



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

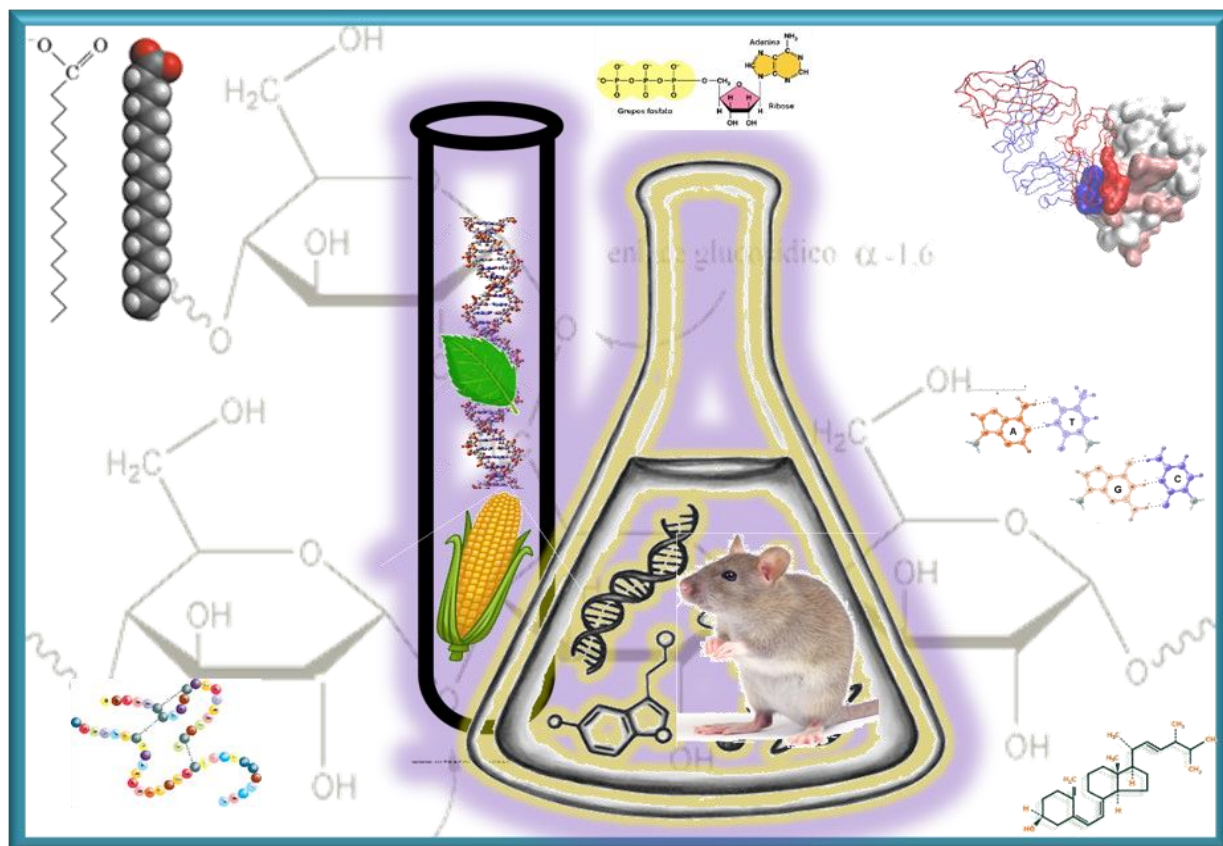
SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

