 20 gotas de aceite de oliva = _____
- ③ 3 ml agua + 20 gotas solución de aceite de oliva y lecitina = _____

RESULTADOS

Experimento #1. Extracción y separación de cefalina y lecitina de huevo

Reporte todos los datos de los pesos, y con base a estos, calcule los rendimientos para cada uno de los fosfolípidos.

Experimento #2. Solubilidad de los lípidos

En forma de una tabla presente los resultados de las pruebas de solubilidad de los lípidos.

Experimento #3. Prueba de translucidez

Elabora una lista con las mezclas de mayor a menor translucidez.

Experimento #3. Prueba de translucidez

Describe brevemente en qué tubo sucede y cómo es la formación de micelas, después compara los tubos después de agitarlos y describe el fenómeno observado.

CUESTIONARIO

1. Escriba la fórmula de la lecitina y la cefalina.
2. ¿Qué efecto tiene la lecitina en la solubilidad del aceite de oliva y porqué?.
3. Escriba la fórmula estructural completa de un fosfolípido que posea una carga neta negativa, otro de carga positiva y otro de carga neutra a pH 7. Explicando el porqué de su carga en cada caso.
4. Explique en detalle porqué al colocar una gota de solución de lípidos en papel filtro, queda una mancha al secarse.

PRÁCTICA No. 5

CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son biomoléculas con una gran diversidad de funciones biológicas, cuya unidad estructural básica son los aminoácidos. Las proteínas se dividen en simples, constituidas únicamente por aminoácidos; y conjugadas que, además de aminoácidos, cuentan con un grupo prostético, como metales, ácidos nucleicos, carbohidratos o lípidos.

Los aminoácidos se ligan entre sí mediante el enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el amino del siguiente. Este enlace se efectúa con la eliminación de una molécula de agua. Puesto que una proteína está formada por la unión de numerosos aminoácidos, el número de proteínas que puede sintetizarse es muy grande, sabiendo que son veinte los aminoácidos que podemos conjugar.

Estas importantes macromoléculas son de sumo interés en el estudio y comprensión de la vida, desempeñan papeles fundamentales en las paredes celulares, membranas, parte líquida de las células y otras partículas y estructuras celulares así como en la sangre, tejido conectivo y músculos; además actúan como catalizadores enzimáticos y hormonas que regulan muchos fenómenos que ocurren en el organismo.

Usando el método de Folin-Lowry, las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína, tal como sucede en el ensayo de Biuret y la reacción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína. La intensidad depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y cambiará según la clase de proteínas.

La capacidad de un compuesto para absorber fotones depende de su estructura atómica, y en particular de la ordenación de los electrones que rodean al núcleo. El espectro de absorción de un compuesto indica su capacidad para absorber la luz en función de la longitud de onda.

En este caso la intensidad del color en la solución va a determinar la cantidad de proteínas. A mayor absorbancia, mayor intensidad del color y por lo tanto mayor cantidad de proteínas.

OBJETIVO

Ensayar el desarrollo de una curva estándar con un método indirecto para medir proteínas.

MATERIAL

Ⓐ Por equipo

- ✓ 1 Pipeta de 1ml
- ✓ 1 Pipeta e 10 ml
- ✓ 1 Gradilla
- ✓ 6 Tubos de ensayo de 15 X 150 mm.
- ✓ Piceta para agua destilada

ⓑ Por grupo de trabajo

- ✓ 3 Espectrofotómetros
- ✓ 9 Celdas para espectrofotómetro

ⓒ Reactivos

- ✓ Solución 1. solución alcalina de carbonato de sodio (Na_2CO_3 20 g/l en NaOH 0.1 M, 2.5 litros).
- ✓ Solución 2. Se prepara con una solución de sulfato de cobre (Solución A) 5 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y otra de tartrato sodio potasio 10 g/l) que se mezclan hasta su uso.
- ✓ **Solución alcalina:** Prepararse el mismo día de la práctica, mezclando 50 ml de solución 1 y 1 ml de solución 2.
- ✓ **Reactivo de Folin-Ciocalteu.** Diluya el reactivo comercial con H_2O destilada (1:2) el mismo día que se va a utilizar. Esta es una solución de tungstato de sodio y molibdato de sodio en H_3PO_4 y HCl.

