

Trabajo Práctico N°11 y N°12 Azúcares, Aminoácidos y Proteínas

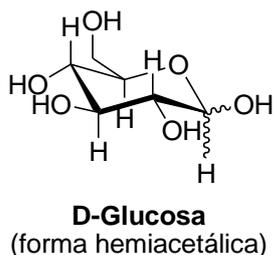
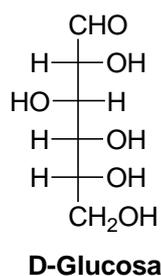
OBJETIVOS

- ✓ Análisis de la composición de la leche de vaca.
- ✓ Comprobar experimentalmente el carácter reductor de la lactosa mediante ensayos de reconocimiento y mutarrotación.
- ✓ Reconocimiento del carácter proteico de la caseína por ensayos químicos y producción de una resina de intercambio.
- ✓ Evaluación del poder reductor de diferentes almidones.
- ✓ Verificación de la acción de las amilasas (proteínas solubles) sobre la estructura de la amilosa.
- ✓ Análisis del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de las amilasas.

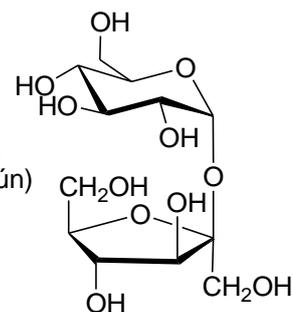
INTRODUCCION TEORICA

Los hidratos de carbono son moléculas de origen natural que responden a la fórmula $C_n(H_2O)_n$, de allí su nombre. Son sintetizados por las plantas a partir del CO_2 y la luz solar, y son utilizados para diversos propósitos, siendo los más preponderantes el almacenamiento de energía y la conformación del tejido de sostén. Desde el punto de vista químico, se caracterizan por poseer un grupo funcional carbonilo, en su forma de aldehído o de cetona, y varias funciones hidroxilo, por lo cual puede decirse que los hidratos de carbono son **polihidroxialdehídos y polihidroxicetonas**.

Los aldehídos y cetonas reaccionan con alcoholes para dar hemiacetales, acetales, hemicetales y cetales, por lo que en los polihidroxialdehídos y polihidroxicetonas son comunes las reacciones intra e intermoleculares. Como resultado de la reacción intramolecular, los **monosacáridos** se encuentran ciclados en anillos de 5 y 6 miembros llamados furanosas y piranosas respectivamente. Debido a las reacciones intermoleculares entre monosacáridos, los carbohidratos pueden formar cadenas mediante uniones acetálicas, dando origen a dímeros, trímeros, etc., hasta llegar a polímeros, conocidos como **polisacáridos**. Las uniones entre diferentes monómeros de un polisacárido reciben el nombre de **uniones glicosídicas**. Dada la alta funcionalidad de estas moléculas, las posibilidades de unión en sitios diferentes, aún entre monosacáridos de un mismo tipo, son enormes, dando lugar a la formación de estructuras tanto lineales como ramificadas, en un sinnúmero de combinaciones. Uno de los azúcares más comunes es la glucosa, la cual forma parte de nuestra alimentación en su forma polimérica como almidón, o bien en su forma de disacárido en la sacarosa o azúcar común de mesa, junto con la fructosa.



Sacarosa
(azúcar común)



Como ya mencionamos, una de las funciones más conocidas de los carbohidratos es la de formación de tejidos de **sostén** (celulosa en vegetales, quitina en insectos) y de **almacenamiento de energía** (almidón y glucógeno), pero su función no se limita a ese desempeño básico. Se ha descubierto que, debido precisamente a su complejidad estructural, los hidratos de carbono tienen un rol esencial en numerosos procesos biológicos, generalmente asociados a lípidos y a proteínas. Uno de estos procesos importantes es el **reconocimiento celular**, que tiene lugar en el proceso de reproducción. En efecto, el espermatozoide debe reconocer y unirse a un hidrato de carbono específico en la pared del óvulo para luego poder penetrar la membrana. De esta manera, un reconocimiento celular basado en hidratos de carbono se constituye en el evento primigenio de la vida de todos. Procesos similares se verifican tanto en la infección y replicación de virus y bacterias como en el diseño de estrategias contra los mismos. Además, los hidratos de carbono están involucrados en procesos de transmisión de señales entre diferentes tejidos y el funcionamiento del sistema inmune, entre otros.

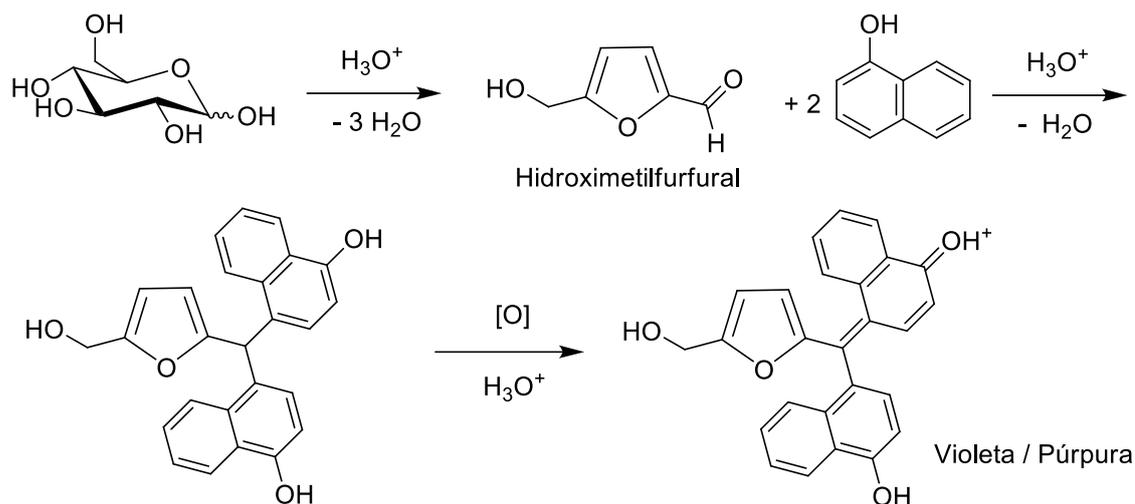
Desde el punto de vista de su reactividad, los azúcares que reaccionan rápidamente con los reactivos de Tollens y de Fehling, indican la presencia de la función aldehído en su estructura y se denominan **azúcares reductores**. Estos también reaccionan con 2,4-dinitrofenilhidrazina dando el precipitado coloreado característico. Otros monosacáridos, como por ejemplo la D-fructosa, reaccionan más lentamente indicando que se trata de polihidroxicetonas, menos reactivas. Los azúcares que no reaccionan, se denominan **no reductores**, e indican que su carbonilo reductor se encuentra comprometido en una unión glicosídica, que es no reactiva en las condiciones de los ensayos.

