

1 PROBLEMAS DE PREPARACION DE SOLUCIONES (Tomados del Lehninger)

1. Calcular la fracción molar de los componentes en una solución que contiene 64 g de alcohol metílico (CH_3OH) y 144 g de agua.
2. Calcular la molalidad de una solución que contiene 32 g de naftaleno, (C_{10}H_8), en 500 g de benceno (C_6H_6).
3. En qué volumen de solución deben disolverse 27 g de cloruro de cinc para preparar una solución 0,1M.
4. Exprese la concentración de las siguientes soluciones en mg/ml., luego calcule el peso de soluto para los volúmenes requeridos:
 - a. Solución de cloruro de amonio 0,1M. Volumen requerido: 50 ml.
 - b. Solución de cloruro férrico 0,5M Volumen requerido: 250 ml.
 - c. Solución de sulfato de sodio 0,25M. Volumen requerido: 1.250 ml.
5. Una solución al 85% de ácido fosfórico tiene una densidad de 1,689 g/ml. Calcúle el volumen de ácido necesario para preparar 15 L. de solución 0,4M.
- 6.Cuál es el volumen de solución, cuya normalidad se indica que puede ser preparada a partir de:
 - a. 202 g de nitrato de potasio para una solución 1N.
 - b. 180 g de hidróxido de calcio para una solución 0,05 N.
 - c. 490 g de ácido fosfórico para una solución 0,2N.
7. La densidad de una solución de ácido sulfúrico al 32% es de 1,24 g/ml. Calcule el volumen necesario de esta solución para prepara 2 L de solución 0,5 N.
8. Se disuelven 100 g de cloruro ferroso hasta tener un litro de solución.
 - a. Cuántos milimoles y cuantos miliequivalentes de soluto contienen 0,5 ml de esta solución
 - b. Se diluye 0,5 ml., de la solución hasta obtener un volumen de 10 ml, ¿Cuál es la molaridad de la nueva solución?
9. Señale cual de las disoluciones siguientes es la más concentrada.
 - a. 5×10^{-4} moles de sacarosa, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ y 5×10^{-2} moles de agua.
 - b. Una disolución 0,22 M de sacarosa.
 - c. Un gramo de sacarosa por 1000 g, de agua.
10. Si se tienen 10 ml., de una solución al 1:5 preparar una solución 1:20 a partir de la primera.
11. Transforme 10 ml., de una solución 1:7 de NaCl en una solución 1:22.
12. A partir de una solución concentrada de NaCl al 1:20 preparar 2 ml., de solución al 1:400.

13. Preparar 50 ml., de alcohol etílico al 70% a partir de alcohol etílico al 95%.
14. Hasta qué volumen se deben diluir 25 ml, de HCl 0,08N para obtener una solución final de HCl 0,05N?

2. **PROBLEMAS DE PREPARACION DE BUFFERES O AMORTIGUADORES.**

1. Si en una solución la concentración de iones OH^- es de 1,0 M ¿Cuál será su pH, su pOH?.
2. Determine el pH de las siguientes soluciones:
 Hidróxido de sodio 0,001M
 Acido clorhídrico $1 \times 10^{-5}\text{M}$
 Acido sulfúrico 0,1M
 Acido acético 0.01M ($K_{\text{eq}} = 1,78 \times 10^{-5}$)
3. ¿Cuál es el pH de un jugo gástrico si una alícuota de 5 ml necesita 0,5 ml de NaOH 0,1N para su neutralización?
4. Prepare 1 litro de una solución de acético/acetato 0,2M de pH 4,0 a partir de una solución de acetato de sodio 0,5M y una solución de ácido acético 1,0M.
5. Describa la preparación de 1 litro de solución tampón 0,1M con un pH de 6,7 a partir de:
 - a. Fosfato monosódico y fosfato disódico sólidos:
 - b. Acido fosfórico 1,0M e hidróxido de sodio 1,0M.
 (pKa del ácido fosfórico 2,12 ; 7,21 y 12,32).
 El PM del fosfato monosódico es 121, y el del disódico, 143.
6. Se desea preparar 100 ml de una solución tampón de Tris (trihidroximetilaminometano) de pH 7.9. Calcúle el volumen de HCl 0,1M que hay que añadir a 50 ml de Tris 0,1M (pKa = 8,1).
7. A una disolución de 1 litro de 1,0M de glicocola, que se halla al pH de su punto isoeléctrico, se le añaden 0,3 mol de HCl. ¿Cuál será el pH de la disolución resultante? ¿Cuál sería su pH si en su lugar se añadiesen 0,3 mol de NaOH?.
8. ¿Cuántos gramos de NaOH deberán añadirse a 500 ml de disolución 0,01M de lisina totalmente cargada con protones para obtener un tampón de pH 10,8?
 pKa (2,18; 8,95; 10,53).
9. Una solución tampón contiene ácido acético 0,1M y acetato sódico 0,1M. Calcúle el pH después de la adición de 3 ml de HCl 0,025M a 10 ml de solución.
10. La cromatografía de intercambio iónico es una técnica basada en la diferente retención de las moléculas a separar por una resina que presenta grupos cargados. Se dispone de una resina cambiadora de cationes y se desea saber si el aminoácido alanina será retenido:
 - a) cuando se encuentra disuelto en una solución tampón de pH 2,4 .

