

IRINA CÂRLESCU

BIOCHIMIE

Lucrări practice

TESTAREA CALITATIVĂ A HIDROXIACIZILOR

Scopul lucrării

Utilizarea testelor calitative pentru investigarea proprietăților chimice ale hidroxiacizilor.

Generalități

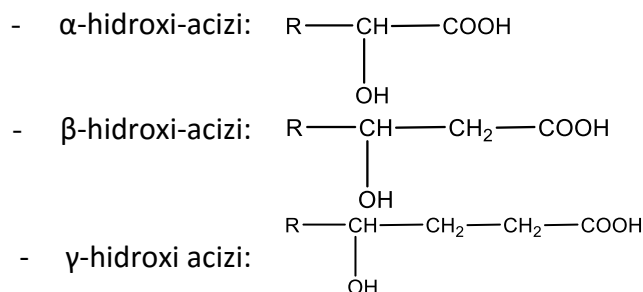
Testele calitative mai sunt denumite și teste de identificare deoarece pun în evidență prezența anumitor caracteristici structurale ale unei moleculei. De exemplu, anumite teste indică prezența unei anumite grupări funcționale, precum carboxilică sau alcoolică. Alte teste indică prezența unei grupări funcționale care suferă o reacție de oxidare. O caracteristică comună a acestor teste calitative este faptul că rezultatele sunt vizibile imediat. De exemplu, schimbarea culorii, formarea unui precipitat, degajarea unui gaz sau formarea unui strat de separare.

În vederea realizării acestor teste trebuie respectate două reguli de bază. În primul rând, acestea trebuie realizate respectând exact indicațiile. Dacă metoda presupune adăugarea de 3 picături, nu adăugați 4 sau 5. În al doilea rând, realizați testele în triplicat. Aceasta înseamnă realizarea testului pe un compus cunoscut, care se știe că va da un test pozitiv, apoi realizarea testului pe un compus cunoscut care se știe că va da test negativ și, final, testarea pe un compus necunoscut. Compararea vizuală a rezultatelor testării unui compus necunoscut cu un test pozitiv și negativ confirmă faptul că reactivii sunt buni și că testul este realizat corespunzător.

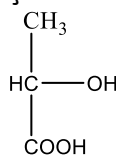
Totuși, rezultatele testelor calitative nu prezintă întotdeauna aceeași acuratețe. Un compus poate da un test pozitiv fals, chiar dacă nu corespunde rezultatului scontat. De exemplu, anumiți fenoli dau test pozitiv pentru aldehide. De asemenea, un compus poate da un rezultat negativ chiar dacă este de așteptat să dea unul pozitiv. De exemplu, aldehidele mai puțin reactive sau foarte insolubile, nu dau test pozitiv pentru aldehide. Combinațiile conținând în molecula lor grupări hidroxil și grupări carboxil se împart în două clase:

- acizi-alcooli, care conțin grupele $-OH$ legate de o catenă alifatică sau de catena laterală a unui compus aromatic și
- acizi fenoli, cu grupele $-OH$ legate direct de nucleul aromatic.

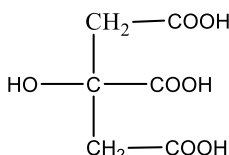
Din punct de vedere al proprietăților este important să se țină seama de poziția grupei hidroxil față de grupa carboxil: astfel, vom distinge:



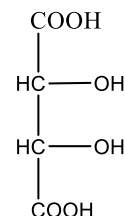
În acest experiment veți testa următorii α -hidroxi-acizi:



acid lactic



acid citric



acid tartric

Acidul lactic se găsește în zeama de carne. El apare în mușchi ca produs al degradărilor biochimice ale hidraților de carbon. Se obține prin fermentarea zaharurilor în prezență de bacterii de acid lactic. Este utilizat în industria alimentară, textilă, tăbăcărie, ca înlocuitor al acidului tartric.

Acidul citric se găsește în natură în proporție mare în zeama de lămâie, portocală, zmeură etc. liber sau ca sare acidă de potasiu.

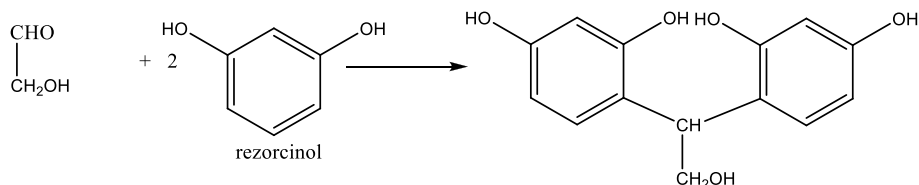
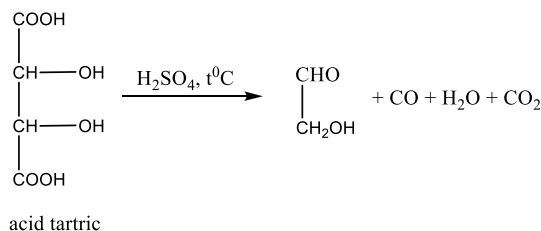
Acidul tartric a fost izolat în anul 1769 de către Secheele ca sare acidă de potasiu (tartru) din drojdia care se depune din vinul nou, după încetarea fermentației. Acidul tartric se găsește în cantități mici, în vin.

Reacții de recunoaștere

Hidroxi-acizii dau reacții specifice grupei carboxil și, după protejarea grupei carboxil, se pot pune în evidență grupele hidroxil.

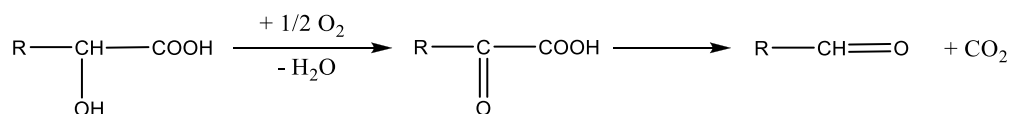
Reacția cu acidul sulfuric concentrat și rezorcină

α -Hidroxi-acizii elimină acid formic, când sunt încălziți cu acid sulfuric diluat, și trec în aldehida sau cetona conținând un atom de carbon mai puțin în moleculă. Când se folosește acid sulfuric concentrat se elimină, în locul acidului formic, produsul său de deshidratare, oxidul de carbon. Aldehida formată se pune în evidență prin tratare cu rezorcină când se obține o colorație roșie. În cazul acidului tartric, pe lângă acidul formic, se mai elimină o moleculă de bioxid de carbon și se formează aldehida glicolică.



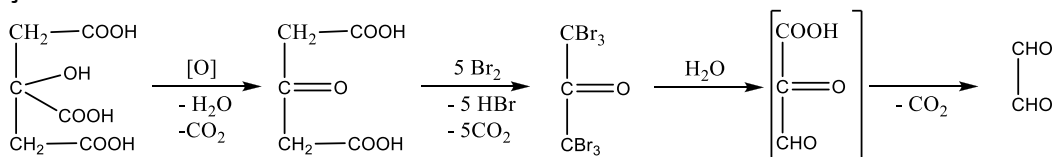
Reacția cu permanganat de potasiu

Prin încălzire cu agenți oxidanți slabi (MnO_2 , PbO_2 , H_2O_2), majoritatea α -hidroxiacizilor se transformă în aldehide sau cetone, care se identifică prin reacțiile specifice grupării carbonil.



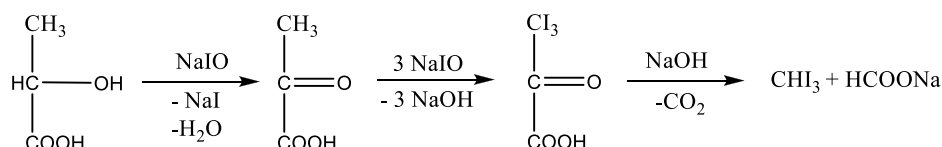
Reacția cu apa de brom

În prezența apei de brom, acidul citric se oxidează, formându-se acidul aceton-dicarboxilic, care în prezența apei de brom formează pentabromacetona, aceasta prin hidroliză și decarboxilare trecând în glioxal. Formarea glioxalului se pune în evidență prin reacția de culoare cu fenolii.



Reacția iodoformului

Datorită faptului că acidul lactic conține o grupare de alcool secundar, vecină cu o grupare metil, poate trece prin oxidare în grupare cetonică. Metil cetona rezultată poate fi oxidată cu exces de iod în soluție bazică, dând un solid galben intens. Reacția este cunoscută sub denumirea de reacția iodoformului.



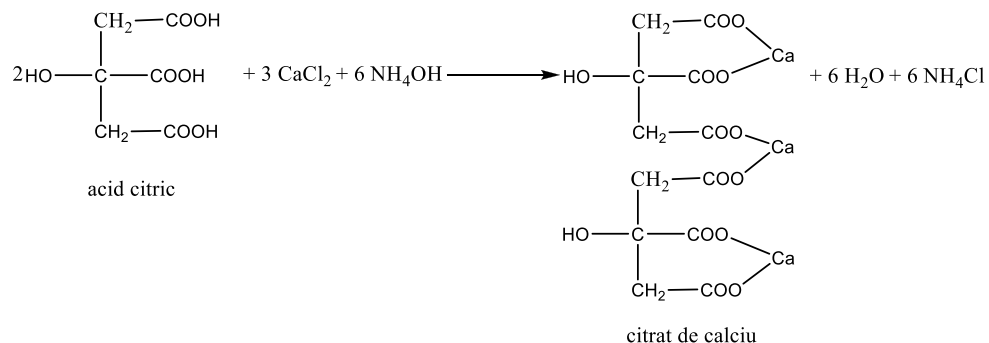
Reacția cu anhidrida acetică și piridină

Prin tratarea α -hidroxiacizilor cu anhidridă acetică și piridină apar următoarele colorații:

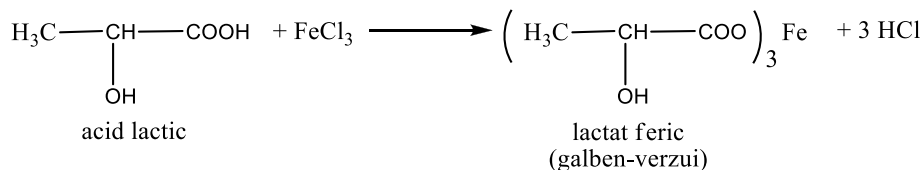
acid tartric	verde-smarald
acid citric	roșu

Formarea sărurilor

Hidroxi-acizii pot forma săruri cu metalele, de exemplu: tartratul acid de potasiu (insolubil în apă), respectiv citratul de calciu (mai solubil la rece și mai puțin solubil la cald).

**Reacția cu clorura ferică**

α -Hidroxiacizii înlocuiesc fenolul din complexul cu clorura ferică. Reacția prezintă importanță în practica clinică pentru identificarea acidului lactic (ca produs patologic) în suc gastric.

**MOD DE LUCRU****I. Reacția cu acidul sulfuric concentrat și rezorcină**

Precauții: Acidul sulfuric concentrat este toxic și coroziv. Evitați inhalarea sau contactul cu pielea a soluției de rezorcină.

- Într-o eprubetă curată introduceți aprox. 0,05 g acid tartric peste care adăugați 5 picături de acid sulfuric concentrat și câteva cristale de rezorcină.
- Încălziți eprubeta pe o baie de apă. Notați observațiile în fișa de lucru.

II. Reacția cu permanganatul de potasiu

Precauții: Soluția de permanganatul de potasiu este toxică. Acidul lactic irită pielea și ochii. Evitați inhalarea substanței.

- Într-o eprubetă curată introduceți 0,5 ml acid lactic peste care adăugați 2 ml de acid sulfuric diluat și 1 ml de permanganat de potasiu 5%.
- Încălziți eprubeta pe o baie de apă. Notați observațiile în fișa de lucru.

III. Reacția cu apa de brom

Precauții: Soluția de brom 5% este foarte toxică, iritantă și oxidantă. Evitați contactul cu pielea. Nu inhalați vaporii degajați. Lucrați la nișă. Dacă soluția de brom vine în contact cu pielea spălați imediat suprafața respectivă cu soluție saturată de bisulfid de sodiu. Evitați contactul acidului citric cu ochii.

5. Într-o eprubetă curată introduceți 4 picături dintr-o soluție de acid citric 5% peste care adăugați o picătură de apă de brom, 3 picături de acid sulfuric 10% și o picătură de soluție de permanganat de potasiu 5%.
6. Încălziți ușor eprubeta pe o baie de apă până la decolorare, apoi adăugați 2 ml acid sulfuric, două picături soluție de β -naftol și încălziți pe baie de apă timp de 10 minute. Notați observațiile în fișa de lucru.

IV. Reacția iodoformului

Precauții: Soluția de I_2/KI este toxică, corozivă și iritantă. Soluția de hidroxid de sodiu 3M este toxică, corozivă și poate cauza arsuri. Evitați contactul cu ochii, pielea sau hainele.

7. Într-o eprubetă curată introduceți 0,5 ml acid lactic și diluați-l cu 5 ml de apă.
8. Adăugați apoi 1 ml de iod în iodură de potasiu și 2,5 ml soluție NaOH 10%.
9. Încălziți eprubeta pe o baie de apă. Notați observațiile în fișa de lucru.

V. Reacția cu anhidrida acetică și piridină

Precauții: Anhidrida acetică este corozivă și lacrimogenă. Piridina este inflamabilă. Evitați inhalarea și contactul cu ochii sau pielea.

10. În două eprubete curate introduceți câteva cristale de acid tartric și respectiv acid citric.
11. Adăugați apoi 1 ml anhidridă acetică și 1 ml piridină.
12. Încălziți eprubeta pe o baie de apă. Notați observațiile în fișa de lucru.

VI. Formarea sărurilor

Precauții: Soluția de hidroxid de amoniu este toxică și corozivă. Poate cauza arsuri. Evitați inhalarea substanței.

13. Într-o eprubetă curată introduceți două picături soluție de acid citric și 2-3 picături soluție de hidroxid de amoniu până la pH 7.
14. Adăugați apoi două picături soluție $CaCl_2$.
15. Încălziți eprubeta pe o baie de apă la fierbere. Lasați-o apoi să se răcească la temperatura camerei. Notați observațiile în fișa de lucru.

VII. Reacția cu clorura ferică

Precauții: Soluția de clorura ferică este toxică și corozivă. Fenolul este foarte toxic. Evitați inhalarea sau contactul cu pielea sau cu ochii.

16. În două eprubete curate se introduce câte o picătură soluție de clorură ferică și apoi se adaugă două picături soluție apoasă de fenol. Soluțiile se colorează în violet.
17. În una din eprubete se adaugă două picături de acid lactic iar în cealaltă câteva picături de acid acetic.
18. Notați observațiile în fișa de lucru.

FIȘĂ DE LUCRU

I. Reacția cu acid sulfuric și rezorcină

hidroxi-acid	observații
acid tartric	

acid tartric

II. Reacția cu permanganat de potasiu

hidroxi-acid	observații
acid lactic	

acid lactic

III. Reacția cu apa de brom

hidroxi-acid	observații
acid citric	

acid citric

IV. Reacția iodoformului

hidroxi-acid	observații
acid lactic	

acid lactic

V. Reacția cu anhidrida acetică și piridina

hidroxi-acid

observații

acid tartric

acid citric

VI. Formarea sărurilor

hidroxi-acid

observații

acid citric

VII. Reacția cu clorura ferică

hidroxi-acid

observații

acid lactic

ÎNTREBĂRI

1. Cum reacționează acidul citric și acidul tartric în prezență de acid sulfuric?
2. Reprezentați acizii citric, lactic și tartric, în proiecție Fischer. Câți atomi de carbon asimetrici prezintă?
3. Acizii mandelic și malic au următoarele structuri:



Propuneți câte o metodă de identificare pentru fiecare hidroxi-acid, pe baza testelor efectuate.

TESTAREA CALITATIVĂ A CARBOHIDRAȚILOR

Scopul lucrării Utilizarea testelor calitative pentru clasificarea soluțiilor de carbohidrați.

Generalități Carbohidrații constituie sursa cea mai importantă de energie. Sunt larg răspândiți în țesuturile plantelor și chiar în anumite țesuturi animale, precum ficat sau mușchi. Carbohidrații solubili în apă au gust dulce și prin urmare se mai numesc și zaharuri. Alt termen pentru carbohidrați este acela de hidrați de carbon. Carbohidrații sunt de fapt polihidroxialdehide sau polihidroxiketone, având în general formula $(\text{CH}_2\text{O})_n$, unde $n \geq 3$.