Existen algunos test utilizados específicamente para carbohidratos, tales como **Test de Molisch**, **el Test de Seliwanoff**, **el Test de Bial** y **el Test de Benedict**. El **Test de Molisch**, **el de Bial** y el de **Seliwanoff** se basan en la formación de un producto coloreado con furfural e hidroximetilfurfural generados a partir de la deshidratación del azúcar.

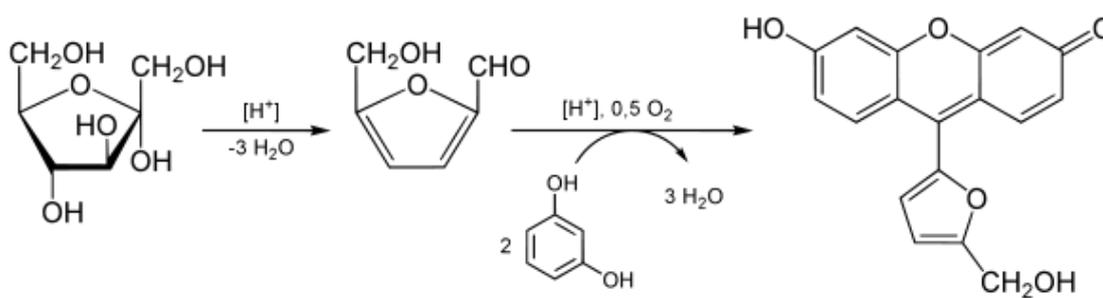
El **Test de Molisch** da positivo para pentosas y hexosas. Como utiliza un medio ácido muy fuerte (H_2SO_4), los oligosacáridos y carbohidratos no reductores se hidrolizan *in situ* y dan reacción positiva, aunque suelen tardar más tiempo.

En **Test de Seliwanoff** también utiliza medio ácido y da reacción positiva con aldosas y cetosas, pero dado que las cetosas se deshidratan más rápido, el tiempo que se tarda en desarrollar la señal positiva permite distinguir entre aldosas y cetosas.

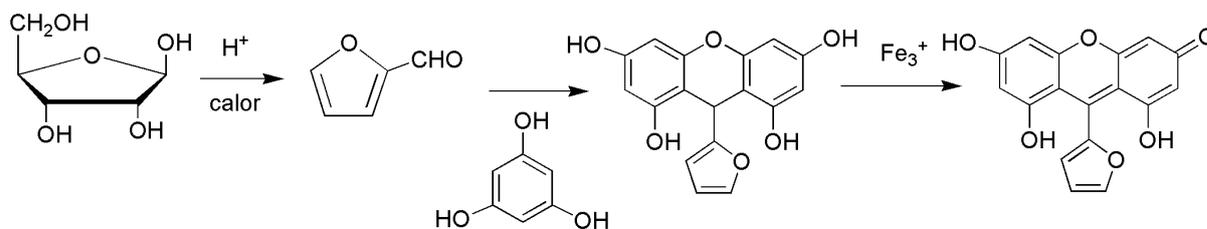
El **Test de Bial** se basa en el mismo principio, pero se utiliza para distinguir hexosas de pentosas, teniendo en cuenta que estas forman el furfural más rápido que las hexosas el hidroximetilfurfural, por lo tanto, la reacción **no es absolutamente específica** para las pentosas.



Reacción del Test de Molisch para hexosas



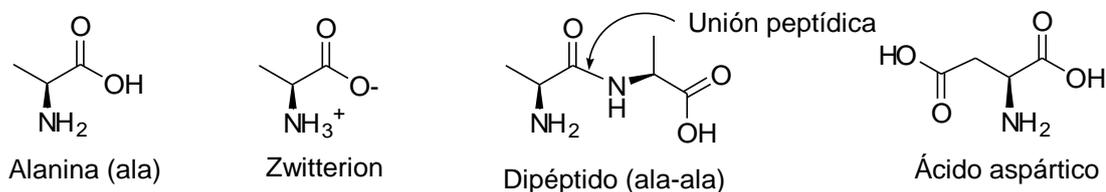
Reacción del Test de Seliwanoff para cetosas



Reacción del Test de Bial para pentosas

En el **Test de Benedict** se aplica para la detección de carbohidratos reductores, y suele dar diferentes coloraciones dependiendo el tipo de azúcar y la cantidad de extremos reductores (en muestras de polisacáridos). Se basa en una reacción de óxido-reducción con Cu^{2+} , al igual que el reactivo de **Fehling**, pero en este caso, el agente complejante es el ión citrato. La reacción de **Benedict** se utiliza cualitativamente para determinar presencia de glucosa en orina y detectar casos de diabetes, mientras que el ensayo de **Fehling** se utiliza de forma cuantitativa como agente titulante para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra (por ejemplo, en dulce de leche). Para mayor información sobre estructura y reactividad de los hidratos de carbono, ver las teóricas correspondientes a esta materia.

Otro grupo importante de productos naturales son las proteínas. Estas moléculas también tienen características poliméricas, ya que se construyen a partir de bloques estructuralmente más pequeños: los aminoácidos. Los α -aminoácidos son moléculas cuya particularidad consiste en contar con un grupo carboxílico y un grupo amino en la posición α al carbonilo. Debido a la presencia de un grupo ácido y uno básico dentro de la misma molécula, estos se neutralizan mutuamente, dando origen a una especie que posee tanto una carga negativa como una carga positiva, que se denomina **zwitterion**. También pueden contar con grupos amino extra (aminoácidos básicos), grupos carboxilo extra (aminoácidos ácidos), aromáticos y heterociclos. Algunos aminoácidos no pueden ser producidos por el cuerpo humano, por lo cual deben ser necesariamente ingeridos a través de la dieta, y por lo tanto se denominan **aminoácidos esenciales**. Así como los hidratos de carbono se enlazan entre sí por uniones glicosídicas, los aminoácidos lo hacen a través de uniones amida para formar moléculas más complejas, las cuales, dependiendo de su peso molecular, se denominan péptidos o proteínas. La unión amina entre dos unidades de aminoácido es lo que se conoce con el nombre de **unión peptídica**.