b) cuando se encuentra disuelto en un tampón de pH 7,7.

11. ¿Cuál es la relación: $\text{HPO}_4^{-2} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$ de una célula si su pH es de 6,9?

3. PROBLEMAS AMINOACIDOS

1. Calcúlese la carga neta a pH = 5,0 de la Alanina cuyos pKa con 2,34 y 9,69.
2. Determine el punto isoeléctrico de los siguientes aminoácidos cuyos pK vienen expresados entre paréntesis:
Gly (2,35; 9,78), Asp (2,09; 3,87; 9,82), Lis (2,28; 8,95; 10,53) e His (1,77; 6,10; 9,18).
3. a. Una mezcla de los siguientes aminoácidos, cuyos pKa se indican entre paréntesis, se somete a electroforesis en papel a pH = 3,9: Ala (2,34 y 9,69), Ser (2,2 ; 9,2), Fe (1,8; 9,1), Leu (2,4; 9,6), Arg (2,2; 9,0; 12,5), Asp (2,1; 3,9; 9,8) e His (1,77; 6,10; 9,18). ¿Cuál irá hacia el ánodo (+)? ¿Cuál irá hacia el cátodo (-)?

b. A menudo los aminoácidos con cargas idénticas se separan ligeramente durante la electroforesis en papel; por ejemplo, la Gly se separa de la Leu. ¿Puede sugerir una explicación para esto?

c. Suponga que se tiene una mezcla de Ala, Val (2,3; 9,6), Glu (2,2; 4,3; 9,7), Lis y Try (2,2; 9,1) a pH = 6,0. Dibuje el patrón que podría ser obtenido por tinción de los aminoácidos con Ninhidrina después de la electroforesis en papel. Indique el ánodo, el cátodo, el origen y cualquier aminoácido no separado (la Ninhidrina hace visible los aminoácidos por reacción con los grupos α -amino libres formando manchas amarillas).
4. Un analizador de aminoácidos es un instrumento que separa automáticamente los aminoácidos por cromatografía de intercambio catiónico y determina sus relaciones molares. La resina de intercambio catiónico contiene poliestireno con grupos sulfónicos unidos covalentemente a los anillos bencénicos. Para separar los aminoácidos actúan dos clases de efectos principales: las interacciones electrostáticas con los grupos sulfónicos cargados negativamente y las interacciones hidrofóbicas con los anillos bencénicos no polares.
 - a. Argumente el orden de elución para los siguientes conjuntos de aminoácidos.
 - (1) Asp
 - (2) Ser, Try
 - (3) Gly, Ala
 - (4) Val, Met, Leu y Ile
 - (5) Tyr, Phe
 - (6) Lys, His
 - (7) Arg.
 - b. Argumente el orden de elución para los aminoácidos de los conjuntos 3 y 5. Explique por qué el Asp eluye antes que el Glu.