În funcție de numărul de molecule prezente, carbohidrații se împart în 3 clase generale. Moleculele individuale de carbohidrați sunt clasificate drept monozaharide. Mai departe acestea se clasifică în funcție de numărul de atomi de carboni (cu 5 carboni, pentoze; cu 6 carboni, hexoze, s.a.m.d.). În tabelul 1 este redată clasificarea unor carbohidrați uzuali.

Carbohidrații conținând câteva unități de monozaharide în structură sunt clasificate drept oligozaharide. Acestea se împart în continuare în dizaharide (două unități de monozaharide), trizaharide (trei unități de monozaharide) s.a.m.d.

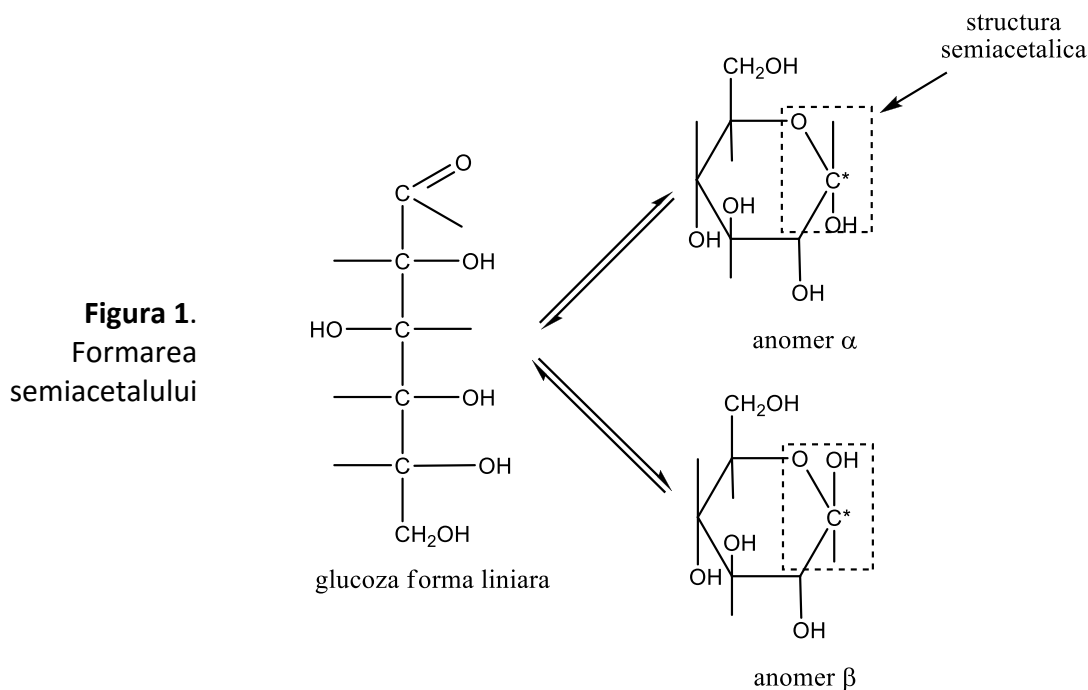
Carbohidrații conținând un număr foarte mare de unități de monozaharide sunt clasificate drept polizaharide. Cele mai importante sunt amidonul, celuloza și glicogenul. Toate trei sunt alcătuite din sute de mii de unități de glucoză conectate în diferite moduri. O caracteristică comună a oligo- și polizaharidelor este faptul că pot hidroliza la unitățile de monozaharide prin încălzire în soluție ușor acidă.

Toate monozaharidele conțin două tipuri de grupări funcționale reactive: o grupare carbonil și mai multe grupări hidroxil. Reacția intramoleculară dintre gruparea carbonil și una dintre grupările hidroxil conduce la un **semiacetal** (figura 1). Deoarece ambele grupări se găsesc pe aceeași moleculă, în urma reacției rezultă o structură ciclică. Atomul de carbon din gruparea carbonilică care participă la formarea semiacetalului se numește **carbon anomer** (redat în figura 1 sub forma C*).

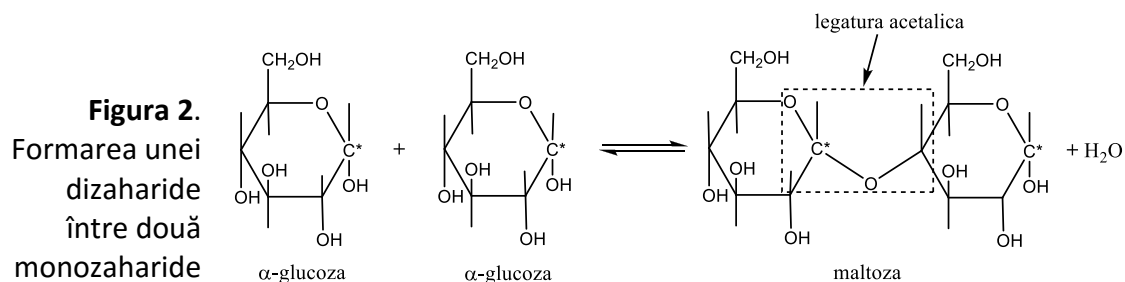
Formarea semiacetalului conduce la două conformații posibile la carbonul anomic, denumite anomer- α și anomer- β (figura 1). Cele două molecule conținând aceste configurații sunt denumite **anomeri**.

Tabelul 1. Clasificarea unor carbohidrați uzuali

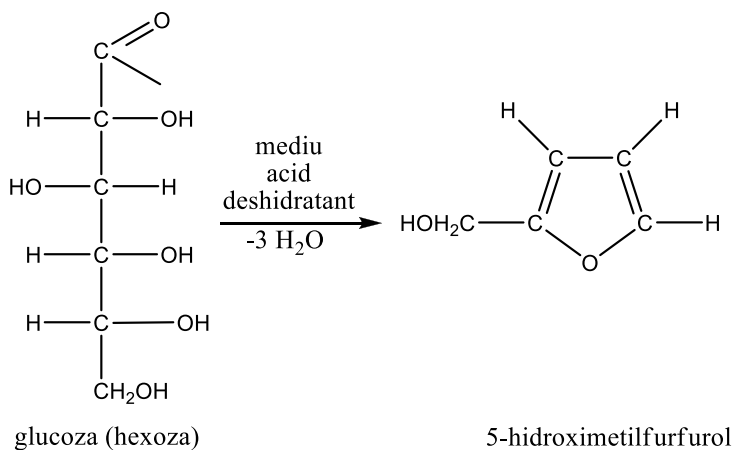
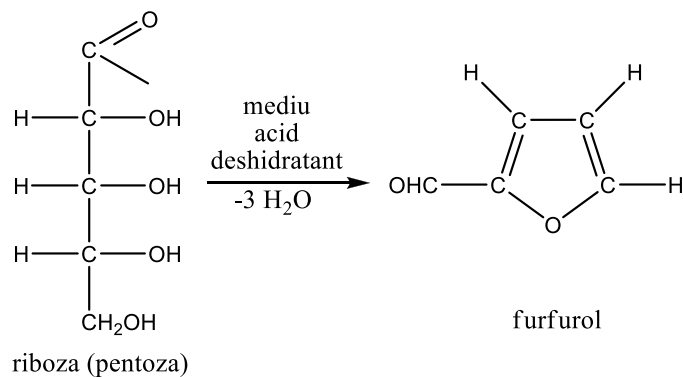
clasa / denumirea monozaharide	sursa	componenta monozaharidică
glucoza	sânge	
fructoza	fructe	
riboza	RNA	
dizaharide		
sucroza	trestie de zahăr	glucoza și fructoza
maltoza	sirop de porumb	glucoza și glucoza
lactoza	lapte	glucoza și galactoza
Polizaharide		
amidon	celule vegetale	multe unități de glucoză
celuloză	pereții celulelor vegetale	multe unități de glucoză
glicogen	celule animale	multe unități de glucoză



Monozaharidele pot da reacții intermoleculare, formând legături acetalice. Semiacetalul unei molecule de monozaharidă reacționează cu gruparea hidroxilică a unei alte monozaharide, formând o legătură acetalică. În acest fel, monozaharidele se leagă între ele pentru a forma dizaharide și polizaharide. În figura 2 este redată reacția dintre două monozaharide cu formarea unei legături acetalice.



Reactivii de identificare a carbohidraților se divid în trei clase, în funcție de tipul de reacție. Prima clasă, acizi deshidratanți, determină deshidratarea carbohidraților și formarea furfurolului (de la pentoză) sau 5-hidroximetilfurfurol (de la hexoză):



Prezența furfurolului sau 5-hidroximetilfurfurolului poate fi detectată prin adăugarea unui reactiv din cea de-a doua clasă, denumiți reactivi de condensare. Aceștia sunt compuși fenolici care reacționează cu furfurotul sau 5-hidroximetilfurfurolul dând compuși colorați. Reactivii din această clasă sunt: Bial și Seliwanoff.

Cea de-a treia clasă de reactivi constă în soluții conținând ioni de cupru (II). Acești

reactivi oxidează anumiți carbohidrați. Cei mai uzuali reactivi din această clasă sunt Benedict și Barfoed. Este vorba despre carbohidrații care reduc ionii de cupru (II) la oxizi de cupru (I), denumiți zaharuri reducătoare. Acestea cuprind toate aldozele conținând o grupare aldehydică liberă sau un semiacetal ciclic. Dizaharidele, care nu conțin semiacetal liber, sunt zaharuri nereducătoare.

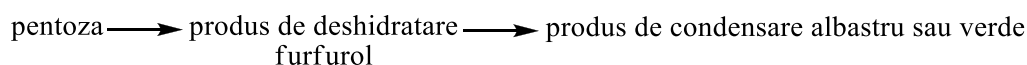
I. Identificarea produșilor de condensare ai carbohidraților

Testul amidonului Iodură de potasiu/Iod (KI/I₂)

Iodul formează un complex cu amidonul, dând o culoare negru-albastră intensă. Polizaharidele cu catenă mai scurtă, dizaharidele și monozaharidele nu formează complecși cu iodul. Prin urmare, testul KI/I₂ poate fi utilizat pentru a distinge amidonurile de carbohidrații simpli.

Testul Bial

Este utilizat pentru a diferenția între pentoze și hexoze. Pentozele supuse testului Bial dau un produs albastru sau verde, în timp ce hexozele dau un produs maron sau gri. Alte soluții de carbohidrați nu reacționează cu acest reactiv. În asemenea cazuri, amestecul de reacție rămâne colorat galben-oranj, care este de fapt culoarea reactivului.

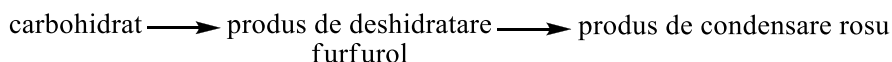


Testul Seliwanoff

Este utilizat pentru a diferenția aldozele de cetoze. În acest test, cetozele reacționează în două minute, formând o soluție roșie. Aldopentozele pot reacționa și ele în două minute, dând o soluție albastră-verde, care se poate schimba într-o soluție de culoarea piersicii. Alte dizaharide pot da și ele după două minute un test pozitiv fals, prin formarea unei soluții de culoarea piersicii. Totuși, numai formarea unei soluții de culoare roșie este considerată test pozitiv.

Testul Molish

Este utilizat pentru a diferenția carbohidrații de ne-carbohidrați. Aceasta are loc prin deshidratarea în prezență de acid sulfuric concentrate. Produșii de deshidratare ei zaharurilor, furfurolul și 5-hidroximetilfurfurolul condensează cu α -naftolul, formând un produs de condensare roșu.

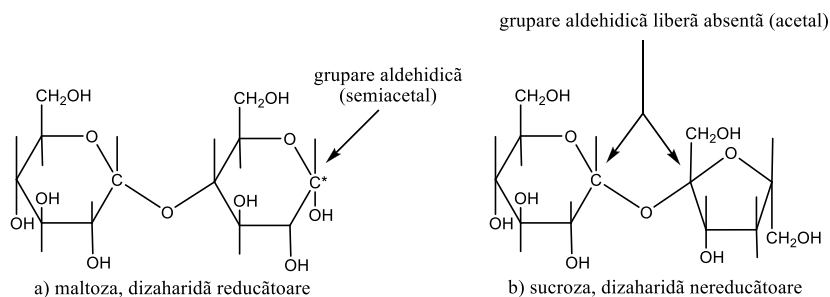


II. Identificarea zaharurilor reducătoare

După cum se observă în figura 1, un semiacetal se formează atunci când o grupare carbonil reacționează cu o grupare carboxil de pe aceeași moleculă de monozaharidă. Un agent de oxidare, precum ionul de cupru (II) poate oxida grupările carbonil. Această reacție reduce ionul de cupru (II) la oxidul de cupru (I), Cu_2O , de culoare roșie. Numai zaharurile conținând un semiacetal au gruparea carbonilică liberă, necesară pentru a reduce ionul de cupru (II). De aceea, aceste zaharuri sunt numite **zaharuri reducătoare**. Zaharuri reducătoare pot fi atât monozaharidele cât și dizaharidele, atâta vreme cât conțin în moleculă un semiacetal sau o grupare carbonilică aldehydică liberă.

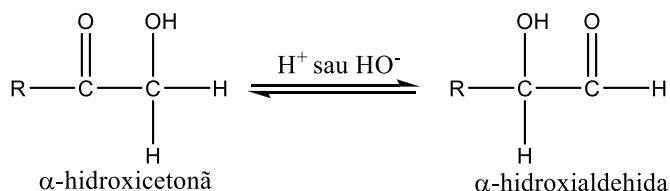
Zaharurile care nu conțin un semiacetal nu reduc ionul de cupru (II). Ele se numesc **zaharuri nereducătoare**. În figura 3 sunt redată două exemple de dizaharide reducătoare și nereducătoare.

Figura 3. Dizaharide
a) reducătoare și
b) nereducătoare



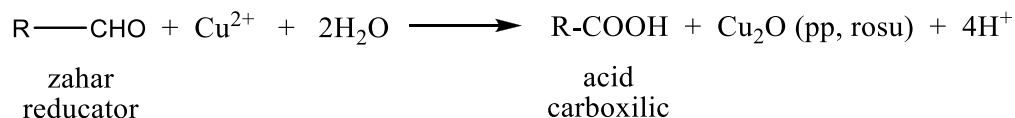
Reactivii Benedict și Barfoed sunt soluții specifice pentru testarea carbohidraților, conținând ioni de cupru (II). Atunci când unul din acești reactivi este adăugat unei soluții de carbohidrat, formarea unui precipitat roșu de Cu_2O indică prezența unui zahar reducător. Amidonurile au o grupare semiacetalică liberă (o grupare reducătoare de zahăr) la capătul unei catene foarte lungi de legături acetalice (grupări nereducătoare). Totuși, reacția amidonului cu reactivii Benedict și Barfoed nu este semnificativă, deoarece proporția de semiacetali este foarte mică, comparativ cu mărimea moleculei. Pe de altă parte, fructoza, o cetoză, nu conține o grupare carbonilică aldehydică, dar dă reacție pozitivă cu ambii reactivi. Aceasta deoarece, în condiții normale, fructoza izomerizează la o aldoză (figura 4). Pentru identificarea fructozei însă este necesară utilizarea reactivului Seliwanoff.

Figura 4. Conversia unei
 α -hidroxicetone la
 α -hidroxialdehidă



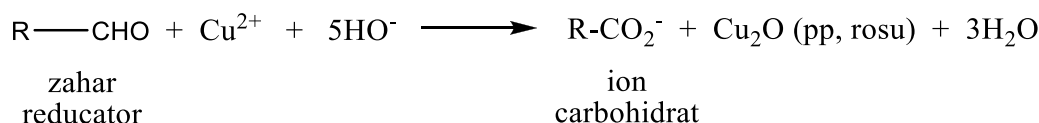
Testul Barfoed

Testul presupune utilizarea unei soluții conținând ioni de cupru (II) în mediu ușor acid, cu monitorizarea atentă a timpului de reacție. Este util pentru diferențierea monozaharidelor de dizaharide. Astfel, monozaharidele determină formarea unui precipitat roșu de Cu_2O în 2-3 minute. Dizaharidele însă determină formarea Cu_2O numai după 10 minute sau chiar mai mult.