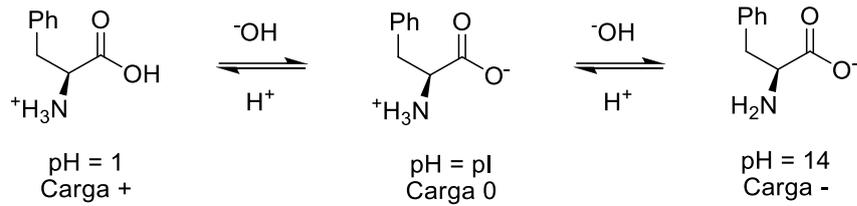


Excepto la glicina, que sólo tiene dos átomos de carbono, los aminoácidos son sustancias quirales, es decir que presentan isomería óptica. Los aminoácidos que entran en la composición de las proteínas de los organismos eucariotas (cuyas células tienen núcleo) tienen todos la configuración **S** en el C- α , y pertenecen a la denominada **serie L**.

Algunos péptidos resultan de mucha importancia, ya sea desde el punto de vista metabólico como desde el punto de vista comercial. Un dipéptido comercialmente importante y mundialmente conocido es el **aspartamo**, que está conformado por los aminoácidos aspártico y fenilalanina como metil éster. El aspartamo se utiliza como edulcorante artificial por su elevado poder endulzante, que es **160 veces** superior al de la sacarosa, por lo que son necesarias sólo pequeñas cantidades para endulzar. Por ello resulta más económico y además, está considerado relativamente seguro para el consumo humano, ya que se degrada a ácido aspártico y fenilalanina, dos compuestos naturalmente presentes en el cuerpo. Únicamente representa un riesgo para personas afectadas por fenilcetonuria (imposibilidad de metabolizar el aminoácido fenilalanina). Otro ejemplo importante es el **glutión**, un tripéptido que está presente en la mayor parte de los tejidos vivos y cumple un rol vital removiendo agentes oxidantes potencialmente peligrosos, por oxidación del -SH a disulfuro. También participa en la detoxificación de agentes carcinogénicos como los derivados de ácidos acrílicos y 2,4-dinitrohalobencenos, actuando en ambos casos como agente nucleofílico.



Los aminoácidos poseen diferentes constantes de acidez, por lo que se encuentran en su forma eléctricamente neutra a diferentes pH. El valor de pH al cual un aminoácido está en su forma neutra se denomina **punto isoeléctrico (pI)**.



Dado que una proteína se encuentra formada por numerosas unidades de aminoácidos, éstas también tendrán un pI, producto de la contribución individual de todos los aminoácidos que la conforman, y que será propio de dicha proteína, por lo que puede utilizarse para su identificación y caracterización.

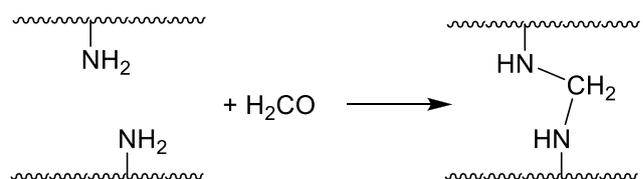
Desde el punto de vista biológico, las proteínas son de suma importancia ya que pueden tener un rol estructural (como proteínas de sostén, formando tejido conectivo) o bien cumplir un rol funcional (como enzimas que catalizan procesos biológicos).

Como se mencionó previamente, las proteínas están conformadas por α -aminoácidos, y la secuencia en que se unen estos aminoácidos es lo que se conoce como **estructura primaria** de la proteína. Estas cadenas a su vez, adoptan conformaciones en el espacio que hacen que las mismas se plieguen formando láminas o hélices, lo que se conoce como **estructura secundaria**. Estas láminas o hélices a su vez se pliegan sobre sí mismas, dando origen a una estructura tridimensional que se conoce con el nombre de **estructura terciaria**. Algunas veces, estas proteínas tridimensionales se asocian a otras unidades proteicas (generalmente por uniones hidrógeno), dando origen a un sistema funcional formado por diferentes subunidades que se conoce como **estructura cuaternaria**.

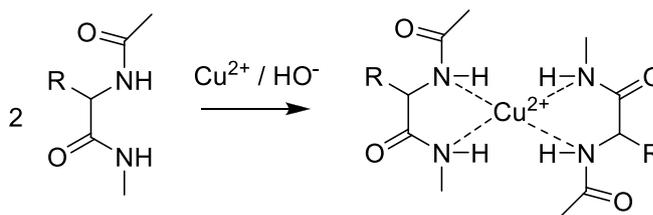
La insulina, es una hormona que regula los niveles de azúcar en sangre y tiene una estructura proteica relativamente pequeña. Está formada por dos unidades, una de 21 aminoácidos y otra de 30, unidas entre sí por dos puentes disulfuro. Normalmente las proteínas son mucho más grandes, así, por ejemplo, una de las ribonucleasas más pequeñas presentes en vacunos tiene 124 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro internos.

De acuerdo con sus propiedades, las proteínas pueden clasificarse en dos grandes grupos: proteínas fibrosas y proteínas globulares. Las proteínas fibrosas tienden a establecer interacciones entre diferentes cadenas, mientras que las globulares tienden a replegarse sobre sí mismas adoptando un arreglo compacto de aspecto semiesferoidal. Debido a esta forma, las proteínas globulares son fácilmente solubles en medios acuosos, como suspensiones coloidales.

A través de los grupos amida, que las proteínas poseen en gran cantidad, éstas pueden formar complejos con el Cu^{2+} . Estos complejos suelen tener coloraciones azules o violáceas intensas, muy diferentes del color celeste pálido de las soluciones cúpricas. Por su intensa coloración, este tipo de complejos suele utilizarse para mediciones colorimétricas y/o espectrofotométricas de la cantidad de proteínas en una solución, por comparación contra una curva patrón. Por otra parte, los grupos amino libres remanentes de la proteína, aportados por los aminoácidos básicos, también pueden



ser utilizados para reacciones. De hecho, de la reacción de la caseína (proteína de la leche) con formaldehído se obtiene un material biodegradable con buena resistencia, buena estabilidad dimensional, insoluble e infusible. Estos materiales y la caseína misma, solían ser moldeados para la obtención de botones y otros objetos de uso diario. Hoy en día se han reemplazado por polímeros de menor costo.