CLAVE CARRERA:10532 CLAVE ASIGNATURA:1618

PAPIME PE 205615

Bioquímica Estructural

Manual de Prácticas de Laboratorio



NOMBRE ALUMNO: _____

SEMESTRE: 2026-I

GRUPO: _____

EQUIPO: _____

Revisión Agosto 2025



ÍNDICE

	Página
Introducción.....	3
Objetivos generales de la asignatura.....	4
Cronograma.....	5
Reglamento.....	6
Relación de las actividades experimentales con el programa de la asignatura.....	8
Criterios de evaluación.....	9
Accidentes más frecuentes en el laboratorio. Primeros auxilios.....	12
Manejo de residuos en el laboratorio de bioquímica.....	15
Equipo de protección y material de uso común.....	20
Practica 1. pH en sistemas biológicos.....	21
Practica 2. Manejo y cuidado del microscopio.....	30
Practica 3. Homogeneización, centrifugación y cromatografía.....	41
Practica 4. Espectrofotometría y electroforesis.....	51
Practica 5. Reacciones de identificación de carbohidratos.....	58
Practica 6. Extracción, separación e identificación de lípidos.....	68
Practica 7. Titulación de aminoácidos.....	76
Practica 8. Cuantificación de proteínas y factores que alteran la solubilidad proteica.....	82
Practica 9. Cinética enzimática	89
Practica 10. Extracción de DNA.....	102



INTRODUCCIÓN

El curso práctico de la asignatura de *Bioquímica Estructural para Químicos* abarca una serie de prácticas que en conjunto pretenden dar al estudiante un panorama básico y general tanto de algunos métodos analíticos específicos que se utilizan para el estudio de biomoléculas, así como, de propiedades físicas y químicas de las mismas.

La metodología que se desarrolla en cada práctica es sencilla, sin aparatos sofisticados ni costosos, además los reactivos y soluciones que se utilizan en su mayoría son fáciles de conseguir. Lo anterior pretende que con experiencias simples el alumno comprenda los principios de la estructura y función de las moléculas biológicas.

Las prácticas para *Bioquímica Estructural* se dividen en dos partes. La primera consta de: pH, Microscopía, Métodos de Separación, Purificación, Identificación y Cuantificación de uso más frecuente en la Bioquímica, que en conjunto dan al estudiante una visión del tipo de técnicas que se utilizan para el estudio de las diversas moléculas biológicas. En esta parte se revisan metodologías como: homogeneización, centrifugación, cromatografía en papel y columna, así como espectrofotometría y electroforesis en papel.

La segunda parte incluye las siguientes prácticas: carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas, cinética enzimática y ácidos nucleicos. Estas prácticas están relacionadas con las diversas biomoléculas de la naturaleza y en ellas se prueban métodos de extracción y se comprueban algunas propiedades físicas y químicas de las moléculas que se estudian en el curso, así como el trabajo que algunas de ellas son capaces de realizar.



OBJETIVO GENERALES DE LA ASIGNATURA

Comprender las bases moleculares de los organismos vivos, así como, la estructura química, propiedades y función de las biomoléculas

OBJETIVO DEL CURSO EXPERIMENTAL

Aplicar métodos para la separación, purificación y cuantificación de biomoléculas, así como pruebas de determinación de las propiedades físicas y químicas de las mismas, para adquirir un panorama general del trabajo que se realiza para el estudio moléculas de importancia biológica.



CRONOGRAMA 2026-II

GRUPO	PROFESORES DE LABORATORIO
2651	Q. Karla Paola Hernández Pérez; Dra. Jessica Georgina Filisola Villaseñor; M en TDE. Imelda Jaramillo Ugarte.
2601	QFB. Gabriela Escalante Reynoso; IA. Miriam Álvarez Velasco; QFB Nydia Berenice González Angeles.
2602	IA. Miriam Álvarez Velasco; Dra. Jessica Georgina Filisola Villaseñor; M en TDE. Imelda Jaramillo Ugarte