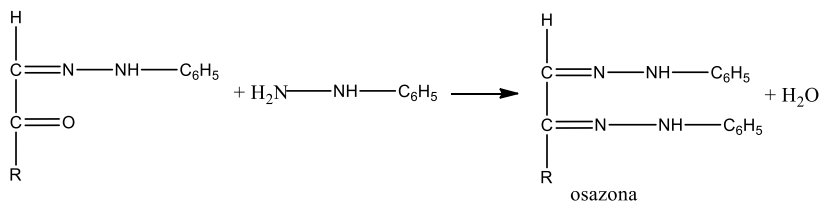
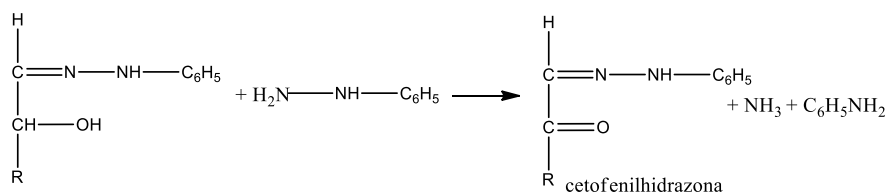
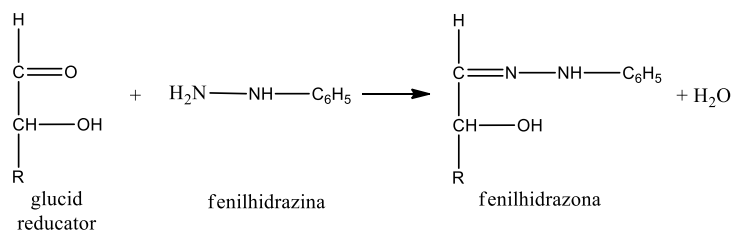
Testul Benedict

Testul presupune utilizarea ionilor de cupru (II) în mediu ușor bazic. Prezența unui zahar reducător va determina reducerea ionilor de cupru (II) la Cu_2O . Testul Benedict nu poate fi utilizat pentru diferențierea monozaharidelor de dizaharidele reducătoare.



Testul cu fenilhidrazina

Este specific glucidelor reducătoare și are ca rezultat formarea osazonelor. Osazonele diferitelor glucide se deosebesc între ele prin structura cristalină, solubilitatea și punctele de topire diferite. Reacțiile dintre un glucid reducător și fenilhidrazina sunt redată în continuare:



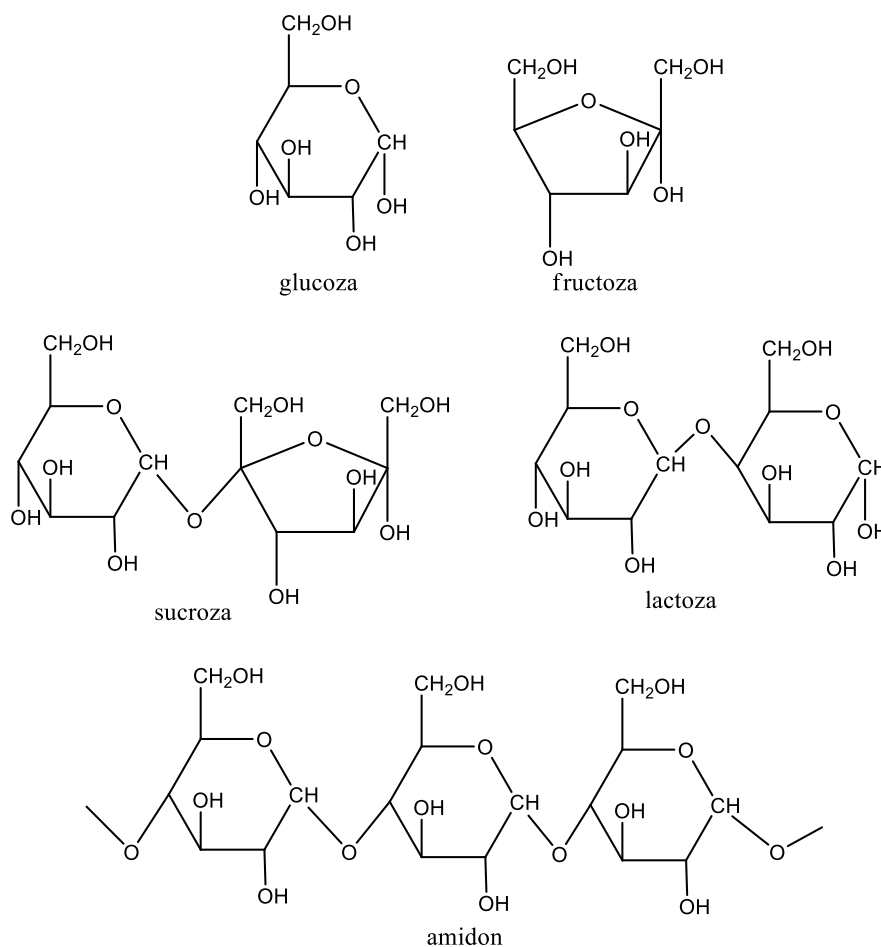


Figura 5. Structurile carbohidraților testați în experiment

În acest experiment veți folosi șase tipuri de teste de clasificare pe cinci soluții de carbohidrați cunoscute. În fiecare caz, veți clasifica carbohidratul prezent ca monozaharidă, dizaharidă, polizaharidă, respectiv reducătoare sau nereducătoare. De asemenea în cazul unei hexoze, veți stabili dacă este aldoză sau cetoză. Structurile carbohidraților pe care îi veți testa în experiment sunt redată în figura 5. O reprezentare schematică a metodologiei de clasificare utilizată în acest experiment este redată în figura 6.

Deoarece fiecare test se bazează pe diferitele caracteristici ale carbohidraților, veți folosi la fiecare test în parte probă proaspătă de soluție de carbohidrat. Trebuie să observați cu grijă atât rezultatele pozitive cât și pe cele negative pentru fiecare test. Final, pe baza observațiilor, veți identifica o soluție de zahar necunoscut.

MOD DE LUCRU

Pregătiți trei seturi a câte 5 eprubete cu numele celor 7 soluții de carbohidrați pe care îi veți testa. Veți avea nevoie de câte 10 ml din următoarele soluții de concentrație 1%: fructoză, glucoză, lactoză, sucroză și amidon pe care le veți introduce în primul set.

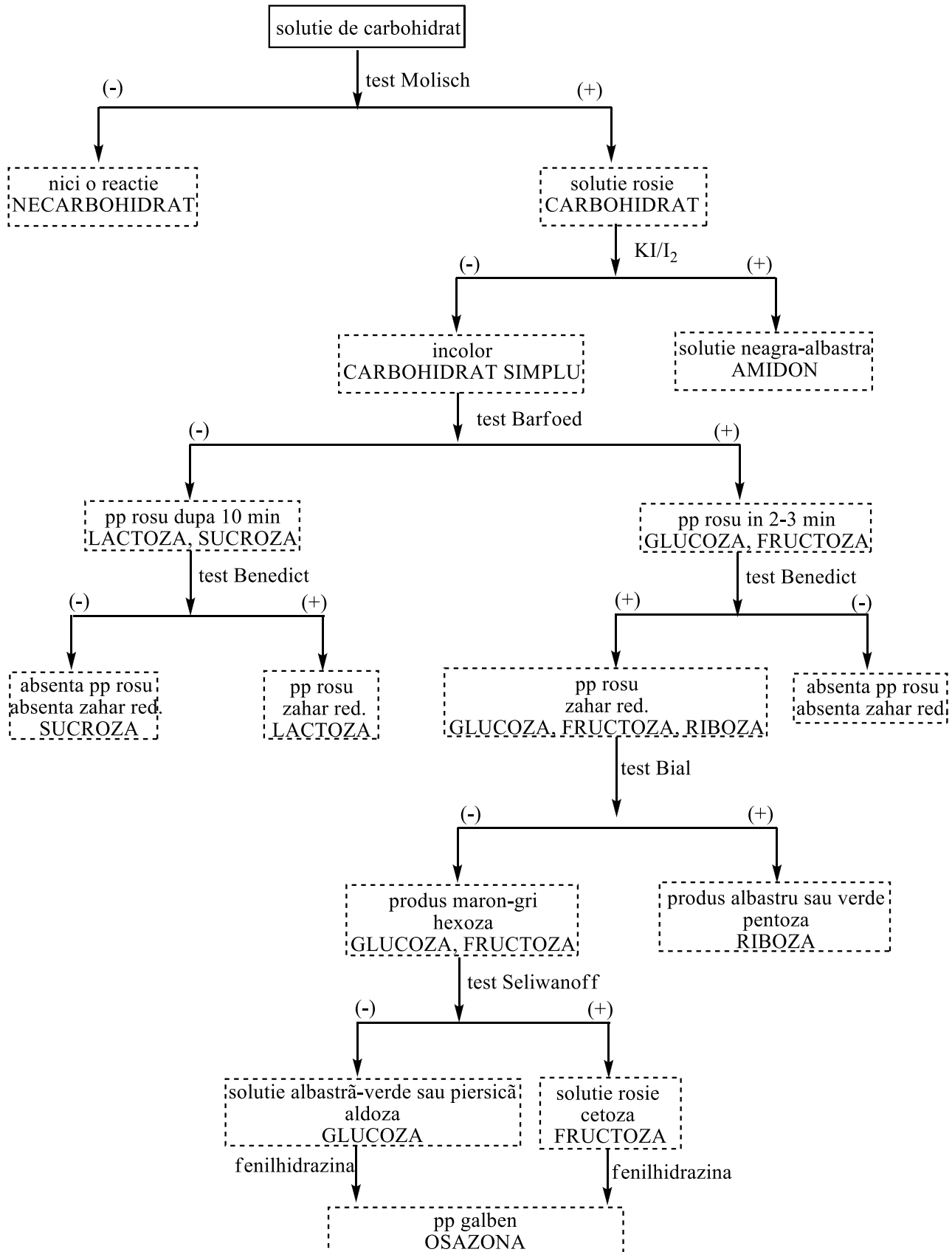


Figura 6. Metodologia de clasificare a carbohidraților

I. Testul Molisch

Precauții: reactivul Molisch conține acid sulfuric concentrate, care este toxic și coroziv. Poate cauza arsuri grave. Evitați contactul cu ochii, pielea, hainele și materialele combustibile. Evitați ingerarea substanței.

1. Transferați câte 2 ml din fiecare soluție de carbohidrat din primul set de eprubete în al doilea set de eprubete. Adăugați două picături de reactiv Molisch în fiecare eprubetă și agitați bine conținutul. Adăugați câte 2 ml de acid sulfuric concentrat în al treilea set de eprubete.

Precauții: în etapa următoare veți adăuga soluții apoase peste acid sulfuric concentra. Prudență maximă la efectuarea acestei etape.

2. Țineți eprubetele conținând acid sulfuric concentrat înclinate la un unghi de 30 de grade față de verticală și adăugați încet soluțiile conținând reactiv Molisch-carbohidrat din cel de-al doilea set de eprubete. Nu agitați soluțiile rezultate. Se vor forma două straturi separate.

Notă: dacă nu apare nici o modificare de culoare la interfața dintre cele două straturi, înseamnă că testul este negativ.

1. Notați rezultatele în fișa de lucru 1.
2. Spălați eprubetele cu soluție de detergent. Clățiți-le de trei ori cu apă de la robinet și o dată cu apă distilată.

II. Testul I₂/KI

Precauții: soluția de I₂/KI este toxică, corozivă și iritantă.

5. Transferați câte 2 ml soluție de carbohidrat în 5 eprubete curate, etichetate cu numele soluțiilor corespunzătoare. Adăugați câte două picături de soluție de I₂/KI în fiecare din cele 5 eprubete.
6. Notați observațiile testelor pozitive sau negative după amestecarea soluțiilor cu reactiv în fișa de lucru.
7. Spălați eprubetele cu soluție de detergent. Clățiți-le de trei ori cu apă de la robinet și o dată cu apă distilată.

III. Testul Barfoed

Precauții: reactivul Barfoed este coroziv, higroscopic și iritant .

8. În 5 eprubete curate etichetate cu numele soluțiilor corespunzătoare de carbohidrați introduceți câte 1 ml soluție. Adăugați 2 ml de reactive Barfoed fiecărei soluții de carbohidrat.
9. Introduceți eprubetele într-o baie de apă la fierbere pentru aproximativ 5 minute. După 5 minute scoateți din baie numai eprubetele conținând un precipitat roșu. Lăsați celelalte eprubete să mai stea încă maxim 5 minute. Notați observațiile privind culoarea precipitatelor în fișa de lucru.

IV. Testul Benedict

Precauții: reactivul Benedict este toxic, higroscopic și iritant.

10. În 5 eprubete curate și etichetate corespunzător introduceți câte 2 ml de reactiv Benedict. Adăugați câte 10 picături de soluție de carbohidrat.
11. Introduceți eprubetele într-o baie de apă la fierbere.
12. Scoateți toate eprubetele după exact 2 minute. Notați observațiile.

V. Testul Bial

Precauții: reactivul Bial este toxic, coroziv, higroscopic, sensibil la lumină și iritant. Manipulați-l la nișă.

14. Introduceți la nișă 1 ml de reactiv Bial în 5 eprubete curate și etichetate. Adăugați câte 2 picături din soluțiile corespunzătoare de carbohidrați.
15. Introduceți eprubetele pe o baie de apă la fierbere.
16. În momentul observării unei modificări de culoare, scoateți eprubeta din baia de apă. Nu lăsați eprubetele să stea mai mult de 3 minute în baie, chiar dacă nu apare nici o modificare de culoare. Notați observațiile în fișa de lucru.
17. Spălați eprubetele cu soluție de detergent. Clătiți-le de trei ori cu apă de la robinet și o dată cu apă distilată.

VI. Testul Seliwanoff

Precauții: reactivul Seliwanoff este toxic, coroziv și iritant.

18. Introduceți câte 10 picături din fiecare soluție de carbohidrat în 5 eprubete curate și etichetate. Adăugați câte 15 picături de apă distilată și 2 ml de reactive Seliwanoff în fiecare eprubetă.
19. Introduceți eprubetele într-o baie de apă la fierbere.
20. Scoateți eprubetele din baie după aproximativ două minute și jumătate. Notați observațiile în fișa de lucru.

VII. Testul cu fenilhidrazina

Precauții: fenilhidrazina este toxică și iritantă. Acidul acetic este inflamabil și poate cauza arsuri grave. Evitați contactul cu ochii, pielea, hainele sau substanțele combustibile. Evitați inhalarea vaporilor și ingerarea substanței. Este sensibilă la umezeală.

21. Introduceți câte 5 ml soluție de carbohidrat în 5 eprubete curate și etichetate corespunzător.
22. Adăugați în fiecare eprubetă câte 0,5 ml acid acetic glacial, câteva miligrame

de fenilhidrazină și o cantitate dublă de acetate de sodiu.

23. Introduceți eprubetele pe baie de apă la fierbere timp de jumătate de oră.
 24. Scoateți eprubetele din baie. După răcire apar cristale galbene specifice, care se pot examina la microscop.
-

FIȘĂ DE LUCRU

I. Testul Molisch

<i>carbohidrat</i>	observații	carbohidrat sau necarbohidrat?
fructoză		
glucoză		
lactoză		
riboză		
amidon		
sucroză		
necunoscut		

II. Testul I₂/KI

<i>carbohidrat</i>	observații	simplic sau complex?
fructoză		
glucoză		
lactoză		
riboză		
amidon		
sucroză		
necunoscut		

III. Testul Barfoed

<i>carbohidrat</i>	observații	monozaharidă sau dizaharidă?
fructoză		
glucoză		
lactoză		
riboză		
amidon		
sucroză		
necunoscut		

IV. Testul Benedict

<i>carbohidrat</i>	observații	reducător sau nereducător?
fructoză		
glucoză		
lactoză		
riboză		
amidon		
sucroză		
necunoscut		

V. Testul Bial

<i>carbohidrat</i>	observații	pentoză sau hexoză?
fructoză		
glucoză		
lactoză		
riboză		
amidon		
sucroză		
necunoscut		

VI. Testul Seliwanoff

<i>carbohidrat</i>	observații	aldoză sau cetoză?
fructoză		
glucoză		
lactoză		
riboză		
amidon		
sucroză		
necunoscut		

VII. Concluzii

<i>carbohidrat</i>	simplic sau complex	monozaharid sau dizaharid	reducător sau nereducător	pentoză sau hexoză	aldoză sau cetoză
fructoză					
glucoză					
lactoză					
amidon					
sucroză					
necunoscut					

ÎNTREBĂRI

1. Desenați structura fructozei în reprezentare Haworth. Evidențiați caracteristicile structurale, precum semiacetalul, legăturile acetalice și carbonul anomic.
2. O soluție necunoscută de carbohidrat (conținând unul din carbohidrații din experiment) a fost testat cu reactivii descriși în experiment. Soluția necunoscută a dat test negativ cu reactivul I_2/KI , a format un precipitat roșu cu reactivul Barfoed în 3 minute și a dat o soluție albastră-verde cu reactivul Bial.
 - a) despre ce carbohidrat este vorba?
 - b) desenați structura carbohidratului în reprezentare Fischer și Haworth.
3. Eritroza este clasificată drept o aldoză cu patru atomi de carbon. Se presupune că soluția acesteia se supune testării urmând procedurile experimentale descrise anterior. Redați rezultatele probabil în urma testărilor.
 - a) I_2/KI
 - b) Molisch
 - c) Barfoed
 - d) Benedict
 - e) Seliwanoff
4. Definiți următorii termeni:
 - a) aldoză
 - b) pentoză
 - c) polizaharide
5. Completați tabelul următor. Pentru fiecare test, indicați ce observați în cazul unui rezultat pozitiv.

test	rezultate așteptate pentru test pozitiv	substanța care dă test pozitiv
I ₂ /KI	a)	b)
Benedict	c)	d)
Bial	e)	f)

6. Anticipați rezultatele testării maltozei în următoarele condiții:

- I₂/KI
- Testul Barfoed
- Clasificați maltoza drept monozaharidă, dizaharidă sau polizaharidă și zahar reducător sau nereducător.