Dentro de la familia de las proteínas se encuentran las enzimas, las que se caracterizan por llevar a cabo transformaciones que, en ciertos casos, son difíciles de imitar en forma artificial, por lo que suelen ser aisladas de fuentes naturales para su posterior utilización. De hecho, gracias a los avances en biotecnología es posible obtener cepas mutantes de bacterias u otros microorganismos que expresen el gen de determinadas enzimas, produciéndolas en grandes cantidades. Estas enzimas pueden ser utilizadas posteriormente en medicina o en procesos productivos.

Una enzima utilizada corrientemente en la industria es la maltasa. Las maltasas son enzimas que producen la hidrólisis del almidón (polímero de glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$), con eventuales ramificaciones en C-6). La hidrólisis del almidón genera unidades más pequeñas, que son fácilmente transformadas por levaduras en la producción de cerveza.

La hidrólisis del almidón también puede lograrse fácilmente por métodos químicos llegando a la obtención de monosacáridos, con lo cual se parte de una materia prima barata y se obtiene un jarabe de glucosa de gran poder endulzante, sin embargo, éste poder endulzante puede aumentarse aún más si se convierte parte de la glucosa en fructosa, que es mucho más dulce. Para realizar este proceso se utilizan isomerasas, las cuales obran la transformación de la glucosa en fructosa, obteniéndose de ese modo los llamados "**jarabes de alta fructosa**". El jarabe de alta fructosa es muy utilizado en la industria de la alimentación, ya que endulza las preparaciones con menores cantidades de endulzante y es más barato que el azúcar de mesa. Estos jarabes son ideales para la preparación de bebidas, caramelos y otros alimentos sólidos, ya que su consistencia líquida hace que se mezclen más fácilmente con el resto de los ingredientes.

Algunos alimentos presentan preponderancia de hidratos de carbono, mientras que otros aportan lípidos o bien son ricos en proteínas, no siendo muy habitual encontrar alimentos que contengan contribuciones adecuadas de los tres. Así, los productos cárnicos son ricos en proteínas mientras que las harinas son casi en su totalidad almidones, sin embargo, las carnes no están exentas de azúcares, ya que las coloraciones doradas que aparecen durante la cocción resultan de complejas reacciones entre los azúcares y los grupos amino de las proteínas, llamadas **reacciones de Maillard**. Por otra parte, las harinas no carecen de material proteico ya que la misma reacción tiene lugar en las cortezas de los productos farináceos horneados como el pan y las galletas. En el caso de las harinas de trigo, la presencia de proteínas es esencial para la obtención de masas levadas, ya que en presencia de agua forman una red tridimensional, llamada gluten, que le da a la masa resistencia y elasticidad, con lo cual pueden retener el gas formado durante el proceso de fermentación mediado por levaduras. El gluten se forma a partir de las dos proteínas más abundantes en la harina: la glutenina y la gliadina. Estas proteínas también son llamadas prolaminas, debido a la alta cantidad de prolina y glutamina. Los pacientes celíacos no pueden consumir harinas que

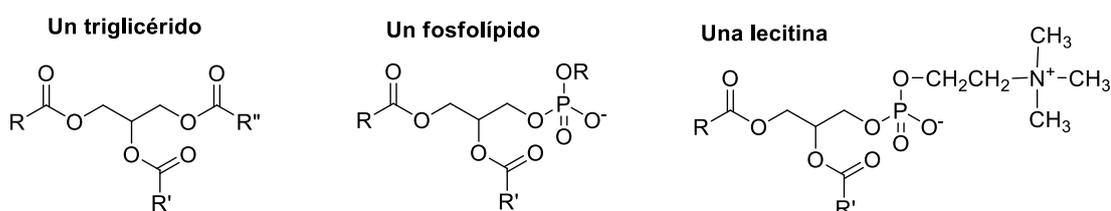
contengan gliadina, ya que sus transglutaminasas, presentes en el intestino delgado, modifican la gliadina generando una reacción del sistema inmune que ocasiona una reacción inflamatoria, que, entre otros trastornos, provoca una disminución de la absorción de nutrientes a través del intestino.

Uno de los alimentos más completos que pueden encontrarse en la naturaleza, desde el punto de vista nutricional, es la leche, ya que contiene proteínas, lípidos y carbohidratos. De hecho, la leche es el único alimento que ingieren los mamíferos durante las primeras semanas después del nacimiento, y aporta vitaminas (principalmente tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, vitaminas A, D y K), minerales, como calcio, potasio, sodio, fósforo y trazas de metales), proteínas (incluyendo todos los aminoácidos esenciales), azúcares (principalmente lactosa) y lípidos.

Los porcentajes de cada uno de estos componentes varía con la especie de animal que secreta la leche, además de verificarse oscilaciones estacionales y variaciones debidas a la alimentación. Los porcentajes promedios para cada especie se listan a continuación.

	Vaca	Humano	Cabra	Oveja	Caballo
Agua	87.1	87.4	87.0	82.6	90.6
Proteínas	3.4	1.4	3.3	5.5	2.0
Grasas	3.9	4.0	4.2	6.5	1.1
Carbohidratos	4.9	7.0	4.8	4.5	5.9
Minerales	0.7	0.2	0.7	0.9	0.4

La leche es una emulsión de grasas en agua, contiene alrededor de un 3-4% de grasas dispersas como pequeños glóbulos, de entre 5 a 10 micrones. Las grasas lácteas son principalmente triglicéridos que están formados con predominancia de ácidos grasos saturados (66 y de cadena corta (menores de 10 átomos de carbono), tales como el butírico y caproico (C-4 y C-6) (12% aprox.).



Adicionalmente la porción lipídica de la leche contiene pequeñas cantidades de colesterol, fosfolípidos y lecitinas (fosfolípidos conjugados con colina), estos últimos estabilizan la emulsión grasa, y están generalmente adsorbidos en la superficie de los glóbulos.