5. Algunas veces los aminoácidos son utilizados como amortiguadores. Un amortiguador es una solución que resiste cambios de pH cuando se le agrega ácido o base. El intervalo de pH sobre el cual es efectivo un amortiguador se denomina intervalo amortiguador, generalmente definido como $pK_a + 1$ a $pK_a - 1$.
- Indique el intervalo amortiguador (o intervalos) de Gly, His, Asp y Lys.
 - Escoja un aminoácido que amortigüe a $pH = 4$, $pH = 6$, $pH = 9$ y $pH = 12$.
 - ¿Esperaría que una proteína que contiene 100 aminoácidos pudiera ser tan buen amortiguador como sus aminoácidos constituyentes libres a concentraciones molares equivalentes?
6. El grupo ϵ -amino de la Lys tiene un pK_a de 10,5.
- ¿Qué fracción de estos grupos estará protonada en una solución diluida de Lys a $pH = 9,57$?
 - ¿A $pH = 11,0$?
 - Explique por qué el pK_a del grupo ϵ -amino es mayor que el de un grupo α -amino.
7. El grupo γ -carboxilo del Glu tiene un pK_a de 4,3.
- ¿Qué fracción de estos grupos podría estar no protonada en una solución diluida de Glu a $pH = 5,07$?
 - ¿A $pH = 3,87$?
 - Explique por qué este pK_a es mayor que el pK_a del grupo α -carboxilo.
- 8.
- Suponga que tiene una solución que contiene 0,1 mol de Ala ajustada con ácido clorhídrico $pH = 0,5$. Comience a adicionar NaOH 1,0 M. Dibuje la curva de titulación resultante, indicando todos los puntos de inflexión. Muestre sus cálculos para algunos puntos de la curva.
 - Dibuje una curva de titulación similar para una solución que contiene 0,1 mol de His a $pH 0,5$ estableciendo las mismas suposiciones que en (a).
9. Calcúlese a $pH 4,8$ la carga neta del péptido Asp-Gly, cuyos pH son 2,1 ; 4,5 y 9,0.
10. Considere el pI del tripéptido Lys-Lys-Lys ¿Cuál debería ser su valor respecto a los valores de pK_a individuales (menor, igual o mayor) ? explique.
11. Determínese el punto isoeléctrico de las siguientes proteínas, a partir de los datos obtenidos en electroforesis en acetato de celulosa a 500 voltios, durante 8 horas. Los distintos pH se obtuvieron con tampón Tris-Acetato 0,01 M.

pH:	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Movilidad cm					
Lizosima	-5,1	-4,3	-3,8	-3,5	-3,0
Albúmina	1,9	2,2	2,7	3,0	3,3
RNasa	-1,2	-0,3	0,1	1,0	1,7

4. PROBLEMAS DE LA ESTRUCTURA DE PROTEINAS

1. Diga si la hidrólisis del enlace peptídico es un proceso exergónico o endergónico. Discuta ese hecho en base a:
 - Estabilidad del enlace peptídico.
 - La biosíntesis del enlace.

2. Se tiene el siguiente péptido:
 NH_3^+ - Ala-Lys-Lys-ASp-Gly-Asn-Val-Glu-Arg-Glu-COO⁻
¿Diga cuáles péptidos produciría la acción de la quimotripsina.
¿Cuál sería la carga de esos péptidos a pH 1.5 a pH 7.0?

3. Se tiene el siguiente péptido:
 NH_3^+ -Ile-Als-His-Thr-Tyr-Gly-Pro-Phe-Glu-Ala-Ala-Val-Cys-Lys-Trp-Glu-Glu-Glu-Pro-Asp-Gly-Val-Glu-Cys-Ala-Phe-His-Arg-COO⁻.
 - a. ¿ En qué parte de la secuencia posee estructura en α -hélice?
 - b. ¿ Cuáles son los puntos de cambio de conformación? ¿por qué?
 - c. ¿ A qué nivel puede tener otros enlaces covalentes?
 - d. ¿ Cuáles péptidos produciría la acción de la quimotripsina?
 - e. ¿ Cuál es la carga neta de esos péptidos a pH 1,5 y a pH 6,5?
 - f. ¿ Cuál es el punto isoeléctrico del último péptido?
 - g. ¿ Qué pasaría si antes de la hidrólisis por quimotripsina se trata al péptido inicial con ácido per fórmico? ¿Cambiarían las cargas netas de los péptidos a pH 1,5 y 6,5?.