ⓓ Material biológico

- ✓ Solución de albúmina 0.4 mg/ml

PROCEDIMIENTO

Para realizar la curva estándar de proteínas, se utilizan las siguientes concentraciones de albúmina:

- Tubo 1 400 $\mu\text{g/ml}$
- Tubo 2 200 $\mu\text{g/ml}$
- Tubo 3 100 $\mu\text{g/ml}$
- Tubo 4 50 $\mu\text{g/ml}$
- Tubo 5 CERO (tubo blanco)

Se preparan las diferentes concentraciones de albúmina de la siguiente manera:

Tubo 1: 1 ml de albúmina 400 $\mu\text{g/ml}$

Tubo 2: 1 ml de albúmina 400 $\mu\text{g/ml}$ + 1 ml de agua destilada, se agita bien

Tubo 3: 1 ml de albúmina 200 $\mu\text{g/ml}$ del tubo 2 + 1 ml de agua destilada, se agita bien

Tubo 4: 1 ml de albúmina 100 $\mu\text{g/ml}$ del tubo 3 + 1 ml de agua destilada, agitar bien y eliminar 1 ml de la mezcla

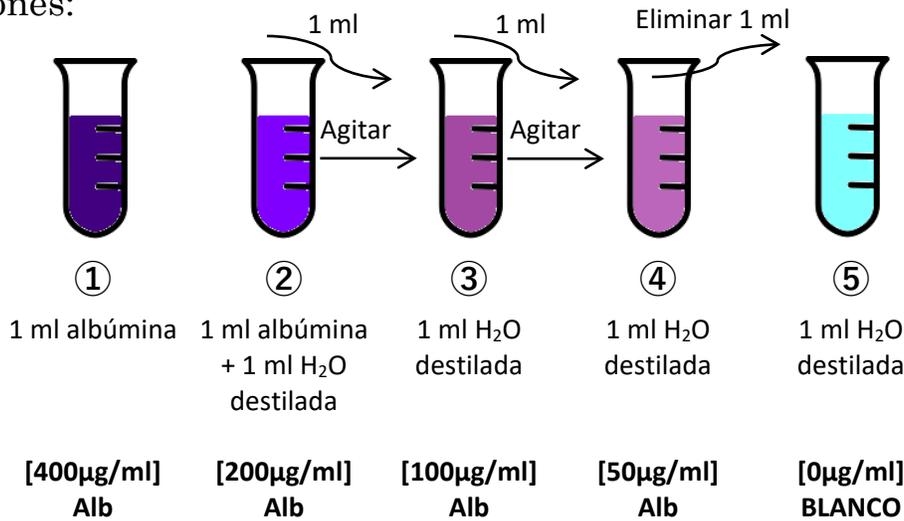
Tubo 5: 1 ml de agua destilada.

Después de preparar las diferentes concentraciones de albúmina, se procede con el método de Folin-Ciocalteu. Se añade a cada tubo 5 ml de solución alcalina, se mezcla vigorosamente cada uno de los tubos y se dejan reposar a temperatura ambiente por un mínimo de 10 min. Agregue a cada tubo 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en forma rápida y agite de inmediato.

Después de 30 minutos de reposo, con el tubo blanco se calibra el espectrofotómetro a 0 de absorbancia a una longitud de onda de 580nm. Enseguida se mide la absorbancia de los tubos 4, 3, 2 y 1 (en orden ascendente de concentración).

Práctica #5. Cuantificación espectrofotométrica de proteínas

Diluciones:



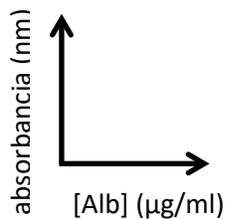
Método de Folin-Ciocalteu:

- ① Añadir a los 5 tubos 5 ml de solución alcalina
- ② Mezclar vigorosamente y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos
- ③ Agregar rápidamente 0.5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y agitar inmediatamente
- ⑤ Dejar reposar durante 30 minutos

Determinación espectrofotométrica:

- ① Utilizar el tubo blanco para calibrar a 580nm
- ② Leer los tubos en orden ascendente de [Alb] (tubo 5, 4, 3, 2, 1)

Gráfica:



RESULTADOS

Tubo	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (nm)
1		
2		
3		
4		
5		

Reporte sus resultados con una gráfica, correctamente trazada, de la curva de proteínas, realícela en papel milimétrico.

CUESTIONARIO

1. Explique por qué se usa una longitud de onda de 580 nm para leer estas soluciones.
2. De acuerdo al fundamento del espectrofotómetro, por qué a la longitud de onda específica 580 nm y no a otra de todo el espectro de luz, la absorbancia del compuesto colorido es la máxima.
3. ¿La cuantificación de proteínas puede llevarse a cabo por la absorbancia de luz UV? ¿Por qué?
4. Usando su curva estándar resuelva el siguiente ejercicio: por el método de Folin-Ciocalteu una solución de albumina tiene una absorbancia de 0.57 a 580 nm. Calcule la concentración de la solución de albumina.