Dado que los glóbulos son más livianos que el agua, cuando se deja estacionar la leche los glóbulos coalescen, formando una capa en parte superior, conocida como "crema". Como las vitaminas A y D son liposolubles, dichas vitaminas se eliminan con la crema, la que se separa por centrifugación y espumado para ser vendida por separado o bien para ser utilizada en la producción de manteca. Cuando se desea comercializar la leche entera, sin que se separe la capa de crema, se la somete a un proceso de homogenización, que consiste en un tratamiento mecánico hace que los glóbulos se rompan y reduzcan su tamaño a 1 o 2 micrones.

Las grasas presentes en la leche pueden removerse utilizando éter de petróleo, éter etílico, diclorometano o cualquier otro solvente de baja polaridad.

En la leche están presentes tres tipos de proteínas: caseínas, lactalbúminas y lactoglobulinas, todas ellas del tipo globular. Las caseínas son fosfoproteínas, es decir que contienen grupos fosfato unidos a algunos de los aminoácidos de las cadenas laterales, generalmente a los grupos hidroxilos de la serina o de la treonina.

La caseína está formada, por lo menos, por tres proteínas individuales, muy similares entre sí y que difieren principalmente en el peso molecular y la cantidad de grupos fosfato que contienen: caseína α , β y κ . La caseína en la leche se encuentra como sal de calcio, debido a la presencia de los grupos fosfato, y tiene una estructura compleja. Las tres caseínas forman lo que se denomina una "unidad soluble", de hecho, las α y β caseínas (que poseen más grupos fosfato que la κ), resultan insolubles en agua en su forma de sal cálcica, solubilizándose en presencia de la κ caseína. La mayor solubilidad de la κ caseína se atribuye a que posee menor cantidad de grupos fosfato y sobre todo a la presencia de gran cantidad de hidratos de carbono unidos a la proteína.

Se cree que todos los carbohidratos unidos a la proteína además de los hidroxilos de las serinas y treoninas, quedan expuestos en sólo en una cara de la superficie externa. Esta porción de su superficie externa es fácilmente solubilizada en agua, debido a la proporción de grupos polares. La otra porción de su superficie, interactúa adecuadamente con las caseínas α y β insolubles, solubilizándolas por formación de un coloide o micela protectora alrededor de las mismas. Dado que la superficie externa se solubiliza completamente en agua, la unidad compleja se solubiliza como un todo.

El caseinato de calcio tiene un punto isoeléctrico de 4.6, por lo cual, al pH de la leche (6.6) la proteína tiene carga negativa. Cuando se agrega ácido a la leche, las cargas negativas de la superficie desaparecen y la caseína se vuelve insoluble, permaneciendo los iones calcio en solución.

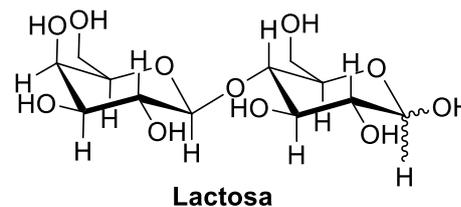
Cuando la leche se deja a temperatura ambiente, se "corta". Por acción de microorganismos (generalmente por *Lactobacillum*), se produce ácido láctico, el pH de la mezcla baja y las caseínas coagulan, produciéndose el cuajo. La fabricación de algunos productos lácteos incluye el "corte" previo por parte de bacterias de lácticas, tal es el caso de yogures, leches cultivadas, y algunos quesos.

La obtención del cuajo también se logra utilizando renina, una enzima obtenida del estómago de algunos animales. Esta peptidasa ataca a la κ -caseína, hidrolizando las uniones entre fenilalanina y metionina. De esta manera se destruye la superficie solubilizante de la κ -caseína y la micela entera precipita como sal de calcio, separándose de la porción líquida, llamada suero. El cuajo obtenido de esta manera se comercializa con el nombre de "queso cottage", y representa el primer paso en el proceso de elaboración de quesos.

Otras proteínas presentes en la leche son las lactalbúminas, proteínas globulares solubles en agua y soluciones diluidas de sales, que no obstante pueden ser desnaturalizadas y coaguladas por acción del calor. Tienen pesos moleculares de alrededor de 40.000 Da. Un tercer tipo de proteínas son las lactoglobulinas, pero están presentes en menor cantidad que las albúminas y se desnaturalizan de la misma manera. Las lactoglobulinas son sumamente importantes ya que le aportan propiedades inmunológicas a la leche y es lo que protege a los mamíferos jóvenes hasta que desarrollan su propio sistema inmune.

Una vez que se remueven las grasas y las proteínas de la leche, los hidratos de carbono quedan solubles en el suero. El principal carbohidrato en la leche es la lactosa, un disacárido

reductor formado por una unidad de galactosa piranósica unida a un residuo de glucosa a través de una unión glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$. Este disacárido es el único que sintetizan los mamíferos. Esta síntesis ocurre en sus glándulas mamarias y durante el proceso, una molécula de glucosa se epimeriza en C-4 para transformarse en una de galactosa, que se une posteriormente a otra glucosa para dar la lactosa.



Aparentemente la galactosa es necesaria para el desarrollo adecuado del cerebro y los tejidos nerviosos, de hecho, aparece formando parte de glicolípidos en células cerebrales. Además, la galactosa resulta más apropiada para formar unidades estructurales en las células debido a que es más resistente que la glucosa a la oxidación metabólica.

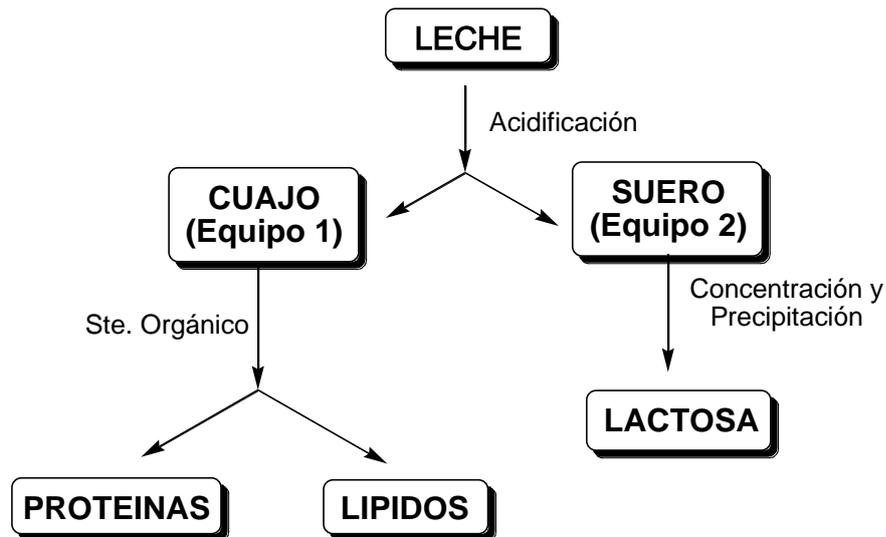
La lactosa es un azúcar reductor, y por lo tanto puede existir tanto en su forma α como en su forma β . La α -lactosa es mucho más fácil de aislar a partir de soluciones de etanol-agua, mientras que la forma β , si bien es el conformero preferencial en solución, requiere de precipitación a partir de soluciones concentradas a altas temperaturas.