SEMANA	FECHAS	ACTIVIDAD
1	03-05/02/26	-----
2	10-12/02/26	-----
3	17-19/02/26	Inscripción / Presentación
4	24-26/02/26	pH en Sistemas Biológicos
5	03-05/03/26	Manejo y Cuidado del Microscopio
6	10-12/03/26	Homogenización Centrifugación y Cromatografía
7	17-19/03/26	Espectrofotometría y electroforesis
8	24-26/03/26	Reacciones de identificación de carbohidratos
9	07-09/04/26	Extracción, separación e identificación de lípidos
10	14-16/04/26	Titulación de aminoácidos
11	21-23/04/26	Cuantificación de Proteínas y Factores que alteran su solubilidad
12	28-30/04/26	Seminario: Proteínas y Enzimas
13	05-07/05/26	Cinética Enzimática
14	12-14/05/26	Extracción de DNA
15	19-21/05/26	Examen final
16	26-28/05/26	Entrega de calificaciones



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

1. Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
2. Para todo trabajo realizado en el laboratorio, sobre la vestimenta se deberá utilizar bata blanca, con manga larga completamente abotonada, calzado cerrado o la vestimenta adecuada en cada laboratorio, así como traer el equipo de protección personal y el material requerido para la realización de la práctica.
3. La persona que use el pelo largo, deberá recogerlo, por seguridad.
4. La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir del horario indicado para el inicio de la práctica.
5. Por seguridad, las puertas del laboratorio se mantendrán sin llave durante las prácticas y en caso de siniestro se deberán atender obligatoriamente las indicaciones de evacuación del personal de protección civil y/o brigadistas.
6. En todo momento se mantendrá una conducta de orden y disciplina en el área de trabajo.
7. Es obligación de todos para el buen funcionamiento de las prácticas, mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo.
8. Queda prohibido en los laboratorios:
 - a) El ingreso a toda persona que no porte los elementos personales de protección mínimos requeridos.
 - b) Tirar basura fuera del cesto.
 - c) Ingerir alimentos y/o bebidas.
 - d) Fumar.
 - e) Recibir visita.
 - f) Colocar en las puertas de acceso o salida de emergencia cualquier objeto que imposibilite la evacuación.
 - g) La entrada a los inter-laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
 - h) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
 - i) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
 - j) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
 - k) Mover el mobiliario de su lugar.

- l) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la



- asignatura.
- m) Usar gorra ajena a las actividades de laboratorio.
- n) El uso de audífonos y/o cualquier aparato o dispositivo electrónico ajeno al propósito de las actividades que se realicen.
9. Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiendo por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).
 10. El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente uno de los profesores del grupo.
 11. El uso del laboratorio para clases teóricas deberá cumplir con los incisos 2, 6 y 7 del presente reglamento y registrarlo en la bitácora.
 12. El uso del laboratorio para trabajo extraordinario deberá programarse con el profesor responsable en un horario que no interfiera con el destinado para el desarrollo de las prácticas y registrarlo en la bitácora.
 13. Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno firme el vale de material, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.
 14. El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibirlo indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió.
 15. A la persona que, por su negligencia o descuido inexcusable, cause daños al laboratorio, materiales o equipo, deberá cubrir los gastos que se generen con motivo de la reparación y/o reposición.
 16. Los usuarios de laboratorios que sean sorprendidos haciendo uso indebido de equipos, sustancias, materiales, instalaciones, y demás implementos, serán sancionados conforme a la legislación universitaria que le corresponda, según la gravedad de la falta cometida.
 17. El incumplimiento a estas disposiciones faculta al responsable para que instruya la salida del infractor y en caso de resistencia, la suspensión de la práctica.

A t e n t a m e n t e
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 5 de agosto del 2024