7. Ce tip de compus organic se formează în urma reacției unei aldoze cu reactivul Barfoed? Ce fel de reacție are loc?

8. Explicați de ce fructoza, o hidroxicetoză reacționează cu reactivul Benedict. Ce aranjamente structurale sunt necesare pentru ca reacția să aibe loc?

9. Explicați ce se întâmplă dacă amestecați sucroza cu reactivul Seliwanoff.

10. Ce fel de test poate fi aplicat pentru a distinge între următoarele perechi de carbohidrați:

- a) fructoza și galactoză
- b) riboză și glucoza
- c) glucoza și maltoza

TESTAREA LIPIDELOR

Scopul lucrării Utilizarea testelor calitative pentru clasificarea și identificarea lipidelor.

Generalități Hrana provine din trei surse principale: carbohidrați, proteine și lipide. Dintre acestea, carbohidrații reprezintă sursa cea mai rapidă de energie. Corpul omenesc are o capacitate limitată de a depozita carbohidrați, dar este capabil să transforme carbohidrații neutilizați în lipide, care se constituie în depozite de energie. Lipidele furnizează de două ori mai multă energie/gram decât carbohidrații.

Lipidele îndeplinesc atât rol funcțional cât și structural. Mențin temperatura constantă în țesutul subcutanat.

Spre deosebire de carbohidrați și proteine, lipidele nu posedă grupări funcționale unice pentru a le distinge de alte clase de substanțe prin teste chimice. Lipidele sunt compuși cu grupări eterogene cu proprietăți fizice similare, precum formarea petei de grăsime, solubilitatea și emulsificarea. Pentru clasificarea lipidelor este necesară compararea solubilităților lor relative în solvenți organici și apoși. Se disting cinci clase generale: lipide simple, compuși lipidici, steroizi, terpeni și lipide mixte.

I. Definiție lipide

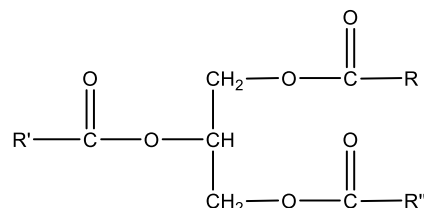
Lipide simple

Lipidele simple includ grăsimile, uleiurile și cerurile. Grăsimile și uleiurile sunt esteri cu masă moleculară mare ai glicerinei și acizilor carboxilici cu catenă lungă, cunoscuți drept **acizi grași**. Cerurile sunt esteri ai acizilor grași și alcoolilor cu catenă lungă. Majoritatea acizilor grași din grăsimi și uleiuri au între 14 și 18 atomi de carbon. Grăsimile se disting de uleiuri prin punctul de topire, care depinde de gradul de saturare a porțiunii de acid gras din moleculă. Grăsimile au puncte de topire mai mari decât uleiurile și au o consistență semi-solidă, în timp ce uleiurile sunt de obicei lichide la temperatura camerei.

Structura generală a grăsimilor și uleiurilor este redată în figura 1, unde R, R' și R'' reprezintă componentele hidrocarbonate din acizii grași. Grăsimile și uleiurile sunt adesea clasificate drept triacilgliceride sau trigliceride datorită faptului că sunt esteri ai glicerinei.

Segmentele de acizi grași cu catenă lungă (grupările R) determină majoritatea proprietăților fizice ale grăsimilor și uleiurilor. Dacă grupările R sunt conectate numai prin legături simple, aceste catene hidrocarbonate sunt saturate; dacă grupările R sunt conectate prin una sau mai multe legături duble legături, atunci catenele sunt nesaturate.

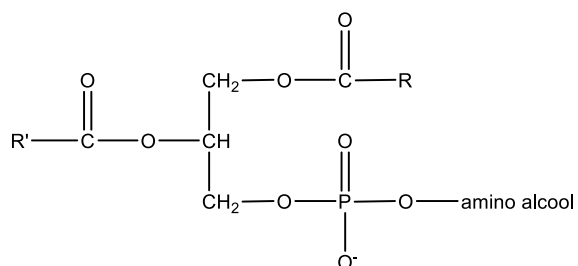
Figura 1. Triacilglicerol sau trigliceridă



Compuși lipidici

Compușii lipidici includ fosfolipidele, sfingolipidele și glicolipidele. **O fosfolipidă** este compusă dintr-o catenă de glicerol conținând două grupări esterice cu acizi grași și o grupare esterică fosfat. Adesea gruparea fosfat este un diester, având a doua grupare esterică formată cu un alcool conținând azot (amino alcool) sau un carbohidrat. Fiind o grupare polară, gruparea fosfat determină solubilitatea în apă a moleculei. O structură tipică fosfolipidică este redată în figura 2.

Figura 2. Structura unei fosfolipide



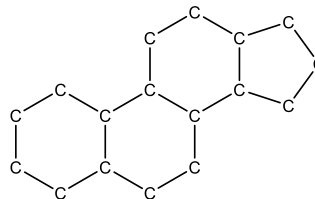
Fosfolipidele sunt clasificate în funcție de alcoolul esterificat la gruparea fosfat în: fosfatidilcoline, denumite și **lecitine**; fosfatidil etanolamine, denumite și **cefaline**; fosfatidil serine și fosfatidil inozitoli.

Fosfolipidele sunt componente importante ale membranelor celulare. De exemplu, lecitinele sunt prezente în cantități apreciabile în țesutul nervos și în creier. Joacă un rol important în neurotransmisie. De asemenea, lecitinele sunt utilizate drept **agenți de emulsificare** în alimente și industria farmaceutică. Commercial se obțin din ulei de soia sau gălbenuș de ou. Abilitatea unei molecule de a înconjura picăturile de ulei și de a preveni separarea lor din soluție apoasă este denumit drept agent de emulsificare.

Steroide

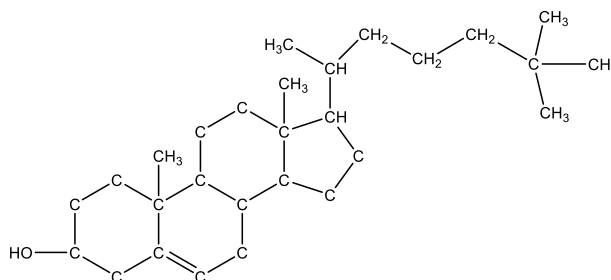
Steroidele sunt lipide având caracteristici structurale diferite: sistem saturat de 4 cicluri condensate cu 17 carboni (figura 3).

Figura 3. Sistem de cicluri
steroide



Multe steroide prezintă o serie de modificări în structura ciclică. Acestea constau în includerea unor substituenți la ciclu de tipul catenelor hidrocarbonate, grupări hidroxilice și grupări carbonilice. Alte modificări constau în includerea în ciclu a unor duble legături sau încorporarea altor atomi, precum oxigenul. Structura colesterolului, cel mai abundent steroid din corpul uman este prezentată în figura 4.

Figura 4. Colesterol



Colesterolul este omniprezent în toate celulele animale și constituie componenta majoră ai membranelor celulare. Este un precursor important în sinteza altor trei steroizi: *acizii biliari*, care ajută la metabolizarea *grăsimilor*, *vitaminelor liposolubile* și a *hormonilor*.

II. Identificarea lipidelor pe baza proprietăților fizice

Lipidele se diferențiază pe baza a trei proprietăți fizice: formarea petei de grăsime, solubilitate și emulsificare. Aceste proprietăți pot fi utilizate la diferențierea lipidelor de compuși ne-lipidici.

Testul petei de grăsime

Acest test simplu a fost utilizat de secole. Lipidele provenind din glicerină și sfinгоzine, o bază cu catenă lungă care reprezintă scheletul sfinгоlipidelor, dau pete translucide pe țesături. Dacă lipida nu este un derivat al glicerinei sau sfinгоzinei, nu va da pată

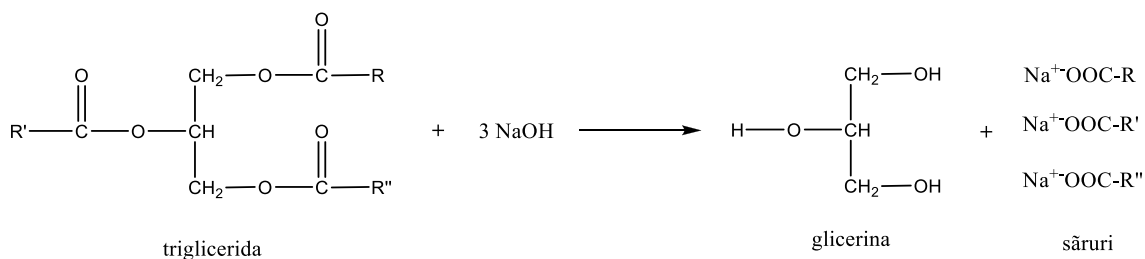
translucidă pe țesătură. Acest test necesită ca lipida să fie sub formă lichidă. Lipidele semi-solide, datorită gradului ridicat de saturare din catenele acizilor grași prezintă puncte de topire mai ridicate decât temperatura camerei și de aceea este necesară încălzirea ușoară înainte de testare.

Testul de solubilitate

Lipidele sunt preponderent formate din carbon, hidrogen și oxigen. Multe clase de lipide conțin și azot și fosfor. Gradul de solubilitate în diverși solvenți variază în funcție de cantitatea relativă a acestor elemente și de structura lor. Lipidele cu conținut hidrocarbonat crescut sunt relativ nepolare și insolubile în apă. Lipidele conținând grupări ionice pot fi dizolvate în apă. Caracterul ionic al unei lipide poate fi modificat prin schimbarea pH-ului.

Testul de emulsificare

Scăderea tensiunii superficiale dintre două lichide nemiscibile, prin împiedicarea separării lor în două straturi, este cunoscută sub denumirea de emulsificare. Pentru a fi un agent de emulsificare, o lipidă trebuie să conțină o porțiune hidrocarbonată nepolară, care va fi atrasă de molecule nepolare din soluție, și o porțiune polară, care va fi atrasă de moleculele de apă polare din soluție.



III. Clasificarea lipidelor pe baza proprietăților chimice

Caracteristicile structurale generale ale unei molecule lipidice pot fi puse în evidență printr-o serie de reacții chimice. Acestea sunt legăturile din esterii acizilor grași, gradul de nesaturare și prezența glicerinei sau a fosfatului. Utilizarea testelor chimice pentru

determinarea caracteristicilor structurale ale lipidelor este utilă în clasificarea generală a acestora. De exemplu, prezența colesterolului poate fi confirmată chimic prin utilizarea testului Liebermann-Burchard.

Testul de saponificare a trigliceridelor

Lipidele care conțin legături esterice ai acizilor grași pot suferi reacții de hidroliză, o reacție catalizată de un acid sau o bază puternice. Hidroliza alcalină a esterilor acizilor grași este cunoscută sub denumirea de **saponificare**. Saponificarea trigliceridelor conduce la glicerină și sărurile acizilor grași corespunzători. Sărurile acizilor grași cu masă moleculară mare se numesc **săpunuri**.

Timp de secole, săpunurile au fost obținute prin fierberea grăsimilor animale într-un vas conținând leșie, o bază puternică, spumarea sărurilor acizilor grași, presarea lor și uscarea. Săpunul de leșie este foarte caustic și cauzează uscarea excesivă a pielii.

Reacția chimică dintre o trigliceridă și o bază în vederea formării glicerinei și sărurilor acizilor grași este redată mai sus.

Testul de halogenare a lipidelor nesaturate

Lipidele conținând legături duble carbon-carbon dau reacții de adiție. O **reacție de adiție** constă în “adăugarea” de atomi precum hidrogenul sau halogeni la o moleculă lipidică conținând atomi de carbon dublu legați. Rezultatul este saturarea legăturilor carbon-carbon. Uleiurile, care conțin legături duble numeroase, pot fi modificate chimic în grăsimi prin adiția de hydrogen. Acest process, denumit **hidrogenare**, transformă uleiurile în oleomargarine, fiind larg întrebuințat în industria alimentară. Cantitatea de halogen precum bromul adăugat la o moleculă lipidică oferă o măsură cantitativă a gradului de nesaturare a lipidei înainte de halogenare.

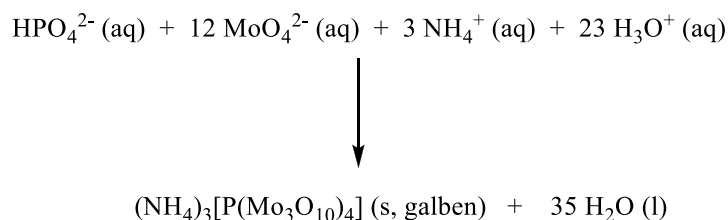
Testul Liebermann-Burchard pentru colesterol

Colesterolul (figura 4) dă o culoare verde caracteristică atunci când este amestecat cu reactivul Liebermann-Burchard, un amestec de anhidridă acetică și acid sulfuric.

Schimbarea culorii poate fi graduală, inițial roz, apoi albastru violet și final verde închis

Testul cu molibdat de amoniu pentru gruparea fosfat

Prezența grupării libere fosfat în soluție acidă poate fi pusă în evidență prin adăugarea reactivului molibdenic. Ecuația dintre anionul fosfat și soluția de molibdat de amoniu în prezență de acid azotic este următoarea:



Molibdatul de amoniu galben precipită după câteva minute.

Atunci când la soluția unei lipideconținând grupări fosfat în structură este adăugat un acid puternic ca în exemplul de mai sus, lipida hidrolizează, eliberând gruparea fosfat. Aceasta reacționează apoi ca în ecuația de mai sus, formând un precipitat galben.

În acest experiment veti clasifica diferite clase de lipide în funcție de proprietățile fizice și de reacțiile chimice.

MOD DE LUCRU

Precauții: anhidrida acetică este corozivă și lacrimogenă. Molibdatul de amoniu este toxic, coroziv și iritant. Soluția de brom 5% este foarte toxică, iritantă și oxidantă. Ciclohexanul este inflamabil și iritant. Diclorometanul este toxic și iritant. Glicerina este iritantă. Acidul clorhidric 6M este foarte toxic și coroziv. Metanolul este foarte toxic și inflamabil. Acidul azotic 6M este foarte toxic, coroziv și oxidant. Soluția de hidroxid de sodium 6M este toxică și corozivă. Acidul sulfuric concentrate este foarte toxic, coroziv și oxidant. Toluenu este inflamabil și toxic.

I. Identificarea lipidelor pe baza proprietăților fizice

Testul petei de grăsime

1. Pe o bucată de hârtie de filtru de 11 cm marcați cu creionul cinci zone astfel: "ulei vegetal", "H₂O", "lecitină", "cholesterol" și "diclorometan".
2. Etichetați două eprubete cu "lecitină" și respective "colesterol". Dizolvați dizolvați câteva miligrame de lecitină, respectiv colesterol în câte 1 ml diclorometan și agitați eprubetele.
3. Aplicați zonei corespunzătoare de pe hârtie substanța adecvată: ulei vegetal, apă, soluție de lecitină, soluție de colesterol și diclorometan. Pentru aplicarea picăturilor aveți nevoie de 5 pipete Pasteur, pentru fiecare substanță.
4. Încălziți bucata de hârtie în vederea evaporării solvenților.
5. Notați observațiile în fișa de lucru 1.

Testul de solubilitate

Precauții: ciclohexanul este inflamabil și iritant. Metanolul este foarte toxic și inflamabil. Toluenu este extreme de inflamabil și toxic. Acidul clorhidric 6M este coroziv, foarte toxic, poate cauza arsuri. Soluția de hidroxid de sodiu 6M este corozivă, toxică, poate cauza arsuri. Evitați contactul acestor substanțe cu ochii, pielea sau hainele. Evitați inhalarea vaporilor sau ingerarea compușilor.