4. Se tiene el péptido siguiente:
 NH_3^+ -Ile-Lys-Ala-Pro-Thr-Tyr-Asp-Arg-Phe-Glu-Cys-Glu-Asp-Lys-Pro-Cys-Val-Gly-Asp-Ser-Glu-Lys-Ala-Leu-COO⁻.
 - a. ¿ Cuáles son las propiedades básicas del enlace peptídico? (Hacer esquema). En base a esas propiedades diga si ese péptido puede existir totalmente en forma de α -hélice.
 - b. ¿ Diga si en ese péptido el enlace peptídico es el único tipo de enlace covalente posible.
 - c. Sabiendo que los pKa de los grupos R de los aminoácidos Asp, Glu, Lys y Arg son respectivamente 2,1, 2,5, 10,5 y 12,5 y los pK de las funciones α son 2,0 y 9,0. Diga cuál es la carga neta de ese péptido a pH 7.0. ¿En qué zona de pH ese péptido tendrá algún poder tampón?.
 - d. Se trata ese péptido con tripsina (una enzima peptidasa que corta los enlaces peptídicos a nivel de la extremidades carboxílicas de los residuos básicos). Escriba la reacción de hidrólisis. En base a lo que se sabe de la biosíntesis de ese enlace, piensa Ud., que la hidrólisis es un proceso exergónico o endergónico? Dé argumentos.
 - e. Escriba los péptidos obtenidos con su carga a pH 1,0; 7,0 y 13,0. Diseñe un método para separarlos. ¿Cuál es el punto isoeléctrico del péptido 47?

5. Después de una hidrólisis completa de un péptido se obtiene:

Gly + 2Cys + Glu + Ile + Thr + Phe + Val.

La reducción del péptido sin hidrolizar por Mercaptoetanol, seguido de un tratamiento de alquilación de los residuos de cisteína con iodoacetato, se obtienen dos pequeños péptidos A y B. Sugiera la estructura del péptido original a partir de los siguientes datos:

Péptido A:

- Contiene: Gly + Cys + Glu + Arg + Ile.
- Al ser tratado con carboxipeptidasa A se libera Ile.
- El tratamiento con fenilisotiocianato (PITC, reactivo de Edman), libera un derivado fenil tiohidantoina de la glicina (PTH-glicina).
- Cuando se trata con tripsina se obtienen dos péptidos: Uno contiene Glu e Ile y el otro contiene Cys, Arg y Gly.

Péptido B:

- Contiene Thr + Val + Cys y Phe.
- Al tratarlo con carboxipeptidasa A se libera Val.
- Cuando se trata con quimotripsina se libera Val y un tripéptido que contiene Cys, Thr y Phe.
- La degradación con el reactivo de Edman produce un derivado PTH-treonina.

5. PROBLEMAS SOBRE DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS

1. Se ha determinado la movilidad relativa en electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 por 100 en presencia de SDS de varias proteínas de peso molecular conocido, obteniéndose los valores:

PROTEINA	PESO MOLECULAR	MOVILIDAD
Albúmina de suero	68.000	0,18
Catalasa	60.000	0,22
Glutámico deshidrogenasa	53.000	0,29
Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa	36.000	0,40
Tripsina	23.300	0,60
Mioglobina	17.200	0,74

Calcúle el peso molecular de las sub unidades de la enzima láctico deshidrogenasa de un insecto si su movilidad electroforética en las mismas condiciones es de 0,455.

2. La electroforesis de una enzima a la que previamente se ha tratado con SDS y β -mercaptoetanol, en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, da dos bandas con una movilidad relativa de 0,51 y 0,56. El peso molecular de la enzima nativa obtenido mediante Sephadex G-200 y ultracentrifugación, es de 120.000. Indíquese la estructura cuaternaria de la enzima y calcúle el peso molecular de las sub unidades.