Casi todos los lactantes pueden digerir la lactosa, debido a la lactasa, una enzima que es secretada por las células del intestino delgado. La lactasa hidroliza la lactosa en sus componentes originales, los cuales se digieren normalmente. Una vez que se elimina la leche y los lácteos de la dieta, la lactasa se inactiva, por lo que la lactosa no se absorbe en el intestino delgado y permanece en el tracto digestivo, donde por ósmosis se produce un ingreso de agua. En esta situación se producen calambres y severos casos de diarrea, lo que se conoce como “intolerancia a la lactosa” y es más habitual en individuos adultos.

PARTE EXPERIMENTAL

Análisis de Leche

En esta parte de la práctica se estudiará la composición de la leche vacuna. Luego de la primera etapa de separación de sus componentes fundamentales, el equipo de trabajo se dividirá en dos subgrupos: el **Equipo 1** se dedicará al tratamiento de la fracción precipitada, mientras que el **Equipo 2** analizará la parte soluble. Los resultados de ambos grupos **se discutirán en conjunto**. Si bien se entregará un **único informe**, los detalles de ambas partes deberán ser conocidos por **todos** los involucrados en cada grupo de trabajo



Pesar 100 mL de leche descremada en un Erlenmeyer de 250 mL. Colocar en un baño de agua a 40°C (**LA TEMPERATURA ES CRÍTICA, CONTROLAR CONTINUAMENTE CON TERMOMETRO**) y agregar lentamente 6 mL de solución acuosa de ácido acético 10 %. Una vez precipitada la fracción proteica, retirar del baño y filtrar la mezcla a través de un lienzo sostenido con una banda elástica en la boca de un vaso de precipitados. Exprimir para retirar la mayor cantidad posible de líquido.

Procedimiento para Equipo 1.

Con el fin de extraer los lípidos remanentes en el precipitado, tratarlo con 50 mL de etanol y agitarlo manualmente de forma suave durante 5 minutos. Dejar que el sólido se asiente y decantar el líquido y reservar. Repetir el tratamiento con 50 mL de una mezcla de 1:1 (v/v) de etanol y éter etílico (TRABAJAR BAJO CAMPANA), filtrar con succión, dejando que el aire pase a través del precipitado durante 5 minutos y reservar el sólido para la próxima clase sobre un vidrio de reloj (SIN EL PAPEL DE FILTRO).

Determinaciones cuantitativas

Los líquidos de lavado combinados se secan con sulfato de sodio anhidro, se filtran a través de papel plegado, lavando el sulfato remanente con pequeñas cantidades adicionales de éter etílico. Se colectan en un balón *tarado*, y se evapora el solvente a presión reducida. Pesar el residuo y determinar el porcentaje de grasas en la muestra original. Comparar con el valor declarado en el envase.

Clase siguiente: pesar el precipitado guardado la clase anterior. Determinar el porcentaje de proteínas y compararlo con el valor declarado en el envase.

Determinaciones cualitativas

Ensayo de Biuret (determinación de proteínas)

Tomar una porción de la proteína (aproximadamente del tamaño del tamaño de una arveja pequeña) y disolver en 2 mL de agua destilada. Colocar en tubos las siguientes soluciones:

Tubo 1: 2 mL de agua

Tubo 2: 2 mL de un *aminoácido* disuelto en agua destilada

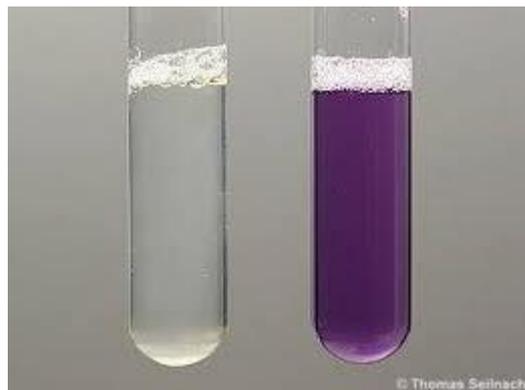
Tubo 3: 2 mL de una solución de *aspartamo*

Tubo 4: 2 mL de *clara de huevo*

Tubo 5: 2 mL de agua con 20 gotas de *saliva*

Tubo 6: 2 mL de la solución de *caseína*.

Adicionar a cada uno de los tubos 10 gotas de solución de KOH 10% y 5 gotas de una solución de CuSO₄ 3%, mezclar bien y comparar. La aparición de una coloración azul intensa ó violeta es un resultado positivo. Los péptidos suelen dar una coloración rosada.



Resina para recuperación de cationes

La resina se prepara **EN CAMPANA**. En un balón equipado **CON REFRIGERANTE**, se hierve la caseína en polvo con formaldehído (~35 %), por espacio de 5 minutos. La reacción se deja enfriar y se filtra el precipitado, lavándose con agua destilada para retirar el exceso de formaldehído. El sólido obtenido se coloca en una pipeta Pasteur, con un tapón de algodón, formando una columnita. Preparar una solución de AgNO₃ (5×10^{-3} M), que se hará pasar gota a gota, por la columna de resina de caseína. Corroborar la presencia de iones Ag⁺ a la salida de la misma por precipitación con una solución de NaCl.

Electroforesis de aminoácidos (opcional)

En una cinta de papel de filtro, sembrar un aminoácido ácido, un aminoácido básico y uno neutro. Entregar al docente el papel de filtro (debidamente rotulado con lápiz). Quién procederá a realizar la electroforesis. Una vez finalizada, se seca el papel de filtro y se revela con solución de ninhidrina y calor. Establecer la dirección de migración de los aminoácidos y discutir los resultados obtenidos.