VoBo Comité de Calidad de Ciencias Biológicas



RELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXPERIMENTALES CON EL PROGRAMA DE LA ASIGNATURA

PRÁCTICA DE LABORATORIO		UNIDAD TEMÁTICA EN EL PROGRAMA DE LA ASIGNATURA
NÚMERO	TÍTULO DE PRÁCTICA	
1	PH EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	UNIDAD 1. BASES MOLECULARES DE LOS ORGANISMOS VIVOS.
2	MANEJO Y CUIDADO DEL MICROSCOPIO	UNIDAD 2. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LAS BIOMOLÉCULAS.
3	HOMOGENEIZACIÓN, CENTRIFUGACIÓN Y CROMATOGRAFÍA	UNIDAD 2. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LAS BIOMOLÉCULAS.
4	ESPECTROFOTOMETRÍA Y ELECTROFORESIS	UNIDAD 2. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LAS BIOMOLÉCULAS.
5	REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS	UNIDAD 3. CARBOHIDRATOS
6	EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS	UNIDAD 4. QUÍMICA DE LOS LÍPIDOS
7	TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS	UNIDAD 5. QUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS
8	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES QUE ALTERAN LA SOLUBILIDAD PROTEICA	UNIDAD 5. QUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS
9	CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA UREASA	UNIDAD 6. CATALIZADORES BIOLÓGICOS.
10	EXTRACCIÓN DE DNA	UNIDAD 7. QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS



CRITERIOS DE EVALUACIÓN

La evaluación del curso consiste en el 70% de teoría y 30% de laboratorio, se requiere el 80% de asistencia a la teoría y al laboratorio.

La evaluación del laboratorio se hará de acuerdo con lo siguiente:

75 %	PROMEDIO DE PRÁCTICAS
10 %	SEMINARIO
15 %	EXAMEN FINAL

ASISTENCIA. Es requisito indispensable para acreditar el laboratorio, tener el 80% del total de prácticas y demás actividades realizadas y aprobadas.

PUNTUALIDAD. De acuerdo al reglamento, se dará una tolerancia de **10 minutos** para la entrada a la práctica. Es obligación de todos estar desde a la hora de inicio de la sesión.

PROMEDIO DE PRÁCTICAS. Para obtener el promedio de cada práctica se consideran: la evaluación previa, el trabajo en el laboratorio y el reporte.

INVESTIGACIÓN PREVIA. Es un trabajo de investigación que se realiza previo a cada práctica. No se entrega, aunque al entrar a la sesión, su asesor pedirá que se lo muestre junto con el diagrama metodológico del trabajo práctico de la sesión, es un trabajo individual que deberá realizarse en el manual de prácticas, en el reverso de las hojas de la práctica correspondiente. Durante el desarrollo de la práctica su asesor revisará la calidad y contenido de ambos.

EVALUACIÓN PREVIA. Se realiza al inicio de cada sesión y consiste en un examen de 5 preguntas de respuestas rápidas y concretas acerca de la investigación previa, o bien de la metodología a seguir durante la práctica. Únicamente será válido si se escribe con tinta negra o azul en el formato de la práctica correspondiente proporcionado en el manual.

TRABAJO EN EL LABORATORIO. El trabajo de laboratorio se evalúa con una lista de cotejo con rúbrica, de acuerdo al desarrollo que cada alumno tiene durante la práctica y el conocimiento que tengan del trabajo a realizar. Se consideran las participaciones que el alumno tenga durante la explicación de la práctica y las respuestas que den a las preguntas formuladas por su asesor durante el trabajo práctico. Los puntos específicos a evaluar serán explicados con detalle durante la presentación del curso.



REPORTE. Este es un trabajo de gran importancia, el formato deberá descárgalo de la página

<https://bioquimicafesc.wixsite.com/bqyfh/documentos>

Se entrega una semana después de realizada la práctica, si el calendario marca inhábil debe ponerse de acuerdo con los profesores para su entrega en esa semana. Se debe entregar al entrar al laboratorio, solo se recibe durante los primeros 30 minutos de la sesión experimental.

PRESENTACIÓN: VALOR 1.0 Cuidar letra, ortografía, limpieza y orden. Todo se debe escribir con tinta negra o azul marino, los dibujos se hacen a color y deberá entregarse engrapado.

CARÁTULA: únicamente llenar los datos que se solicitan en el formato. NO modificar NADA, La calificación se registra únicamente a aquellos alumnos cuyo nombre aparezca en el reporte.