6. Etichetați patru seturi a câte 7 eprubete curate cu numele a șase tipuri de solvenți: "apă distilată", "diclorometan", "ciclohexan", "methanol", "toluene", "6M HCl" și "6M NaOH".
7. Adăugați câte 1 ml din solventul adecvat la fiecare din cele 28 de eprubete. Folosiți un cilindru curat de 10 ml pentru a măsura fiecare solvent.
8. Adăugați 10 picături de ulei vegetal în fiecare eprubetă. Agitați conținutul.
9. Observați gradul de solubilitate al uleiului în solvenții folosiți. Notați observațiile în fișa de lucru 1.
10. Pregătiți o baie de apă și încălziți-o.
11. Puneți aproximativ 0,5 g grăsime solidă într-o eprubetă curată. Introduceți eprubeta în baia de apă și așteptați până ce grăsimea se topește.
12. Repetați pașii 8 și 9 utilizând în locul uleiului următoarele 3 substanțe: prima, utilizați 10 picături de grăsime topită pentru fiecare din cei 7 solvenți. A doua,

utilizați aproximativ 0,1 g lecitină pentru fiecare din cei 7 solvenți. Notați observațiile în fișa de lucru 1.

13. Dacă substanțele nu se dizolvă în 1 ml de solvent, mai adăugați 5 ml și agitați. Notați observațiile în fișa de lucru 1.

Testul de emulsificare

14. Etichetați o eprubetă curată cu termenul "lecitină". Suspendați 0,1 g lecitină în 6 ml apă distilată și agitați.
15. În alte două eprubete curate etichetate cu "ulei vegetal" și "ulei vegetal/lecitină" introduceți câte 1 ml de ulei vegetal și 5 ml de apă distilată.
16. Adăugați 3 ml suspensie de lecitină preparată la etapa 15 în eprubeta etichetată cu "ulei vegetal/lecitină".
17. Agitați energic cele două eprubete.
18. Notați observațiile în fișa de lucru 1 pe parcursul a 5 minute, până când amestecul din eprubetă se separă în două straturi.

II. Clasificarea lipidelor pe baza reacțiilor chimice

Testul de saponificare pentru triglyceride

19. Etichetați trei eprubete curate cu "ulei", "grăsime" și "colesterol". Introduceți 8 picături de ulei în eprubeta "ulei", 8 picături de grăsime topită în eprubeta "grăsime" și 0,1 g colesterol în eprubeta "colesterol". Adăugați 10 picături de soluție NaOH 3M în fiecare eprubetă.
20. Încălziți eprubetele pe o baie de apă timp de 15-20 minute după care lăsați să se răcească la temperatura camerei.
21. Adăugați 5 ml de apă distilată în fiecare eprubetă și agitați energic. Notați observațiile în fișa de lucru 2.

Testul halogenare pentru lipidele nesaturate

22. În trei eprubete curate etichetate cu “ulei”, “grăsime” și “glicerină” introduceți câte 3 ml de diclorometan.
23. Adăugați 10 picături de ulei vegetal în eprubeta “ulei vegetal”, 10 picături de grăsime topită în eprubeta “grăsime” și respective 10 picături de glicerină în eprubeta “glicerina”. Agitați energic conținutul eprubetelor.

Precauții: soluția de brom 5% utilizată în etapele 27 și 28 este foarte toxică, iritantă și oxidantă. Evitați contactul cu pielea. Nu inhalați vaporii degajați. Lucrați la nișă. Dacă soluția de brom vine în contact cu pielea spălați imediat suprafața respectivă cu soluție saturată de bisulfit de sodium.

24. Într-o biuretă de 25 ml, la nișă, introduceți cu o pâlnie soluție de brom 5%. Notați în fișa de lucru 2 volumul inițial al soluției de brom. Adăugați soluție de brom în picături și sub agitare în eprubeta conținând ulei vegetal în diclorometan, până la apariția culorii roșie brun a soluției de brom. Notați în fișa de lucru 2 volumul final al soluției de brom din biuretă și calculați volumul de soluție necesar pentru această reacție.
25. Repetați încă de două ori etapa 27 pentru a testa grăsimea topită și glicerina din diclorometan. Notați observațiile în fișa de lucru 2.

Testul Liebermann-Burchard pentru cholesterol

26. În 4 eprubete curate etichetate cu “lecitină”, “cholesterol”, “grăsime” și “ulei” introduceți câte 0,1 g lecitină, 0,1 g colesterol, două picături de grăsime topită și respectiv două picături de ulei vegetal.

Precauții: acidul sulfuric concentrat este toxic, coroziv și cauzează arsuri grave. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați ingerarea substanței. Dacă soluția ajunge în contact cu pielea spălați imediat cu apă zona expusă timp de câteva minute.

Precauții: anhidrida acetică este corozivă și lacrimogenă. Poate cauza arsuri. Utilizați-o la nișă. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați ingerarea substanței.

27. Introduceți la nișă în fiecare din cele 4 eprubete pregătite în etapa 30 câte 2 ml diclorometan, 20 picături de anhidridă acetică și două picături de acid sulfuric concentrat. Agitați energic conținutul eprubetelor.
28. Lăsați-le să stea aproximativ 5 minute. Observați culoarea și intensitatea relativă a fiecărui amestec și notați observațiile în fișa de lucru 2.
29. Spălați eprubetele cu soluție de detergent. Clătiți-le de trei ori cu apă de la robinet și o dată cu apă distilată.

Testul cu molibdat de amoniu pentru fosfat

30. Pregătiți o baie de răcire cu gheață și apă.

Precauții: HNO_3 6M este o substanță corozivă, toxică care cauzează arsuri grave. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea vaporilor și ingerarea acidului.

31. Într-o eprubetă curată introduceți 0,2 g lecitină peste care adăugați 3 ml soluție HNO_3 6M. Încălziți conținutul eprubetei într-o baie de apă pentru aproximativ 5-6 minute. Dacă amestecul de reacție spumează, agitați eprubeta.
32. Introduceți eprubeta conținând amestecul de reacție în baia de gheață pentru aproximativ 5-10 minute.

Precauții: soluția de molibdat de amoniu este toxică, corozivă și iritantă. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea vaporilor și ingerarea compusului.

33. Decantați soluția clară într-o eprubetă curată peste care adăugați 1 ml soluție molibdat de amoniu 0,2 M. Agitați conținutul eprubetei.
34. Introduceți conținutul eprubetei într-o baie de apă încălzită la 65°C , pentru aproximativ 5 minute. Notați observațiile în fișa de lucru 2 precum și culoarea precipitatului format.

FIȘĂ DE LUCRU 1

I. Identificarea lipidelor pe baza proprietăților fizice**Testul petei de grăsime**

observații

ulei vegetal

apă

soluție de lecitină

soluție de colesterol

diclorometan

Testul de solubilitate

observații

solvenți

ulei vegetal

grăsime vegetală

lecitină

colesterol

apă

diclorometan

ciclohexan

methanol

toluene

soluție HCl 6M

soluție NaOH 6M

Testul de emulsificare

observații

timpul necesar separării straturilor, min

ulei vegetal + apă

ulei vegetal + apă +

lecitină

FIȘĂ DE LUCRU 2

II. Clasificarea lipidelor pe baza reacțiilor chimice***Testul de saponificare pentru trigliceride***

observații

după încălzire

după adăugare H₂O

ulei

grăsime

colesterol

Testul halogenare pentru lipidele nesaturatevolumul de soluție Br₂ 5% în CH₂Cl₂

ulei vegetal

grăsime

glicerină

citire finală biuretă, ml

citire inițială biuretă, ml

volumul de soluție Br₂ 5% utilizat, ml***Testul Liebermann-Burchard pentru colesterol***

observații

colesterol

lecitină

grăsime

Ulei vegetal

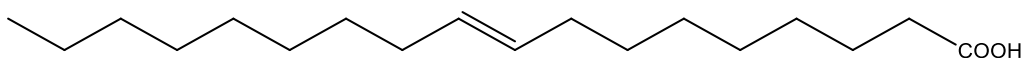
Testul cu molibdat de amoniu pentru fosfat

observații

lecitină

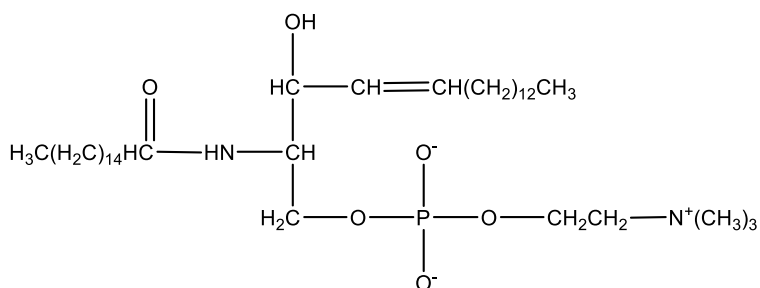
ÎNTREBĂRI

1. Explicați ce se întâmplă dacă adăugați lecitină la un amestec de ulei și apă. Identificați elementele structurale din moleculele de lecitină responsabile pentru acest rezultat.
2. Scrieți ecuația chimică care stă la baza reacției dintre brom și trioleina, o trigliceridă a acidului oleic cu structura:



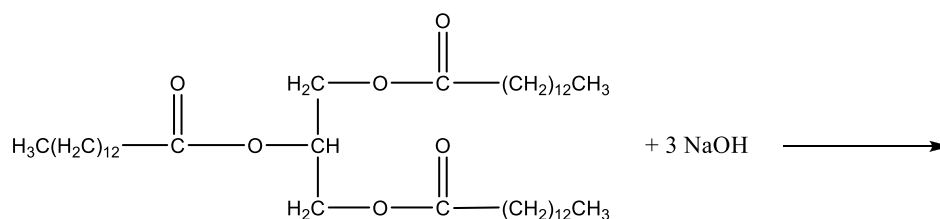
3. Încercând să identifice un anume compus, un student a utilizat modul de lucru redat în acest experiment. Lipida a format o emulsie atunci când s-a amestecat cu ulei și apă, a reacționat cu soluția apoasă de hidroxid de sodiu pentru a forma săpun, însă nu a reacționat cu soluția de brom și a dat rezultat pozitiv la testul cu molibdat de amoniu. Descrieți structura lipidei în acord cu aceste rezultate.
4. Structura N-palmitoil-D-sfingomielinei, o sfingolipidă, este redată mai jos. Descrieți comportamentul acesteia la următoarele teste:

- d) pata de grăsime
- e) soluție de brom 5% în diclorometan
- f) molibdat de amoniu



5. Explicați pe scurt (eventual cu ajutorul formulelor chimice) semnificația următorilor termeni.

- b) Trigliceridă
 - c) Fosfolipidă
 - d) Steroid
 - e) agent de emulsificare
 - f) saponificare
6. a) Cum se distinge o grăsime de un ulei?
b) Ce elemente structurale din moleculele lipidice determină aceasta?
7. Clasificați următoarele lipide în simple, compuși lipidici sau steroidi.
- a) Dipalmitoil fosfatidil serina
 - b) colesterol
 - c) tripalmitina
8. Redați produșii care rezultă în urma reacției dintre trimiristina cu soluție apoasă de hidroxid de sodiu.



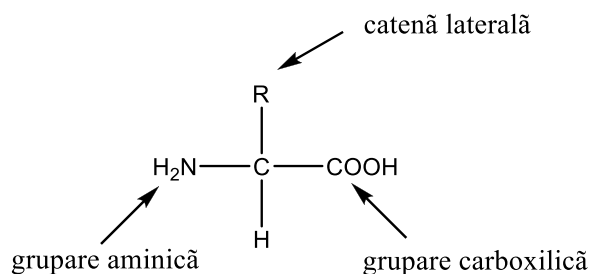
9. Descrieți o metodă sau un test pentru a diferenția următoarele perechi de lipide:
- a) Ulei de măsline și grăsime vegetală
 - b) Lecitină și ulei de porumb
 - c) Colesterol și tripalmitină

TESTAREA CALITATIVĂ A AMINOACIZILOR ȘI PROTEINELOR

Scopul lucrării Studiul proprietăților și reacțiilor amino acizilor și proteinelor cu diverși reactanți în vederea clasificării și identificării acestor compuși.

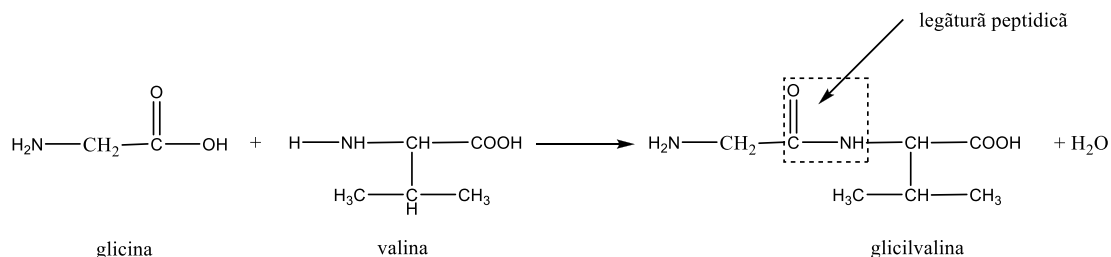
Generalități Proteinele constituie principala sursă de energie a organismului pentru creșterea și întreținerea celulară. După apă, proteinele reprezintă principalii constituenți ai celulelor. Proteinele sunt compuși polimerici mari care se obțin din variate unități structurale numite **amino acizi**. Structura generală a unui amino acid este redată în figura 1. Observați că toți amino acizii conțin grupări carboxilice (-COOH), grupări aminice (-NH₂) și substituenți sau catene laterale (R).

Figura 1. Structura generală a unui amino acid



Corpul uman sintetizează proteine utilizând aproximativ 20 de amino acizi, care diferă numai prin structurile catenelor lor laterale. Structura radicalilor R determină clasa de aminoacizi: nepolară, neutră, bazică sau acidă. Celulele umane pot sintetiza majoritatea amino acizilor necesari construirii proteinelor. Totuși, un număr de 8 amino acizi nu pot fi sintetizați de corpul uman, fiind necesar să fie obținute din alimentație. Acești amino acizi se numesc amino acizi esențiali.

Amino acizii încorporați în proteine sunt legați covalent prin **legături peptidice**. Acestea sunt legături amidice formate între gruparea carboxilică a unui amino acid și gruparea aminică a celui de-al doilea amino acid.



Întrucât fiecare amino acid conține cel puțin câte o grupare aminică și o grupare carboxilică, este posibil ca legătura peptidică să se formeze în două moduri diferite. De exemplu, pentru glicina și valina legătura peptidică se poate forma între gruparea acidă a valinei și gruparea aminică a glicinei, rezultând valilglicina.

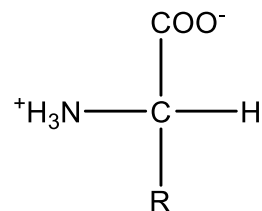
I. Solubilitatea amino acizilor și proteinelor

Proprietățile fizice ale amino acizilor și proteinelor sunt determinate în special de structura lor, atât în stare solidă cât și în soluție. În acest experiment veți investiga solubilitatea unor amino acizi și proteine în diverse soluții. Pe baza datelor obținute veți compara caracteristicile structurale ale amino acizilor și proteinelor.

Solubilitatea în funcție de pH

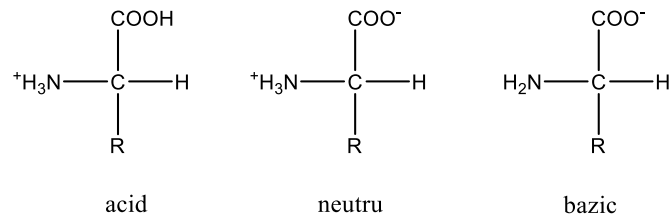
Prezența grupărilor aminice și carboxilice permite amino acizilor să accepte sau să cedeze protoni într-o soluție apoasă, deci să joace rolul atât de bază cât și de acid. Deoarece proteinele conțin atât catene laterale acide cât și bazice, acestea pot la rândul lor să doneze sau să accepte protoni. O moleculă care funcționează simultan ca acid și ca bază este denumită moleculă amfoterică. În soluții apoase neutre amino acizii se comportă ca molecule amfoterice. De exemplu, un amino acid cu o catenă laterală neutră conține două sarcini: una pozitivă, datorită protonării grupării amino și una negativă, datorită disocierii protonului acidului carboxilic. Această formă ionică dublă a unui amino acid este denumită formă zwiterionică (figura 2).

Figura 2. Forma zwiterionică a unui amino acid



Solubilitatea amino acizilor și proteinelor depinde foarte mult de pH-ul soluției. Modificările structurale din amino acid sau proteină la diferite valori de pH influențează solubilitatea relativă a moleculei. În soluții acide, ambele grupări amino și carboxilică sunt protonate. În soluții bazice, ambele grupări sunt neprotonate. Figura 3 prezintă un amino acid în soluții acidă, neutră sau bazică.