PRÁCTICA No. 6

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

INTRODUCCIÓN

El que las proteínas son sustancias bien definidas no fue completamente aceptado hasta después de 1926, cuando James Sumner cristalizó por primera vez una enzima, la ureasa de la soja. Con anterioridad se creía que las elevadas masas moleculares de las proteínas procedían de una agregación coloidal o más bien de sustancias misteriosas mal definidas de masas moleculares bajas. Una vez que se comprobó que era posible, en principio, el purificar a las proteínas, comenzó seriamente el trabajo para conseguirlo.

La separación de proteínas se fundamenta en su carga eléctrica y esta depende directamente de sus propiedades ácido-básicas, las cuales están determinadas por el número y los tipos de grupos R ionizables de sus cadenas polipeptídicas.

Las proteínas son portadoras, en general, de numerosos grupos ionizables que exhiben una diversidad de valores de pK. Cada proteína muestra un valor de pH característico en el que las cargas positivas de la molécula se contrarrestan exactamente con las cargas negativas. A este valor de pH, que es el punto isoeléctrico, la molécula no es portadora de una carga neta. Este es el punto en donde presenta su menor solubilidad, aunque se puede precipitar y separar en las proximidades de su pI.

En el caso de la caseína o proteína de la leche, el principio de la separación está dado por la precipitación que sufre la mayoría de las proteínas en su punto isoeléctrico. En este caso el pH al cual se precipita la caseína es de 4.8. Además, la caseína es insoluble en el alcohol, lo que facilita su separación de las grasas lácticas. En cuanto a la clara de huevo, las proteínas pueden ser separadas con base al mismo principio utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a saturación.

OBJETIVO

Que el estudiante realice la extracción de proteínas de la leche y de la clara de huevo para su cuantificación en gramos.

MATERIAL

Ⓐ Por equipo

- ✓ 1 Vaso de precipitados de 250 ml
- ✓ 1 Vaso de precipitados de 100 ml
- ✓ 1 Agitador de vidrio
- ✓ 1 Mechero de Bunsen
- ✓ 1 Tripié
- ✓ 1 Tela de asbesto
- ✓ 1 Embudo
- ✓ 1 Piceta para agua destilada
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ 1 Pipeta Pasteur con goma
- ✓ 1 Tela magitel
- ✓ 1 Gradilla
- ✓ 1 Probeta de 100 ml

ⓑ Por equipo de trabajo

- ✓ 1 Centrífuga
- ✓ 2 Tubos para la centrífuga
- ✓ 1 Termómetro
- ✓ 1 Papel filtro
- ✓ 1 Horno
- ✓ 1 Balanza granataría o analítica

ⓒ Reactivos

- ✓ 1.5 L de ác. acético al 1%
- ✓ 2 L de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ✓ 600 ml de etanol al 95%
- ✓ 600 ml de éter etílico

ⓓ Material biológico

- ✓ 100 ml de leche *
- ✓ 1 huevo *

NOTA: * Material que cada equipo deberá aportar.

PROCEDIMIENTO***Separación de caseína***

En un vaso de precipitados de 250 ml coloque 100 ml de leche y en otro vaso de 250 ml coloque 100 ml de ácido acético al 1%. Ambas soluciones se calientan en baño María hasta alcanzar una temperatura de 40°C.

NOTA: Cada equipo de trabajo deberá llevar a cabo el experimento usando leche de distinta procedencia.

Después añada lentamente el ácido acético a la leche agitando suave y continuamente. Cuando observe la formación de flóculos,

verifique el pH y agregue el resto del ác. acético; deje enfriar la mezcla para filtrarla a través de la muselina (tela *magitel*). Lave el precipitado con 50 ml. de agua destilada. Agregue el precipitado a un vaso conteniendo 20 ml de etanol.

Filtre en un papel filtro previamente pesado, lave el precipitado con una mezcla de 10 ml de etanol y 10 ml de éter. Lavar por segunda vez el precipitado con 20 ml de éter.

Al término de esto, extienda con un agitador de vidrio la proteína obtenida sobre el papel filtro, luego colóquelo sobre una hoja de papel dentro de una charola metálica. Introduzca la charola en un horno Pasteur a 50°C hasta que la caseína esté completamente seca. Se deja enfriar y se pesa.