Las movilidades relativas de diversas proteínas patrón en las mismas condiciones son:

Proteína	Peso molecular	Movilidad
Mioglobina	17.800	0,75
Tripsina	23.600	0,60
G3PDH	36.000	0,40
Albúmina	43.500	0,16

3. La determinación del peso molecular de la β -cetoadípico-enol-lactona hidrolasa de *Actinobacter calcoaceticus* se llevó a cabo por una cromatografía de penetrabilidad.

Los valores de K_{av} para una serie de proteínas patrón son:

Proteína	Peso molecular	K_{av}
Piruvato quinasa	237.000	0,156
Alcohol deshidrogenasa	160.000	0,260
Albúmina de suero	67.000	0,440
Ovoalbúmina	42.000	0,550
Lisozima	14.000	0,790
Citocromo c	12.000	0,840

Dermínese el peso molecular de la hidrolasa si su K_{av} es de 0,67.

4. En un fraccionamiento subcelular se han valorado las enzimas succínico oxidasa, láctico deshidrogenasa y glucosa-6-fosfatasa en el homogeneizado total, y en cada fracción los resultados se indican en la tabla:

Fracción	Proteína (mg.ml ⁻¹)	Succínico oxidasa (unidad.ml ⁻¹)	Láctico deshidrogenasa (unidad.ml ⁻¹)	Glucosa-6- fosfatasa (unidad.ml ⁻¹)
H	31,00	3,20	4,00	6,00
F1	10,00	2,70	0,10	0,50
F2	6,00	0,01	3,50	0,01
F3	7,25	0,10	0,20	4,00
F4	7,20	0,30	0,01	1,00

Calcúle la actividad específica (unidades mg⁻¹ de proteína) de las enzimas en cada fracción, así como el porcentaje de proteína y enzima recuperada, e identifique cada una de las fracciones subcelulares.

5. Se va a estudiar la AH₂-deshidrogenasa.

- a. La caracterización de esa enzima comprende la determinación de su peso molecular por la técnica de filtración en columna de gel Sephadex. Se utilizan 4 marcadores de P.M. Los resultados experimentales son los siguientes:

Volumen muerto de la columna

	A	B	C	D	Dehidrogenasa
PM	40.000	65.000	143.000	200.000	----
Volumen de elución (ml)	136	121	23	21,5	98

- Cuál es el valor del PM. que se puede calcular por ese método?
 - Bajo cuál condición ese valor se puede considerar exacto?
 - Dé un valor aproximado del número de residuos de aminoácidos que contiene esa proteína.
- b. Su composición exacta en aminoácidos no ha sido determinada pero se sabe que contiene para cada 100 residuos: 15 Glx, 12 Asx, Lys, 6 Arg y 5 His. La "x" en Glx y Asx quiere decir que no se sabe si esos residuos están en forma de ácido glutámico (o aspártico) o de glutamina (o asparagina).
 Si todos los Glx y Asx están en forma de ácido da un valor aproximado del pI de esa proteína. Explica por qué.
 En un experimento posterior se determina el pI real de esa proteína. Explica por qué.
 En un experimento posterior se determina el pI real de esa proteína. Es igual a 8.1. ¿Qué se puede deducir?.
 Diseña un método de purificación de esa proteína en base a la utilización de una resina intercambiadora de iones.
 En qué zona de pH esa proteína tendrá algún poder tampón?
- c. Se pudo comprobar que un solo mensajero (m-ARN) es necesario para la síntesis de esa enzima. Se purificó ese m-ARN. Su peso molecular es de 270.000 daltons.
 - Sabiendo que un nucléotido tiene un peso molecular promedio de 300, deduzca el PM. del polipéptido sintetizado a partir de ese m-ARN.
 - Compare ese resultado con la parte "a" de esa pregunta. ¿Qué se puede deducir sobre la estructura cuaternaria de esa deshidrogenasa? ¿Cómo se podría averiguar experimentalmente esa deducción?.
- d. Siendo esa enzima una deshidrogenasa + considere Ud., como probable que contenga una coenzima? ¿Por qué?. En caso de contestar "Sí" a esa pregunta, ¿diga cuál coenzima trataría de buscar y cómo? debe ser entregado al finalizar la práctica y sin anexar hojas.