OBJETIVO: VALOR 1.0 Deben plantear su propio objetivo general que responda a las preguntas: ¿qué?, ¿cómo? y ¿para qué?

FUNDAMENTOS VALOR 1.0 En este apartado se pedirán los fundamentos correspondientes al trabajo experimental realizado, deben usar esquemas en el caso de los aparatos y en el caso de las reacciones escribir las estructuras y fórmulas escribiendo as ecuaciones químicas que se llevan a cabo.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS: VALOR 2.0. Esta es una parte muy importante del reporte, no se debe omitir nada.

Los resultados se anotarán en el espacio destinado para ellos en el formato de reporte, así como en su manual de prácticas. No olvide anotar pesos, volúmenes, cambios de color, temperatura y cualquier dato obtenido durante el desarrollo de la práctica.

Se debe describir todo lo que se haya observado, por ejemplo: si se hizo reaccionar A con B, si se observó un cambio de color, de apariencia, temperatura, o si no hubo cambio aparente, etc. Todo es importante por lo que se deben tener alerta todos los sentidos. Si se utiliza el microscopio se debe realizar un dibujo lo más cercano a lo observado.

Cálculos y gráficos: En caso de que la práctica lo requiera se realizarán los cálculos correspondientes, de forma perfectamente clara y completa. Los gráficos deben hacerse en papel milimétrico anotando en cada coordenada la propiedad que se está representando con sus unidades respectivas.

Se debe cuidar la escala y no olvidar poner al gráfico nombre completo que permita su identificación.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS: VALOR 3.0 En esta parte deberán completar las ecuaciones, formulas y datos que se piden en el formato.

Deberán responder todas las preguntas planteadas al final de cada práctica, generando los párrafos necesarios trabajando en equipo y argumentando bioquímicamente sus respuestas, es necesario que anoten las reacciones químicas con fórmulas, las estructuras, este apartado es la explicación química de los resultados obtenidos uno por uno

CONCLUSIONES VALOR 1.0: Para escribir las conclusiones se deben considerar los resultados que se obtuvieron en la práctica junto con el análisis que se hizo para cada uno de ellos y los objetivos específicos del trabajo, además se debe tomar la precaución de no citar ningún autor.

Se debe ser muy claro y breve en cuanto a señalar que las conclusiones están referidas a tal objetivo, además se debe ser enfático, seguro de lo que se afirma y se presentan como sentencias. Por ejemplo: **“se logró identificar.....” o se extrajo __x_ proteína” o “, de forma que con solo leer las conclusiones se pueda estar al tanto de lo que se hizo y los logros obtenidos.**

REFERENCIAS VALOR 1.0: Las referencias consultadas para la realización del reporte serán las que tienen en su investigación previa los integrantes del equipo o bien aquellas que consultaron para los fundamentos teóricos, reacciones, fórmulas, etc., tomando en cuenta libros (no menos de 3 en cada práctica), páginas de internet, artículos, etc. y reportarse de acuerdo a normas internacionales.

LIBRO

Hackett, W. y Robbins, G. (1992). *Manual de Seguridad y Primeros Auxilios*. México, D.F: Alfaomega.

ARTICULO

Cintrón, G., Lugo, A. E., Pool, D. J. & Morris, G. (1978). Mangroves of arid environments in Puerto Rico and adjacent islands. *Biotropica*, 10(2),110-121.

PAGINA DE INTERNET

Carroll, L. & Gilroy, P. J. (2002). Transgender issues in counselor preparation. *Counselor Education & Supervision*, 41, 233-242. Recuperado de <http://www.counseling.org>

EXAMEN FINAL. Al término de las actividades programadas para el semestre los alumnos realizan un examen en el que se incluyen preguntas de todas las prácticas.

SEMINARIOS. Se lleva a cabo la presentación de seminarios de temas que asignan los asesores, quienes además les dan indicaciones de cómo realizar la exposición.