Figura 3. Structura unui aminoacid în soluție acidă, neutră sau bazică



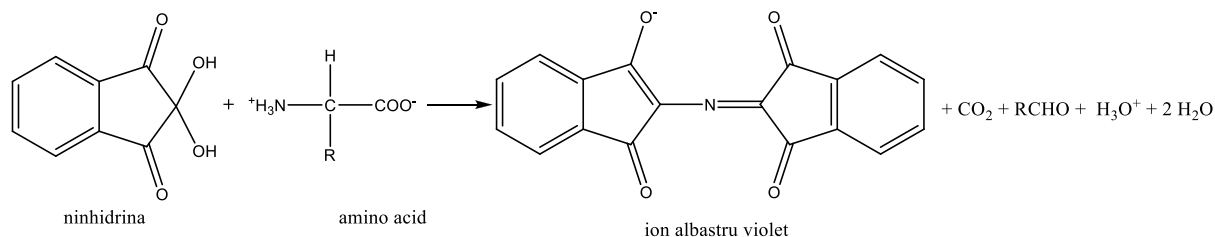
Valoarea pH-ului la care concentrațiile grupărilor anionice și cationice sunt egale reprezintă punctul izoelectric pentru acel amino acid sau proteină. Amino acizii și proteinele sunt foarte greu solubile la punctul izoelectric. Majoritatea proteinelor care se găsesc în țesuturile și fluidele corpului au punctele izoelectrice sub $pH = 7$ deci există preponderent în forme anionice.

II. Reacțiile chimice ale grupărilor funcționale din amino acizii și proteine

Anumite grupări funcționale din amino acizi și proteine pot da reacții specifice conducând la produși colorați. Intensitatea culorii produsului format de o anumită grupă variază de la proteină la proteină, în funcție de numărul, grupările funcționale reactive prezente și gradul de accesibilitate la reactiv.

Testul ninhidrinei

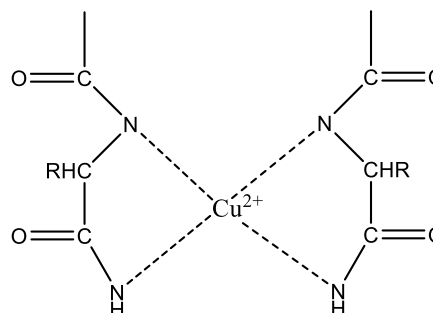
Amino acizii care conțin o grupare aminică liberă și o grupare carboxilică liberă reacționează cu ninhidrina, dând un produs colorat. Proteinele conțin de asemenea grupări aminice libere la carbonul alfa și pot reacționa cu ninhidrina, conducând la un produs albastru violet.



Testul Biuret

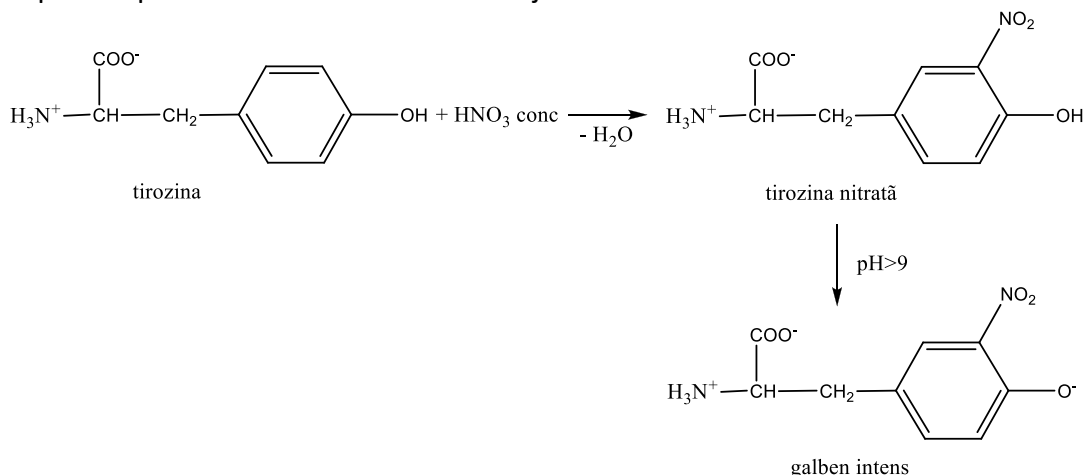
Testul biuret identifică proteinele în soluții printr-o culoare violet intensă. Biuret, $H_2NCONHCONH_2$, reacționează cu ionii de cupru (II) în soluție bazică, formând un complex violet închis. Legăturile peptidice din proteine sunt similare celor din biuret și formează la rândul lor complecși violeti cu ioni de cupru (II) în soluții (figura 4).

Figura 3. Complex proteină-
ion de cupru (II), numit și
complex biuret



Testul xantoproteic

O serie de amino acizi conțin grupări aromatice, derivați ai benzenului. Aceste grupări aromatice pot da reacții caracteristice benzenului sau derivaților acestuia. O asemenea reacție este nitrarea benzenului cu acid azotic. Amino acizii tirozina și triptofanul conțin nuclee benzenice activate și dau cu ușurință reacții de nitrare. Fenilalanina conține de asemenea un nucleu benzenic, însă acesta nu este activat și prin urmare nu dă reacții de nitrare. În cazul în care nitrarea este utilizată pentru a identifica prezența unui nucleu benzenic activat, reacția se mai numește și testul xantoproteic, deoarece produsul este galben. Intensitatea culorii se accentuează dacă reacția are loc în soluție bazică. Testul xantoproteic pentru tirozină este redat mai jos:

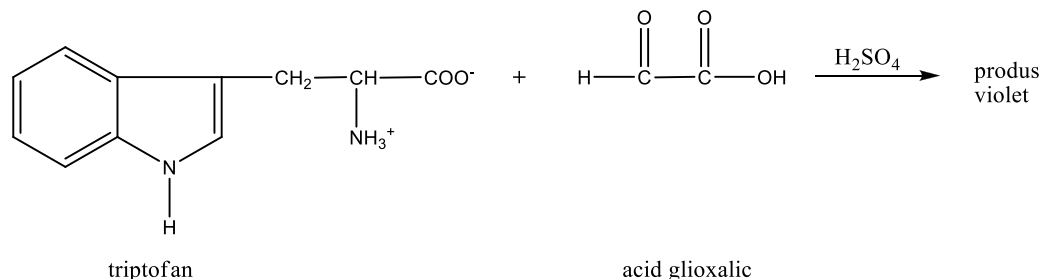


Testul Millon

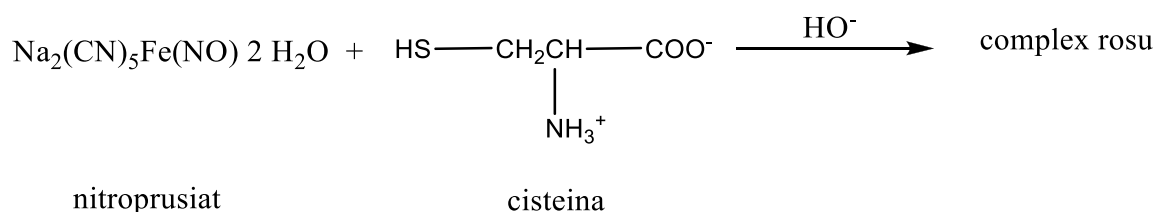
Acest test este specific pentru tirozină, singurul amino acid care conține o grupare fenolică, respectiv o grupare hidroxilică atașată la un nucleu benzenic. În testul Millon, gruparea fenolică a tirozinei este nitrată întâi cu acid azotic. Apoi complexii tirozinei nitate cu ioni de mercur (I) și mercur (II) formează în soluție un precipitat roșu sau o soluție roșie. Proteinele care conțin tirozină dau de asemenea acest test.

Testul Hopkins-Cole

Testul Hopkins-Cole este specific pentru triptofan, singurul amino acid care conține o grupare indolică. Ciclul indolic reacționează în prezența unui acid puternic cu acidul glioxalic, dând un produs ciclic violet.

**Testul nitroprusiat**

Testul cu nitroprusiat este specific pentru cisteină, singurul amino acid care conține gruparea sulfidril (-SH). Aceasta reacționează cu nitroprusiatul în soluție alcalină dând un complex colorat:



- Etape**
1. Testarea proprietăților fizice ale amino acizilor și proteinelor
 2. Testarea proprietăților chimice ale amino acizilor și proteinelor

MOD DE LUCRU

Precauții: acidul azotic concentrate este toxic, coroziv și oxidant puternic. Acidul sulfuric concentrate este toxic și coroziv. Soluția de sulfat de cupru (II) 0,1 M este toxică, iritantă pentru piele. Acidul clorhidric 3M este toxic și coroziv. Reactivul Millon conține azotat de mercur (II) în acid azotic concentrate este foarte toxic, coroziv și oxidant puternic. Soluția de ninhidrină 5% în etanol este toxică și iritantă. Soluția de hidroxid de sodium 3M este toxică și corozivă. Soluția de nitroprusiat 2% este foarte toxică.

I. Solubilitatea amino acizilor și proteinelor

Solubilitatea în apă

1. Etichetați șase eprubete curate cu următoarele numele următoarelor substanțe: glicina, acid glutamic, lizina, tirozina, gelatina și caseină. Introduceți câte 0,05 g din fiecare substanță în eprubeta corespunzătoare. Adăugați câte 2 ml de apă distilată în fiecare eprubetă. Agitați energic eprubetele timp de 2 minute. Notați observațiile în fișa de lucru 1. Păstrați amestecul din eprubete pentru următoarea etapă.

Solubilitatea în funcție de pH

Precauții: soluția de hidroxid de sodiu 3M este toxică, corozivă și poate cauza arsuri. Evitați contactul cu ochii, pielea sau hainele

2. Adăugați 1 ml de soluție NaOH 3M în eprubeta cu glicină. Agitați eprubeta timp de 1 minut. Notați observațiile în fișa de lucru 1.

Precauții: acidul clorhidric 3M este o soluție corozivă, toxică și poate cauza iritarea pielii. Evitați contactul cu ochii, pielea sau hainele. Evitați inhalarea vaporilor sau ingerarea substanței.

3. Adăugați o bucățică de hârtie de pH în eprubetă. Adăugați în picături în eprubeta cu glicină soluție de HCl 3M până ce hârtia indică un pH acid. Agitați eprubeta. Notați observațiile în fișa de lucru 1.
4. Adăugați încă 15 picături de acid clorhidric 3M în eprubeta cu glicină. Agitați eprubeta timp de 1 minut. Notați observațiile în fișa de lucru 1.
5. Repetați pașii 1-4 cu amestecurile preparate în etapa 1.

II. Reacțiile chimice ale grupărilor funcționale ale amino acizilor și proteinelor

Testul cu ninhidrina

Precauții: reactivul ninhidrină-etanol este inflamabil, toxic și iritant. Nu îl lăsați în apropierea becului de gaz. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea vaporilor sau ingerarea reactivului

6. Etichetați 6 eprubete curate cu numele următoarelor soluții: 2% glicină, 1% tirozină, 2% prolină, 2% caseină, 2% gelatină și 2% albumină. Introduceți câte 15 picături din soluțiile corespunzătoare în eprubete. Adăugați câte 15 picături de soluție ninhidrină -

etanol 0,5% în fiecare eprubetă.

7. Încălziți eprubetele pe o baie de apă timp de 5 minute. Notați observațiile în fișa de lucru 2.

Testul Biuret

Precauții: soluția de sulfat de cupru (II) 0,1M este toxică și iritantă. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea sau ingerarea soluției.

8. În 5 eprubete curate etichetate cu numele următoarelor soluții: 2% glicină, 2% arginină, 2% gelatină, 2% cazeină și 2% albumină introduceți câte 15 picături din soluțiile corespunzătoare. Adăugați câte 5 picături de soluție NaOH 3M și câte 2 picături de soluție de sulfat de cupru (II) 0,1 M în fiecare eprubetă. Agitați energic conținutul eprubetelor. Notați observațiile în fișa de lucru 2.
9. Adăugați 10 picături de ulei vegetal în eprubeta “ulei vegetal”, 10 picături de grăsime topită în eprubeta “grăsime” și respective 10 picături de glicerină în eprubeta “glicerina”. Agitați energic conținutul eprubetelor.

Testul Xantoproteic

Precauții: HNO₃ concentrat este toxic, coroziv și poate cauza arsuri foarte grave și decolorarea pielii. Evitați contactul cu ochii, pielea sau hainele. Evitați inhalarea sau ingerarea compusului.

10. În 5 eprubete curate etichetate cu numele următoarelor soluții: 1% tirozină, 2% triptofan, 2% glicină, 2% albumină și 2% gelatină introduceți câte 15 picături din soluțiile corespunzătoare.

Precauții: în etapa următoare veți adăuga acid azotic concentrat la soluția apoasă. Prudență maximă în timpul etapei 14!

11. Introduceți la nișă 10 picături de acid azotic concentrat în eprubeta conținând tirozină 1%. Introduceți eprubeta pe o baie de apă și încălziți timp de 1-2 minute. Scoateți eprubeta din baie și lăsați să se răcească. Notați observațiile în fișa de lucru 2.
12. Repetați etapa 14 utilizând și celelalte soluții.
13. În fiecare din soluțiile răcite anterior (etapa 14, 15) adăugați cu grijă soluție de NaOH 3M până ce pH-ul soluțiilor dă reacție pozitivă pe hârtia indicatoare de pH. Notați observațiile în fișa de lucru 2.

Testul Millon

Precauții: reactivul Millon conține mercur și HNO_3 și este foarte toxic, coroziv, oxidant puternic, iritant și poate cauza arsuri. Sunt posibile efecte cumulative la ingerare. Poate lua foc în contact cu materiale combustibile. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea vaporilor sau ingerarea reactivului.

14. Etichetați 6 eprubete curate cu numele următoarelor soluții: 1% tirozină, 2% triptofan, 2% glicină, 2% albumină, 2% gelatină și 2% cazeină. Adăugați câte 2 ml din soluții în eprubetele corespunzătoare. Adăugați câte 3 ml de reactive Millon în fiecare eprubetă. Introduceți eprubetele pe o baie de apă și încălziți soluțiile până la punctul de fierbere. Notați observațiile în fișa de lucru 2.

Testul Hopkins-Cole

Precauții: acidul sulfuric concentrat este toxic, coroziv și cauzează arsuri grave. Evitați contactul cu ochii, pielea, hainele sau materiale combustibile. Evitați ingerarea substanței.

Precauții: în următoarea etapă veți adăuga acid sulfuric la o soluție apoasă. Prudență maximă în etapa 21.

Precauții: reactivul Hopkins-Cole este toxic, coroziv și higroscopic. Poate cauza arsuri. Evitați contactul cu ochii, pielea sau hainele. Evitați inhalarea sau ingerarea compusului.

15. Etichetați 4 eprubete curate cu numele următoarelor soluții: 1% tirozină, 2% triptofan, 2% albumină și 2% gelatină. Introduceți câte 2 ml din fiecare soluție în eprubetele corespunzătoare. Adăugați fiecărei eprubete câte 2 ml de reactiv Hopkins-Cole.

Notă: dacă nu se formează un inel roșu la interfața dintre cele două straturi, atingeți eprubeta ușor lateral astfel încât cele două straturi să se amestece. Dacă inelul roșu încă nu se formează, considerați testul negativ.

16. Țineți înclinată la un unghi de 45 de grade eprubeta conținând tirozină 1% și adăugați încet, cu precauție, 30 de picături de acid sulfuric concentrat pe peretele eprubetei. Nu amestecați cele două straturi care se formează. Notați observațiile în fișa de lucru 2.
17. Repetați etapa 21 și pentru celelalte soluții.

Testul Nitroprusiac

18. Etichetați 4 eprubete curate cu numele următoarelor soluții: 2% glicină, 2% cisteină, 2% albumină și 2% cazeină. Puneți o etichetă albă pe cea de-a cincea eprubetă (eprubetă de control). Introduceți câte 2 ml din soluția de glicină 2% și cisteină 2%, respectiv câte 4 ml din soluția de albumină 2% respectiv cazeină 2% în eprubetele corespunzătoare. Adăugați câte 2 ml de soluție de NaOH 3M în fiecare din cele 5 eprubete.

Precauții: soluția de nitroprusiat de sodiu 2% este foarte toxică. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea sau ingerarea compusului.

19. Adăugați câte 1 ml de soluție de nitroprusiat de sodium 2% în fiecare eprubetă, inclusive în cea de control. Notați observațiile în fișa de lucru 2.