Separación de albúmina

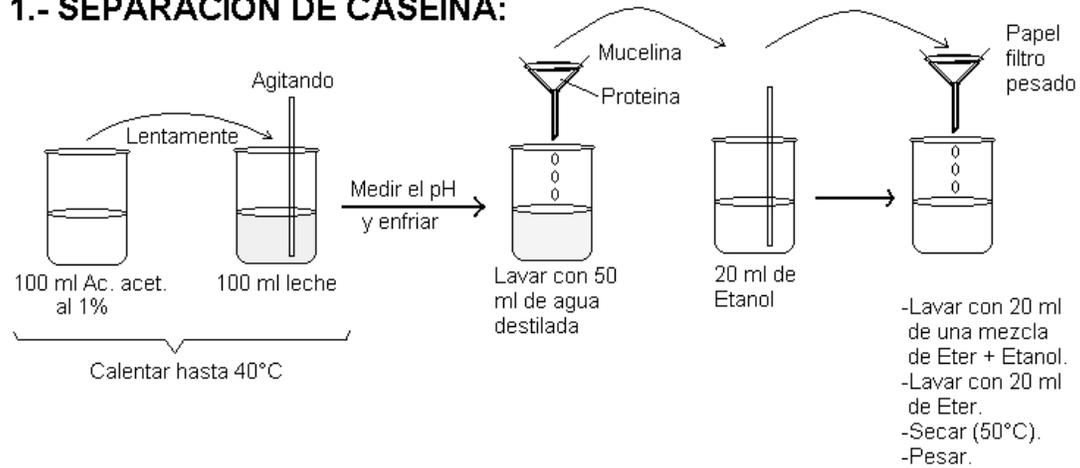
Separe la clara de un huevo o dos en caso de ser necesario y mida 20 ml en una probeta, evitando la presencia de coágulos.

Coloque la clara en un vaso de precipitados y añada un volumen igual de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Agitar hasta que las proteínas precipiten.

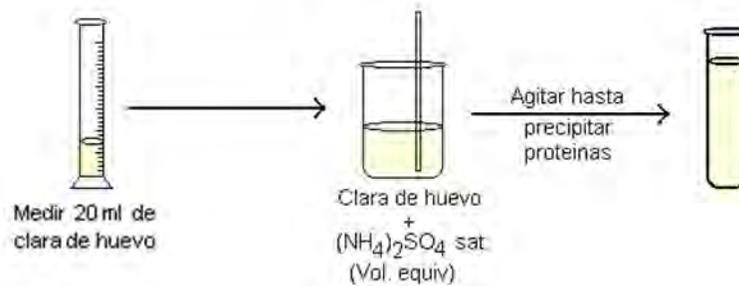
Coloque en tubos de centrífuga a 3000 rpm. durante 10 minutos y descarte el sobrenadante. Lave el precipitado añadiendo a cada tubo con proteína 3 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y centrifugue de nuevo. Deseche el sobrenadante y pese el precipitado obtenido.

Práctica #6. Separación de proteínas

1.- SEPARACIÓN DE CASEINA:



2.- SEPARACIÓN DE ALBÚMINA:



- Colocar en tubos de centrifuga previamente pesados.
- Centrifugar a 3000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 3 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sat. y volver a centrifugar.
- Eliminar el sobrenadante.
- Pesar el precipitado.

RESULTADOS

Experimento #1. Separación de caseína

Reporte todos los datos de los pesos, y con base en estos, calcule el rendimiento de caseína en g/l. Reporte el pH al cual se llevó a cabo la precipitación de caseína.

Experimento #2. Separación de albúmina

Reporte todos los datos de los pesos, y con base en éstos, calcular el rendimiento de la albúmina de clara de huevo en g/l.

CUESTIONARIO

1. En la separación de proteínas, ¿Qué importancia tiene el punto isoeléctrico (pI)?
2. Las sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitan las proteínas. En forma clara y concisa explique porqué.
3. ¿Qué proteínas y en qué porcentaje se encuentran en la clara de huevo?
4. De acuerdo a su función biológica, ¿Cuántos tipos de proteínas existen, dónde y cómo actúan? Muéstrelo en forma de tabla.

BIBLIOGRAFÍA

(Existente en la biblioteca de la Facultad de Biología)

-Voet, D. y G. J. Voet (2004) **Bioquímica**. 3ª ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

-McKee, Trudy y James R. McKee (2003) **Bioquímica**. 3ª ed. Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.

-Mathews, Van Holde (2002) **Bioquímica**. 3ª ed. Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.

-Laguna, José y Enrique Piña Zarza, (2002) **Bioquímica**. Editorial Manual Moderno-UNAM. D.F., México.

-Lehninger (1995) **Bioquímica**. 2ª ed. Ediciones Omega. Barcelona, España.

-Stryer, Lubert (1995) **Bioquímica**. 4ª ed. Editorial Reverté. España.

Imagen de portada tomada de:

<http://wallpapercave.com/w/mtHN9DI>