ACCIDENTES MAS FRECUENTES EN EL LABORATORIO. PRIMEROS AUXILIOS

TRATAMIENTO URGENTE DE HERIDAS

Las heridas pequeñas de las que no sale mucha sangre se desinfectan lavándolas con agua oxigenada, alcohol o tintura de yodo, después se tapan colocando la gasa y finalmente, se cubre con una venda.

Cuando existen hemorragias importantes conviene seguir estos pasos: compresión inmediata del vaso sangrante, sobre la herida con los dedos perfectamente limpios o con un pañuelo. Elevación de la parte afectada. Si se controla la hemorragia, se aplica un apósito fuertemente aunque no tanto que detenga la circulación del miembro. Cuando la hemorragia continúa posiblemente sea necesario realizar una compresión digital en el trayecto del vaso sangrante por encima de la herida o aplicación de un torniquete; el mejor método de aplicación de un torniquete consiste en una venda de goma enrollada varias veces sobre una zona ancha por encima de la herida, pero próxima a ella (5 a 10 cm). Cada quince minutos conviene aflojar el torniquete durante unos segundos y se vuelve a apretar.

En cualquier caso las indicaciones anteriores son para primeros auxilios, después de lo cual es muy importante canalizar al herido a que reciba atención medica.

TRATAMIENTO URGENTE DE QUEMADURAS

Las quemaduras leves (de primer grado) producidas por fuego u objetos calientes y quemaduras producidas por agentes químicos. Las quemaduras de segundo grado (formación de ampollas) y las de tercer grado (destrucción de la capa superficial de la piel) requieren la atención inmediata del medico.

Las quemaduras leves producidas por objetos calientes o fuego se tratan con disolución acuosa o alcohólica muy diluida de ácido pícrico, con dermatol o con vaselina y se vendan después. Para tratar quemaduras con sulfamidas se deben tomar precauciones, debido a que hay personas que presentan alta sensibilidad a estos medicamentos.

Las quemaduras con reactivos químicos requieren retirar rápidamente las ropas contaminadas y lavar repetidamente la zona afectada con grandes cantidades de agua. Si la quemadura se produjo por un ácido, posterior al lavado con agua conviene realizar otro

con solución de bicarbonato de sodio, para asegurar la neutralización; si la quemadura se produjo por álcalis la neutralización se efectúa con disolución de ácido bórico.

Si la quemadura se produjo por salpicadura en los ojos, éstos deben lavarse inmediatamente con mucha agua y posteriormente debe acudir al oftalmólogo.



TRATAMIENTO URGENTE DE LA ASFIXIA Y ELECTROCUCIÓN

Los síntomas de asfixia se manifiestan por el tono azulado que adquieren los labios y los lóbulos de las orejas; la pérdida del conocimiento y la interrupción de la respiración. Debe situarse a la víctima al aire libre y practicarse la respiración artificial.

Los síntomas de la electrocución son la pérdida del conocimiento, la interrupción de la respiración y las quemaduras en el punto de contacto con el cable eléctrico. Lo primero es el rescate del herido y su aislamiento eléctrico. Después se le aplica respiración artificial y se tratan las quemaduras.

TRATAMIENTO DE LAS INTOXICACIONES MÁS FRECUENTES

Generalmente lo mejor es intentar que la víctima vomite bebiendo agua tibia o con una solución de sulfato de cobre al 0.2%. También se puede provocar por estimulación de la garganta con un dedo.