FIȘĂ DE LUCRU 1

I. Solubilitatea amino acizilor și proteinelor***Solubilitatea în apă***

observații

glicină

Acid glutamic

lizină

tirozină

gelatină

cazeină

Solubilitatea funcție de pH

observații

soluție NaOH 3M

soluție HCl 3M

soluție HCl 3M

(slab acidă)

(puternic acidă)

glicină

acid glutamic

lizină

tirozină

gelatină

cazeină

FIȘĂ DE LUCRU 2

II. Reacțiile chimice ale grupărilor funcționale ale amino acizilor și proteinelor**Testul cu Ninhidrina**

observații

glicina 2%

tirozina 1%

prolina 2%

cazeina 2%

gelatina 2%

albumina 2%

Testul Biuret

Observații

glicina 2%

arginina 1%

gelatina 2%

cazeina 2%

albumina 2%

Testul Xantoproteic

observații

după încălzire

după adăugare de NaOH 3M

glicina 2%

tirozina 1%

triptofan 2%

albumina 2%

gelatina 2%

Testul Millon

observații

tirozina 1%

triptofan 2%

glicina 2%

cazeina 2%

gelatina 2%

albumina 2%

Testul Hopkins-Cole

observații

tirozina 1%

triptofan 2%

albumina 2%

gelatina 2%

Testul cu Nitroprusiat

observații

glicina 2%

cisteina 2%

albumina 2%

cazeina 2%

probă etalon

ÎNTREBĂRI

1. Explicați cum afectează pH-ul solubilitatea rezultatelor notate în partea a 2-a a fișei 1. Utilizați structuri pentru explicarea rezultatelor.
2. O proteină necunoscută a fost supusă unor teste specifice și a dat rezultatele de mai jos. Pe baza acestor rezultate, ce amino acid trebuie să fie prezent în proteină?

test	observație
ninhidrina	soluție galbenă
xantoproteic	soluție galbenă
Millon	precipitat roșu
Hopkins-Cole	incolor
nitroprusiat	soluție roșie

3. Vasopresina, o substanță produsă de corpul uman care reglează debitul sângelui și presiunea, este o nepeptidă cu următoarea secvență de amino acizi. Descrieți rezultatele pe care le așteptați atunci când vasopresina este testată cu următorii reactivi:

GLY-ARG-PRO-CYS-ASN-GLN-PHE-TYR-CYS

test	observație
xantoproteic	
Millon	
Hopkins-Cole	
nitroprusiat	

4. Explicați pe scurt semnificațiile următorilor termeni:

g) amino acizi esențiali

- h) legătură peptidică
- i) punct izoelectric

5. Gruparea R a amino acidului lizină este



Desenați structura completă a lizinei, incluzând și formele ionizate în:

- g) soluție puternic acidă
- h) soluție neutră
- i) soluție puternic bazică

6. Anticipați rezultatele testării lizinei în următoarele condiții:

- solubilitatea în soluție acidă
- ninhidrină
- biuret
- nitroprusiat

TESTAREA CALITATIVĂ A NUCLEOPROTEIDELOR

Scopul lucrării Hidroliza nucleoproteidelor din drojdia de bere și testarea chimică calitativă a componentelor acizilor nucleici.

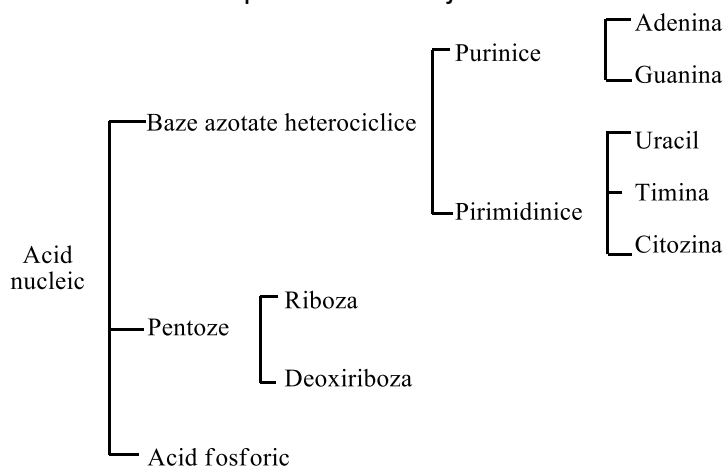
Generalități **Nucleoproteidele** sunt constituenții universali ai materiei vii. Ele au în compoziția lor o componentă proteică și acizi nucleici. Cromozomii, ribozomii, virușii sînt particule nucleoproteice. Acizii nucleici sunt formați din unități numite nucleotide.

O nucleotidă conține:

- o bază azotată heterociclică
- o moleculă de pentoză
- o moleculă de acid fosforic.

Nucleotidele se leagă între ele prin legături chimice într-o rețea liniară numită catenă polinucleotidică. Una, două și foarte rar trei catene de nucleotizi formează o moleculă de acid nucleic.

Constituția acizilor nucleici este reprezentată mai jos

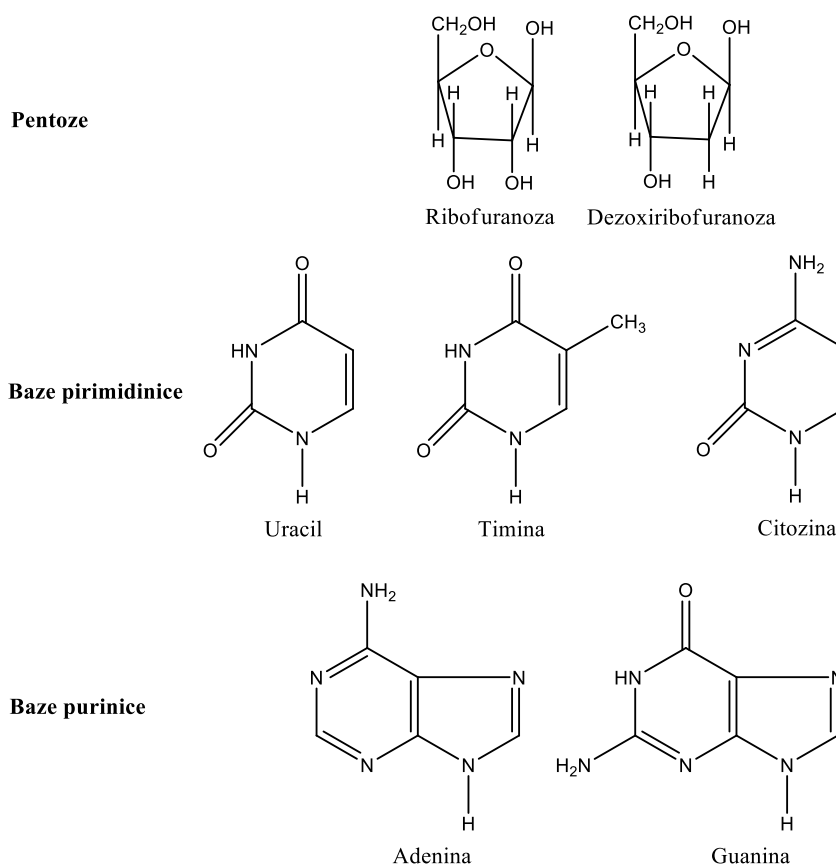


După natura pentozei se deosebesc două clase de acizi nucleici, și anume:

- acizi ribonucleici (ARN), în care pentoza este riboza
- acizi dezoxiribonucleici (ADN), în care pentoza este dezoxiriboza.

Acizii nucleici sunt substanțe complexe cu mase moleculare cuprinse între câteva zeci de mii și mai multe milioane, uneori chiar zeci de milioane de unități atomice de masă. ADN-ul conține toată informația genetică care fixează caracterele ereditare ale indivizilor. Erorile din ADN constituie bazele miilor de boli genetice. ARN-ul are un rol fundamental în sinteza proteinelor.

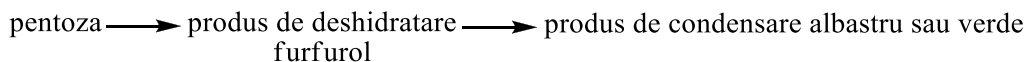
Nucleoproteidele din drojdia de bere (bogată în acizi nucleici) se descompun prin hidroliza acidă în prima treaptă în proteine și acizi nucleici. Apoi acizii nucleici se desfac în prima treaptă în **mononucleotide** și **acid fosforic**, apoi în treapta a doua în **nucleozide** care în ultima treaptă se scindează **aldopentoze** (riboza și deoxiriboza) și **baze azotate** (pirimidinice: uracil, timina, citozina și purinice: adenină și guanină). Producții de hidroliză se pot identifica prin reacții specifice.



I. Identificarea pentozelor

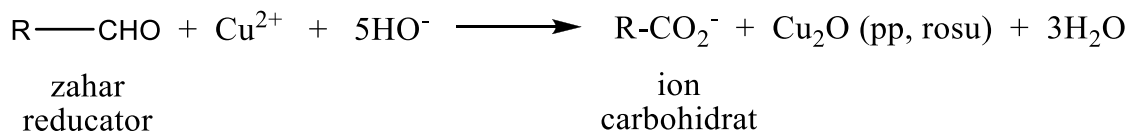
Testul Bial

Este utilizat pentru identificarea zaharurilor. Pentozele din acizii nucleici supuse testului Bial dau un produs albastru verde.

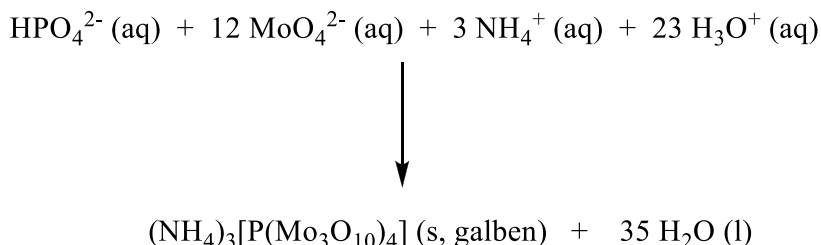


Testul Benedict

Testul presupune utilizarea ionilor de cupru (II) în mediu ușor bazic. Prezența zaharurilor reducătoare va determina reducerea ionilor de cupru (II) la Cu_2O .

**II. Identificarea acidului fosforic****Testul cu molibdat de amoniu**

Prezența grupării libere fosfat în soluție acidă poate fi pusă în evidență prin adăugarea reactivului molibdenic. Ecuația dintre anionul fosfat și soluția de molibdat de amoniu în prezență de acid azotic este următoarea:



Molibdatul de amoniu galben precipită după câteva minute.

III. Identificarea nucleobazelor**Testul cu azotat de argint amoniacal**

Prezența bazelor purinice în soluție alcalină poate fi pusă în evidență cu soluție amoniacală de azotat de argint, când se formează un precipitat floconos galben-brun de săruri ale bazelor purinice.

Testul cu murexid

Murexidul este un colorant provenit din produsul de oxidare cu HNO_3 concentrat a bazelor purinice și amoniac.

În acest experiment veți hidroliza nucleoproteidele din drojdia de bere și veți identifica

elementele componente.

MOD DE LUCRU

Precauții: Molibdatul de amoniu este toxic, coroziv și iritant. Acidul azotic concentrat este foarte toxic, coroziv și oxidant. Acidul sulfuric este foarte toxic, coroziv și oxidant. Acidul clorhidric concentrate este foarte toxic, coroziv și oxidant.

I. Hidroliza nucleoproteidelor

1. Într-un balon de 100 ml se introduc 5 g drojdie de bere, peste care se adaugă 40 ml soluție H₂SO₄ 5%. La balon se atașează un refrigerent ascendent și se fierbe pe baie de apă timp de 60-90 minute.
2. Hidrolizatul se filtrează la vid pe o pâlnie Buchner.
3. În urma filtrării se obține un lichid limpede din care se vor identifica părțile componente ale acizilor nucleici.

II. Identificarea pentozelor

Testul Bial

Precauții: reactivul Bial este toxic, coroziv, higroscopic, sensibil la lumină și iritant. Manipulați-l la nișă.

4. Într-o eprubetă curată se introduce 5 ml hidrolizat peste care se adaugă 5 picături reactiv Bial și 1 ml HCl conc. Se agită conținutul eprubetei, se astupă cu un dop de vată și se lasă pe o baie de apă la fierbere timp de 10 minute. Notați observațiile în fișa de lucru.

Testul Benedict

Precauții: reactivul Benedict este toxic, higroscopic și iritant.

5. În cea de-a doua eprubetă se introduce 2 ml de reactiv Benedict peste care se adaugă 10 picături de soluție hidrolizat.
6. Se introduce eprubeta într-o baie de apă la fierbere și se scoate după exact 2 minute. Notați observațiile în fișa de lucru.

III. Identificarea acidului fosforic

Precauții: soluția de amoniac este toxică și poate cauza arsuri. Evitați inhalarea vaporilor și ingerarea compusului. Manipulați soluție la nișă. Soluția de molibdat de amoniu este toxică, corozivă și iritantă. Evitați contactul cu ochii, pielea și hainele. Evitați inhalarea

vaporilor și ingerarea compusului.

7. Într-o eprubetă curată introduceți 5 ml soluție de hidrolizat peste care adăugați soluție de amoniac până la reacție slab alcalină (verificare cu hârtia indicatoare de pH).
8. adăugați câteva picături de acid azotic concentrat și 1 ml soluție de molibdat de amoniu.
9. Încălziți eprubeta pe baie de apă la fierbere. Notați observațiile în fișa de lucru.

IV. Identificarea nucleobazelor

Testul cu soluție amoniacală de azotat de argint

10. Într-o eprubetă curată se introduce 2 ml soluție de hidrolizat peste care se adaugă soluție de amoniac până la reacție alcalină (controlul cu hârtia indicatoare de pH).
11. Suspensia se filtrează iar peste soluția obținută în urma filtrării se adaugă 1 ml soluție amoniacală de azotat de argint.
12. Lăsați eprubeta să stea în stativ pentru aproximativ 10 minute. Notați observațiile în fișa de lucru.

Testul cu murexid

Precauții: acidul azotic concentrate este foarte toxic, coroziv și oxidant. Hidroxidul de sodium este toxic și caustic. Evitați contactul cu pielea.

13. 1-2 Picături din soluția de hidrolizat se usucă pe o placă de porțelan pe baie de apă.
14. Cu o baghetă se adaugă o picătură de HNO_3 concentrat.
15. după evaporare se atinge cu o baghetă curată înmuiată în prealabil în amoniac.
16. Observați modificarea de culoare care apare atunci când se adaugă o picătură de soluție de NaOH. Notați observațiile în fișa de lucru.

FIȘĂ DE LUCRU

I. Identificarea pentozelor

observații

Testul Bial

Testul Benedict

II. Identificarea acidului fosforic

Testul cu reactiv molibdenic

III. Identificarea nucleobazelor

Testul cu reactiv molibdenic

Testul cu murexid

ÎNTREBĂRI

1. Ce componente se identifică la hidroliza drojdiei de bere?
2. Cum poate fi pusă în evidență prezența zaharurilor? Dar a bazelor azotate?
3. Desenați structurile ribozei și deoxiribozei în reprezentare Haworth. Evidențiați prezența OH-ului glicozidic.
4. Redați structurile nucleozidelor care se obțin prin cuplarea următoarelor pentoze și baze azotate:

URACIL + RIBOZA = ?

CITOZINA + RIBOZA = ?

TIMINA + DEZOXIRIBOZA = ?

ADENINA + RIBOZA = ?

GUANINA + RIBOZA = ?

5. Definiți următorii termeni:
 - a) pentoză
 - b) nucleoproteide
 - c) nucleozide
 - d) acizi nucleici
6. Mononucleotidele se obțin prin esterificarea nucleozidelor cu acidul fosforic. Dați două exemple.
7. Acizii nucleici ADN și ARN sunt constituiți din molecule de mononucleotide legate una de cealaltă prin intermediul acidului fosforic. Legarea se face prin esterificarea grupării –OH din poziția 3 a ribozei, respectiv deoxiribozei cu acidul fosforic din molecula vecină. Redați componentele care intră în constituția ADN-ului și ARN-ului.

TESTAREA CALITATIVĂ A VITAMINELOR

Scopul lucrării

Utilizarea testelor calitative pentru punerea în evidență a vitaminelor.

Generalități Vitaminele sunt substanțe organice care, în cantități foarte mici, îndeplinesc în organismul animal funcțiuni specifice și vitale. Ele nu produc energie (ca hidrații de carbon sau grăsimile) și nu sunt utilizate ca material plastic pentru construcția celulei (ca proteinele), dar sunt esențiale pentru creșterea și menținerea sănătății omului și a animalelor.