Procedimiento para Equipo 2.

Sobre la solución obtenida luego de la precipitación de la caseína, agregar inmediatamente 2.5 g de carbonato de calcio y agitar bien. Calentar la mezcla hasta casi ebullición por alrededor de 10 minutos, agitando continuamente para que precipiten las proteínas restantes y decantar. Colectar el líquido y concentrarlo por ebullición suave hasta aproximadamente 10 mL, agregar 50 mL de etanol y calentar la solución cuidadosamente a 70° C. Filtrar la solución tibia y el líquido resultante se conserva en su armario de laboratorio en un erlenmeyer u otro recipiente limpio y tapado, hasta la clase siguiente.

En el siguiente período de laboratorio se colectan los cristales de lactosa por filtración y se los deja secar al aire por una hora.

Determinaciones cuantitativas

Una vez secos, se pesan los cristales de lactosa (**NOTA:** la lactosa precipita con una molécula de agua), se calcula el porcentaje de azúcar recuperado en referencia al producto original y se compara con la cantidad informada en el envase. **Se reservan unos cristales para los ensayos cualitativos**, el resto se utiliza para el ensayo de hidrólisis.

Determinaciones cualitativas

Cromatografía de azúcares

Si bien lo habitual es utilizar placas de celulosa o bien papel para realizar cromatografías de azúcares, dado los largos tiempos empleados en el desarrollo de las mismas se procederá a utilizar una adaptación en silicagel. En dos placas de 6x3 o 4 cm, sembrar sacarosa, lactosa, glucosa y arabinosa, secando bien entre siembra y siembra. Se desarrollan las placas con una mezcla Isopropanol:acético 2:1 y una vez desarrolladas se secan con ayuda de un secador de pelo o sobre manta calefactora.

Una de las placas se revela con un spray de Etanol:H₂SO₄ (10:1) seguido por calentamiento, mientras que la otra se revela con una solución de ácido ftálico y anilina, seguido de calor. Anotar las observaciones y discutir los diferentes comportamientos con los distintos reveladores.

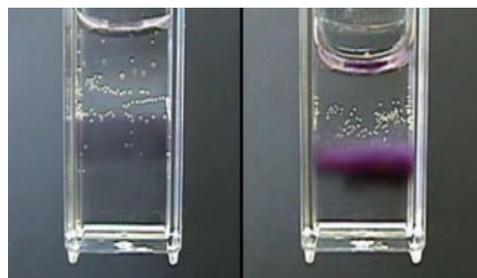
Hidrólisis de la Lactosa

Se preparan testigos de lactosa, glucosa y galactosa y se siembran en una placa de silicagel (con capacidad para sembrar 5 calles distintas) utilizando un capilar muy fino y secando bien entre siembra y siembra con ayuda de un secador de pelo o sobre manta calefactora. Preparar una solución al 2% de lactosa con el material obtenido de la leche y colocar 5 mL en un tubo de ensayo. Adicionar 1 mL de HCl 3M y agitar bien con una varilla. Sembrar esta solución en la placa. Calentar la mezcla por espacio de 10 minutos y sembrar el contenido en la placa. Desarrollar la placa en el mismo sistema que en el ítem anterior, dejar secar y revelar con una mezcla de difenilamina/anilina seguido por calentamiento. Anotar las observaciones y discutir los resultados.

Ensayo de Molisch

Colocar las siguientes soluciones en los tubos:

- Tubo 1:** 2 mL de agua + 2 gotas de reactivo de Molisch
- Tubo 2:** 2 mL de solución de una hexosa + 2 gotas de reactivo de Molisch
- Tubo 3:** 2 mL de solución de una pentosa + 2 gotas de reactivo de Molisch
- Tubo 4:** 2 mL de solución de almidón + 2 gotas de reactivo de Molisch



Una vez homogenizados, colocar cada uno de los tubos en posición inclinada y se adicionan 2 mL de ácido sulfúrico concentrado cuidando que no se mezclen las fases (el sulfúrico queda abajo). La aparición de un anillo púrpura o violeta en la interfase indica la presencia de hidratos de carbono.

Ensayo de Seliwanoff

Colocar las siguientes soluciones en los tubos:

- Tubo 1:** 2 mL del reactivo + 2 gotas de una solución de almidón al 1%
- Tubo 2:** 2 mL del reactivo + 2 gotas de una solución de una aldosa al 1%
- Tubo 3:** 2 mL del reactivo + 2 gotas de una solución de una cetosa al 1%
- Tubo 4:** 2 mL del reactivo + 2 gotas de una solución de sacarosa al 1%



Tubo 5: 2 mL del reactivo + 2 gotas de una solución de lactosa al 1%

Una vez homogenizados, se calientan los tubos en un baño de agua hirviendo por 1 minuto. La aparición de una coloración púrpura roja indica positivo para cetosas. Retirar los tubos con reacción positiva al minuto y seguir calentando el resto, tomando nota del tiempo transcurrido hasta la aparición del color rojo.

Ensayo de Bial

Colocar las siguientes soluciones en los tubos:

Tubo 1: 2 mL del reactivo + 2 mL de una solución de almidón al 1%

Tubo 2: 2 mL del reactivo + 2 mL de una solución de una aldohexosa al 1%

Tubo 3: 2 mL del reactivo + 2 mL de una solución de un disacárido al 1%

Tubo 4: 2 mL del reactivo + 2 mL de una solución de una pentosa al 1%

Tubo 5: 2 mL del reactivo + 2 gotas de una solución de cetosa al 1%

Una vez homogenizados, se calientan los tubos en un baño de agua hirviendo y se calienta hasta que empiece a hervir. La aparición de una coloración verde-azul indica positivo para pentosas. Retirar los tubos con reacción positiva seguir calentando el resto, tomando nota del tiempo transcurrido hasta la aparición del color (límite 20 minutos).

Ensayo de Benedict

En un mortero se colocan dos o tres capas de una cebolla y se machacan con el agregado de algunas gotas de agua. Reservar el líquido obtenido, limpiar bien el mortero y realizar el mismo procedimiento con algunos trozos de zanahoria y con algunas rodajas de papa.