En la siguiente tabla aparecen los venenos más comunes, las precauciones y antídotos que se deben tomar:

INTOXICACIONES MÁS FRECUENTES

SUBSTANCIA	PROPIEDADES Y ACCIÓN	PRECAUCIONES Y ANTÍDOTOS
Ácidos (HCl, HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , etc.)	Corrosivos	Los ácidos concentrados se manejan preferentemente con guantes y gafas. Las quemaduras se lavan con agua y con solución de bicarbonato. Si han sido bebidos se debe tomar agua con bicarbonato o magnesia.
Álcális	Corrosivos	Las quemaduras se lavan con agua y con solución de ácido bórico o acético al 2%. Si se han respirado vapores de amoníaco concentrado se bebe ácido acético al 1% y se tragan trocitos de hielo en reposo absoluto.
Arsénico, arsenamida, fosfamina	Muy venenosos. Los vapores de fosfamina y arsenamida son mortales.	Usar guantes y mascarilla para su manejo. Tomar aire fresco. Beber agua salada y caliente.
Ácido cianhídrico. Cianuro de potasio	Los vapores de HCN son mortales. También se produce envenenamiento a través de la piel.	Usar mascarilla para su manejo. Beber disolución de permanganato de potasio o sulfato ferroso al 0.2%. Aplicar respiración artificial de ser posible con oxígeno. Tomar café concentrado como vomitivo. Llamar enseguida al médico.



Cloro, Bromo y vapores de ácido clorhídrico	Corrosivos	Oler amoníaco diluido, alcohol o éter. Aplicar lavados con solución de tiosulfato de sodio.
Derivados halogenados	Dolores de cabeza. El tetra cloro etano ataca al hígado.	Usar mascarilla para su manejo.
Éter	Narcótico	Respiración artificial. Si ha sido bebido utilice vomitivos. Beber solución de carbonato de sodio
Fenol	Corrosivo. Enfermedades de la piel. Cancerígeno	Usar guantes de plástico para su manejo. Mucho aire. Solución de sulfato de sodio
Ácido fluorhídrico	Corrosivo y venenoso	Lavar la piel con amoníaco al 3%. Para los ojos seguir tratamiento para ácidos. Inhalar amoníaco diluido
Fósforo	Venenoso	Beber grandes cantidades de solución de sulfato de cobre al 0.2%. Evite el uso de aceite.
Fosfogeno	Venenoso	Usar mascarilla para su manejo. Inhalación de oxígeno. Reposo. No aplicar respiración artificial.
Gases nitrosos	Venenosos	Inhalar oxígeno. Respirar amoníaco diluido.
Mercurio y sus compuestos	Vapores perjudiciales	Tomar vomitivos. Leche, solución de tanino.
Monóxido de carbono	Venenoso. Mortal	Aire fresco. Respiración forzada, oxígeno si es necesario.
Sulfato de dimetilo	Venenoso	Usar guantes de plástico para su manejo. Lavar la piel con agua y jabón. En caso de haberlo respirado, inhalar vapores de amoníaco diluido y beber solución de bicarbonato.
Sulfuro de carbono	Venenoso	Aire fresco.
Acido sulfhídrico	Venenoso	Aire fresco. Respiración forzada, inhalación de oxígeno si es necesario.

MANEJO DE RESÍDUOS EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

En el laboratorio de bioquímica igual que en la mayoría de los laboratorios donde se realizan prácticas se manejan una cantidad de productos y se efectúan diversas actividades experimentales que conllevan a la generación de residuos que en la mayoría de los casos son peligrosos para la salud y el medio ambiente. Aunque el volumen de residuos que se



generan en los laboratorios de docencia, es pequeño en relación al proveniente del sector industrial, no por ello se debe minimizar el problema.

Las condiciones de trabajo adecuadas en un laboratorio, incluyen el control, tratamiento y eliminación de los residuos generados en el mismo, lo cual disminuye los riesgos potenciales en la salud que normalmente se corren al trabajar con agentes químicos; por lo que su gestión es un aspecto imprescindible en la organización de todo laboratorio. La minimización, eliminación y reducción de los residuos generados, almacenados o descargados y el almacenamiento y tratamiento de los residuos químicos peligrosos, es una actividad que cada vez esta adquiriendo mayor importancia en todas las instituciones dedicadas a la enseñanza, y cada uno de los laboratorios en los que se imparten prácticas, se esta haciendo responsable de promover un manejo adecuado de los residuos que generan para posteriormente canalizarlos a los responsables de su tratamiento.