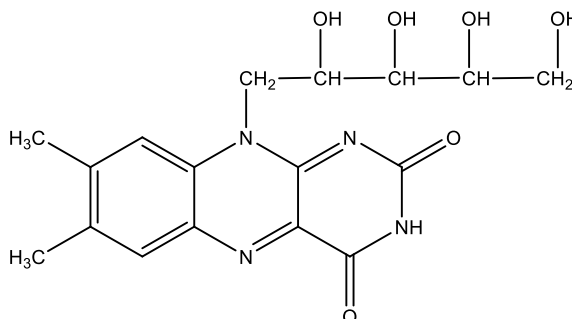
Marea majoritate a vitaminelor sunt sintetizate numai de organismul vegetal. Organismul animal și uman ia aceste substanțe indispensabile odată cu alimentele vegetale, fie sub forma de vitamine propriu-zise, fie sub forma de provitamine, pe care le convertește apoi în forma activă de vitamine propriu-zise. Lipsa lor din hrană duce la îmbolnăviri grave (avitaminoze). Avitaminozele pot apărea nu numai datorită unui aport insuficient de vitamine sau de provitamine în alimentație, ci și unui defect de utilizare a acestora, ca de exemplu unei deficiențe de rezorbție sau a unei deficiențe a organismului de a transforma provitaminele în vitamine.

În condiții normale de alimentație, necesarul omului sănătos este pe deplin acoperit printr-o hrană variată. De obicei, unul și același aliment este bogat numai într-o singură vitamină: de exemplu – morcovul – în caroten; citricele – în vitamina C și P; carnea – în acid nicotinic, etc. Drojdiile conțin multe vitamine, însă utilizarea lor este posibilă numai după tratarea termică, deoarece drojdiile vii nu sunt descompuse de enzimele digestive. Unele vitamine intră în compoziția enzimelor și funcționează sub formă de coenzime. O clasificare a lor se face după felul solubilității în apă și în lipide:

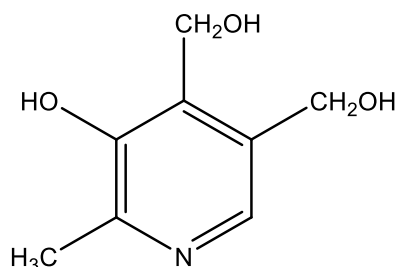
- hidrosolubile (B, C etc.)
- liposolubile (A, D, E, K etc.).

Vitamine hidrosolubile**Bitamina B₂ (riboflavina)**

Vitamina B₂ este larg răspândită în natură, fiind prezentă în toate celulele organismelor vegetale, animale și în microorganisme. Cele mai bogate surse sunt migdalele, alunele, ciupercile, pătrunjelul, țelina. Riboflavina este o substanță cristalină, de culoare galbenă sau galben-portocalie, cu gust amar. Este termostabilă în mediu acid și termolabilă în mediu bazic. Prezintă proprietăți oxido reducătoare importante.

Vitamina B₂**Vitamina B₆ (piridoxina)**

Vitamina B₆ apare în drojdia de bere, ficat, pollen etc. În stare liberă se prezintă sub formă de pulbere cristalină, incoloră, cu gust ușor amar. În mediu acid se comportă ca un fenol. Este sensibilă la acțiunea luminii. Este rezistentă la fierbere la 100°C, atât în mediu acid cât și în mediu bazic.

Vitamina B₆

Identificarea vitaminei se bazează pe reacțiile de culoare pe care le dă cu diferiți reactivi. Astfel, cu FeCl₃ vitamina B₆ dă o colorație roșie; cu reactivul fosfomolibdenic dă o colorație albastră, datorită hidroxilului fenolic prezent.

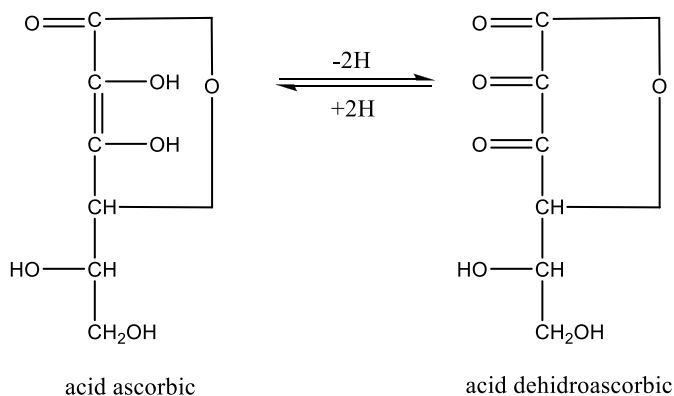
Vitamina C (acidul ascorbic)

Vitamina C se mai numește și acidul ascorbic sau vitamină antiscorbutică. Este cea mai răspândită și mai bine cunoscută vitamină, în lipsa căreia din hrană apare la oameni boala numită scorbut. Are o largă răspândire în natură, fiind biosintetizată atât de organismele vegetale cât și de cele animale (cu excepția omului, maimuței și cobaiului), cât și de numeroase microorganisme. Se poate obține prin extragerea din diferite surse

vegetale cum sunt fructele citrice, ardeii verde, cojile verzi ale nucilor, coacăze negre, frunze de trandafir etc. Vitamina C are un rol foarte important în organism deoarece are un pronunțat caracter antioxidant.

Acidul ascorbic este o substanță solidă, se prezintă sub formă de pulbere albă cristalină, fără miros și cu gust acru. Este o substanță optic activă dextrogiră. Este ușor solubilă în apă și metanol, greu solubilă în alcool etilic, acetonă și glicerină.

Amidul C are formula $C_6H_8O_6$ cu următoarea structură:



Principala proprietate este caracterul său puternic reducător, adică ușurința cu care se poate oxida. Puterea reducătoare mare se datorește existenței în moleculă a grupării endiol de la carbonii 2 și 3.

Acidul ascorbic prezintă unele reacții caracteristice glucidelor. Reduce sărurile de cupru și argint și dă reacție pozitivă cu α -naftolul (reacția Molisch). Dă un compus violet cu clorura ferică. Reacționează cu dinitrofenilhidrazina și formează osazone de culoare roșie.

Acidul ascorbic reacționează cu ionii unor metale (Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+}) cu formare de săruri (ascorbați) solubile în apă. Ascorbatul de plumb este insolubil în apă și etanol, proprietate pe care se bazează metodele de izolare a acidului ascorbic din extractele vegetale.

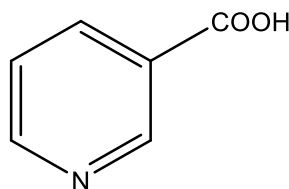
Vitamina PP (acid nicotinic)

Vitamina PP este cunoscută și sub denumirea de vitamină antipelagrosă. Lipsa acesteia din alimentația omului conduce la boala denumită pelagra, care se manifestă prin tulburări cutanate, digestive și nervoase.

Se găsește atât în organismele vegetale cât și în cele animale. Există totuși surse vegetale, ca drojdia de bere, care conțin o cantitate mai mare de acid nicotinic, fapt ce a determinat utilizarea acestor surse în tratamentul pelagrei.

Acidul nicotinic este o substanță solidă, se prezintă sub formă de cristale incolore, fără miros, cu gust slab acru. Este puțin solubil în apă și alcool la rece, dar mai solubil la cald. Este greu solubil în solvenți organici. Este considerată una dintre cele mai stabile vitamine, sub aspect farmaceutic.

Vitamina PP

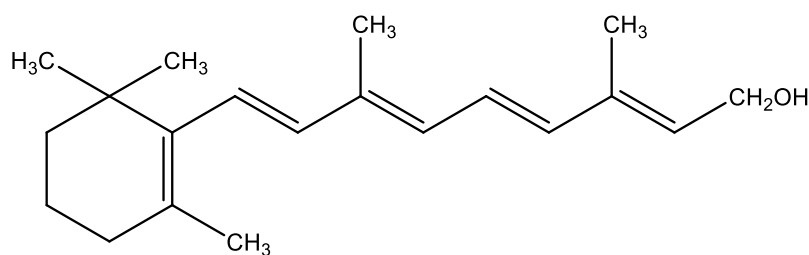


Fiind un compus piridinic, vitamina dă reacții caracteristice de culoare. Astfel, reacționează cu 2, 4-dinitrobenzenul și formează compuși colorați în roșu-violet.

Vitamine liposolubile

Vitamina A₁ (retinol)

Vitaminele A sunt indispensabile în procesul vederii, au rol însemnat în protejarea vindecarea și funcționarea țesuturilor epiteliale, în creșterea și reproducerea organismelor animale etc. Se găsesc atât în regnul animal, cât și în cel vegetal. Cele mai bogate surse de origine animală sunt uleiul de pește respectiv ficatul, untul și ouăle. Cele mai importante surse de carotenoide provitaminice A le constituie morcovii, fructele de cătină și măceșele, citricele, spanacul și varza, ardeiul și polenul etc. Dintre acestea, cea mai importantă și mai larg răspândită este vitamina A₁, care se mai numește retinol, un alcool cu următoarea structură:

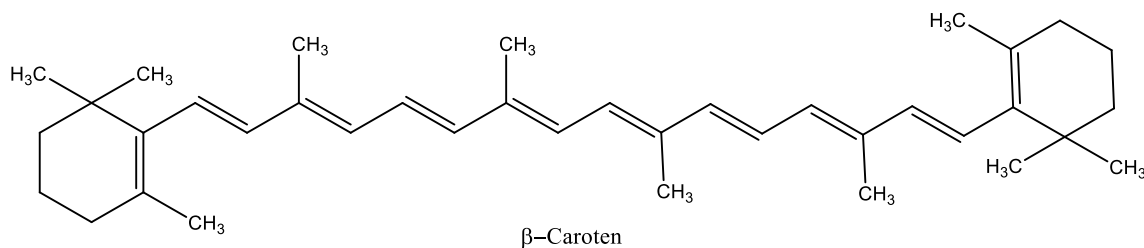


vitamina A₁ (retinol)

În stare pură, vitamina A₁ se obține sub formă de cristale lamelare de culoare galbenă. Este insolubilă în apă dar solubilă în grăsimi, uleiuri, solvenți organici (chloroform, acetonă, benzene, ciclohexan). Vitamina A₁ este o substanță autooxidabilă, termostabilă în lipsa aerului, foarte sensibilă la acțiunea oxidanților și a luminii, în special a radiațiilor ultraviolete. Degradarea ușoară sub acțiunea luminii, oxigenului și căldurii se datorează dublelor legături conjugate pe care le conține.

În soluție cloroformică, vitamina A₁ dă cu clorura de stibiu colorație albastră.

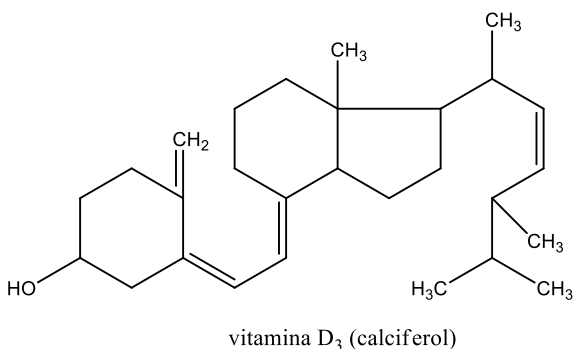
Pigmenții carotenoidici reprezintă singura sursă naturală din care omul și animalele își pot sintetiza vitaminele A, cu rol în formarea pigmentilor fotosensibili implicați în procesul vederii. Principala carotenoidă provitaminică A o constituie β-carotenul.



Dintr-o moleculă de β-caroten se pot obține maxim două molecule de vitamina A₁.

Vitamina D (calciferol)

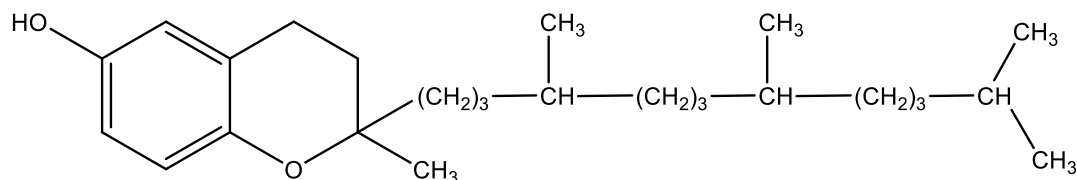
Vitaminele D (D₂-D₇) sunt substanțe organice care derivă de la steroli. Ele se găsesc în natură atât în stare liberă (în special în alimente de origine animală), cât mai ales sub formă de provitamine (steroli) (în organismele vegetale). Toate vitaminele D derivă de la steroli, având același schelet de bază.



Vitamina D₂ se prezintă sub formă de cristale incolore, fără gust și miros. Se distruge ușor în mediu puternic acid.

Vitamina E

Vitaminele E se mai numesc și tocoferoli sau vitaminele antisterilității. Ele sunt biosintetizate numai în organismele vegetale, în special în frunze, muguri, semințe în stare de germinație, polen. Au un caracter oxidant puternic. Tocoferolii sunt substanțe uleioase, de culoare galben-deschis.



Prezentând un nucleu benzenic și, legat de acesta, o grupare oxidril, ca și fenolii, vitamina E dă reacție pozitivă cu clorura ferică.

MOD DE LUCRU

Precauții: Acizii sulfuric și clorhidric concentrați sunt este toxici și corozivi. Evitați contactul cu ochii și pielea. Clorura ferică este toxică și corozivă. Soluțiile de amoniac și acid acetic sunt toxice și iritante. Evitați inhalarea vaporilor.

I. Vitamine hidrosolubile***Vitamina B₂***

1. Într-o eprubetă curată introduceți 2 ml soluție de riboflavină peste care adăugați în picături acid clorhidric concentrat până când pH-ul scade la 3.
2. Notați observațiile în fișa de lucru.

Vitamina B₆

3. Într-o eprubetă curată introduceți 0,5 ml soluție de vitamină B₆ 1% peste care adăugați 0,5 ml soluție clorură ferică 1%.
4. Agitați conținutul eprubetei. Notați observațiile în fișa de lucru.

Vitamina C

5. Într-o eprubetă curată introduceți 1-2 ml soluție de azotat de argint 5%, peste care turnați soluție de amoniac până la dizolvarea completă a precipitatului.
6. Adăugați 2 ml soluție de vitamina C și încălziți pe baie de apă. Notați observațiile în fișa de lucru.

Identificarea vitaminei C din alimente

7. O picătură de zeamă de la o lămâie se lasă să cadă pe hârtia albastră de diclorfenol-indofenol. Se formează o pată albă, având în jurul ei un inel roșu, ceea ce indică prezența vitaminei C. mărimea petei albe arată și cantitatea de acid ascorbic conținut în fruct.

Vitamina PP

8. Într-o eprubetă curată introduceți 2 ml soluție de vitamină PP 3% în soluție de acid acetic 10 %.
9. Încălziți conținutul eprubetei pe o baie de apă la fierbere până când se obține o soluție limpede.
10. Adăugați 2 ml soluție de acetat de cupru 5% agitată în prealabil.
11. Încălziți din nou la fierbere.
12. Notați observațiile în fișa de lucru

Vitamine liposolubile**Vitamina A**

13. Într-o eprubetă curată introduceți două-trei picături de soluție uleioasă de vitamina A.
14. Adăugați o picătură de acid sulfuric concentrat. Notați observațiile în fișa de lucru.

Identificarea vitaminei și provitaminei în rădăcină de morcov

15. O bucățică de rădăcină de morcov se strivește cu spatula pe o hârtie de filtru, astfel ca zeama să fie absorbită de hârtie, după care se usucă la o flacără. Peste pata formată se lasă să cadă o picătură de soluție de clorura de stibiu. Notați observațiile în fișa de lucru.

Vitamina D

16. Într-o eprubetă curată introduceți 1 ml soluție de vitamina D și 4-5 ml picături anilină în acid clorhidric concentrat.
17. Agitați conținutul eprubetei. Notați observațiile în fișa de lucru.

Vitamina E

18. Într-o eprubetă se toarnă 1 ml soluție uleioasă de vitamina E, peste care se adaugă 4-5 picături de clorura ferică.
19. Agitați conținutul eprubetei. Notați observațiile în fișa de lucru.

FIȘĂ DE LUCRU**I. Vitamine hidrosolubile**

<i>vitamina</i>	observații
-----------------	------------

vitamina B₂vitamina B₆

vitamina C

vitamina PP

II. Vitamine liposolubile

<i>vitamina</i>	observații
-----------------	------------

vitamina A

vitamina D

vitamina E

ÎNTREBĂRI

1. Dati câte două exemple de vitamine hidrosolubile și liposolubile.
2. Explicați termenii: hidrosolubil, liposolubil.