Colocar en ocho tubos, 2 mL del reactivo de Benedict y calentar hasta que hierva suavemente. Agregar 2 o 3 gotas de las siguientes soluciones:

Tubo 1: agua destilada

Tubo 2: solución de la lactosa obtenida

Tubo 3: solución de glucosa

Tubo 4: solución de sacarosa

Tubo 5: solución de almidón

Tubo 6: jugo de las cebollas

Tubo 7: jugo de las zanahorias

Tubo 8: jugo de las papas.



Y continuar con la ebullición por un minuto o dos. Observar los resultados. La aparición de un color amarillo, verde o precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores. El color dependerá de la cantidad de grupos reductores presentes.

Interacción de proteínas y carbohidratos.

Algunas enzimas tienen como sustrato a los hidratos de carbono. Tal es el caso de la maltasa y su acción sobre el almidón. En esta parte de la práctica se verificará dicha interacción como así también la influencia del pH y la temperatura.

Colocar en tubos las siguientes soluciones:

Tubo 1: 4 mL de agua destilada,

Tubo 2: 4 mL de solución de lactosa

Tubo 3: 4 mL de solución de almidón

Tubo 4: 4 mL de solución de almidón + 4ml de solución de maltasa.

Tubo 5: 4 mL de solución de almidón + 4ml de solución de maltasa.

Tubo 6: 4 ml de solución de almidón+4ml de solución de maltasa (previamente hervida).

Tubo 7: 4 mL de solución de almidón + 4ml de solución de maltasa + HCl.

Agregar a cada tubo 1 o 2 gotas de solución de triioduro ($I_2 + KI$), homogenizar y dejar reposar durante 10 minutos. El desarrollo de una coloración azul indica la presencia de almidón. Calentar el **Tubo 3** en baño de agua y luego dejar enfriar a temperatura ambiente. Registrar los cambios. Calentar el **Tubo 5** en baño maría a 60-65°C, observar los resultados y comparar con los obtenidos en los **Tubos 3, 4 y 6**. Comparar con los resultados del **Tubo 7** y justifique los cambios observados en cada uno.

Bibliografía Adicional

- An exotic Material from Milk-Casein, *Maryknoll Convent School*.
- Klipfel, J., Mauch, J. (2005). *Milk Magic*. October 2, 2006 from the California State University website: www.csun.edu/scied/4-discrpeant-event/milk_magic/index.html.
- Experiment 21, "Isolation of Protein, Carbohydrate and Fat from Milk", en Mohr. S.C., Griffin, S.F., and Gensler, W. J. *Laboratory Manual for Fundamentals of Organic and Biological Chemistry by John McMurry and Mary E. Castellion*, Inglewood Cliffs, Prentice-Hall, 1994 and Wayne P. Anderson (4/2002).
- Isolation of Lactose from Milk, Organic Chemistry Laboratory, Revision 1.0 (CHEM 334L)

INFORME DE RESULTADOS

- Formule todas las reacciones involucradas en la práctica.
- Consigne todas las observaciones pertinentes realizadas durante el tratamiento de la leche.
- Informe los resultados cuantitativos y discuta si coinciden con lo declarado en el envase.
- Discuta los resultados obtenidos por aplicación de los ensayos cualitativos
- Elabore sus propias conclusiones acerca de los resultados obtenidos en cada etapa de la práctica.
- Extraer de las hojas de seguridad de los reactivos utilizados en la práctica, la información de seguridad esencial para el trabajar de manera segura en el laboratorio.

Cuestionario

- 1.- Escriba las reacciones de Tollens y Fehling para un monosacárido. Explique en qué orden se agregan los reactivos y qué observación indica un resultado positivo. Explique por qué las cetosas tardan más en reaccionar.

Indique cuál sería el comportamiento observado de los siguientes azúcares con el reactivo de Tollens:

- a.- Ribosa
- b.- Lactosa
- c.- Fructosa
- d.- Metil α -D-glucopiranosido

- 2.- ¿Qué designa el nombre de “azúcar invertido”? ¿a qué obedece tal denominación? ¿Qué ventaja representa sobre la sacarosa? ¿De qué manera se obtiene azúcar invertido?
- 3.- ¿De qué variables depende el ángulo de desviación de la luz polarizada (rotación óptica)?
- 4.- Defina poder rotatorio específico, $[\alpha]_D^{20}$. ¿Cuál es la utilidad del método polarimétrico con azúcar invertido, para determinar la concentración de sacarosa en muestras complejas?
- 5.- Explique por qué es necesario utilizar ácido sulfúrico en el test de *Molisch*.
- 6.- ¿En qué consiste el Test de Benedict? Escriba la reacción base del ensayo e indique qué reactivos se usan.
- 7.- En función del comportamiento evidenciado por los distintos experimentos discuta acerca del peso molecular de los almidones y/o contenido de carbohidratos en cebollas, zanahorias y papas.
- 8.- Explique cuáles son los componentes principales de la leche que se determinaron en la práctica y discuta
 - a.- ¿Qué función cumple el agregado del acético?
 - b.- ¿Qué función cumple el agregado de carbonato de calcio? ¿qué podría ocurrir si calienta antes de dicho agregado?
 - c.- ¿Por qué hace la determinación de grasas por extracción sobre el precipitado?
 - d.- ¿Cuáles son las principales proteínas presentes en la leche y qué función cumplen?
- 9.- Formule las reacciones ocurridas con los azúcares y los distintos reveladores. Evalúe la utilidad de aplicar uno u otro revelador.
- 10.-¿Cuál es la naturaleza del material obtenido por reacción de la caseína con el formaldehído? ¿A que se debe su capacidad para retener cationes?
- 11.- Para la identificación de aminoácidos se emplea la reacción con ninhidrina. Investigue en qué reacción se basa y que señal indica resultado positivo.
- 12.-Establezca las diferencias entre celulosa y almidón, y dentro del almidón, las diferencias estructurales existentes entre amilosa y amilopectina. ¿Qué observa de la interacción del almidón con el triioduro? Justifique la observación.
- 13.-¿Qué conclusiones saca acerca del comportamiento observado entre la maltasa y el almidón frente a la interacción de éste último con el triioduro?
- 14.-La determinación de proteínas en medios biológicos se basa en la utilización del ensayo de Biuret y la aplicación de métodos espectrofotométricos. ¿Cómo se realiza dicha determinación?