ALGUNOS FACTORES QUE DEBEN TENERSE EN CUENTA PARA SOLUCIONAR EL PROBLEMA SON:

Aplicar permanentemente las Normas de Bioseguridad establecidas para los desechos en el laboratorio.

Tener en cuenta las condiciones de riesgo de algunos residuos.

El incremento de los desechos por el uso de material desechable, como elemento esencial de Bioseguridad.

Información actualizada del manejo adecuado de los desechos.

Integración de la comunidad educativa, en el manejo responsable de los desechos.

RECOMENDACIONES

1. Considerar los desechos como potencialmente peligrosos, por ser el producto de todos los procesos biológicos y químicos.
2. En el manejo de los desechos se deben tener en cuenta tres elementos básicos:

El Individuo
Las acciones Institucionales



La coordinación interinstitucional.

3. Clasificar los residuos en la fuente, utilizando recipientes debidamente marcados y/o bolsas con los códigos de colores respectivos de acuerdo con el tipo de residuo que se vaya a desechar.

BOLSA ROJA: Desechos Anatomopatológicos Residuos que implican contaminación biológica

BOLSA NEGRA: Desechos ordinarios, comunes, no reciclables

BOLSA BLANCA: Material reciclable.

DESECHO BIOLÓGICO

Son aquellos desechos o residuos generados en el diagnóstico, tratamiento, inmunización, producción o pruebas de productos biológicos, que alteran el proceso salud – enfermedad debido a que contienen microorganismos patógenos o que sus características fisicoquímicas pueden ser tóxicas para las personas que tengan contacto con ellos o alteren al Medio Ambiente.


DESECHO QUÍMICO





Son todos los residuos derivados del manejo de productos químicos, que por ser corrosivos, reactivos, tóxicos, explosivos, inflamables y radioactivos, generan efectos nocivos para las personas y el Medio Ambiente.

1. GENERACIÓN DE LOS DESECHOS

La generación de residuos o desechos, esta determinada por la complejidad y la frecuencia de las actividades que se realizan durante el desarrollo de las prácticas en cada uno de los laboratorios, la eficiencia que alcancen en sus tareas los responsables (docentes) de realizar todas las acciones y de la metodología aplicada. Estos factores son útiles para evaluar la generación de residuos en cada práctica, además, son el punto de partida para el dimensionamiento del sistema de manejo.



SÍMBOLO DE PELIGROSIDAD	REACTIVOS	PRECAUCIÓN	MANEJO FINAL REALIZADO CON DIRECCIÓN DE UN PROFESIONAL EXPERTO
 EXPLOSIVO	AGENTES OXIDANTES <ul style="list-style-type: none"> • CROMATOS • PERCLORADOS • NITRATOS • CLORATOS • PERÓXIDOS • ACIDO NÍTRICO 	<ul style="list-style-type: none"> • Manipular en cantidades pequeñas • En caso de derrame, usar <i>Chemizorb</i> o sustancia análoga. • Preparar mezclas para uso inmediato. 	Inactivar con Perexkit o sustancia análoga.
 COMBURENTE	<ul style="list-style-type: none"> • ETILAMINA • PERMANGANATO DE POTASIO • PEROXIDO DE SODIO 	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar todo contacto • Considerar la posibilidad de incendio. • Disponibilidad de extintores. 	Tratamiento especial.
 INFLAMABLE	<ul style="list-style-type: none"> • BUTANO • PROPANO • CARBUROS • HIDRUROS 	<ul style="list-style-type: none"> • Adecuada ventilación. • No usar luz eléctrica sin protección. • Mantener lejos del fuego y las fuentes de calor. • Uso de embase plástico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar eliminarlos en desagüe o vertedero. • Eliminar en recipientes recolectores especiales, cerrados.

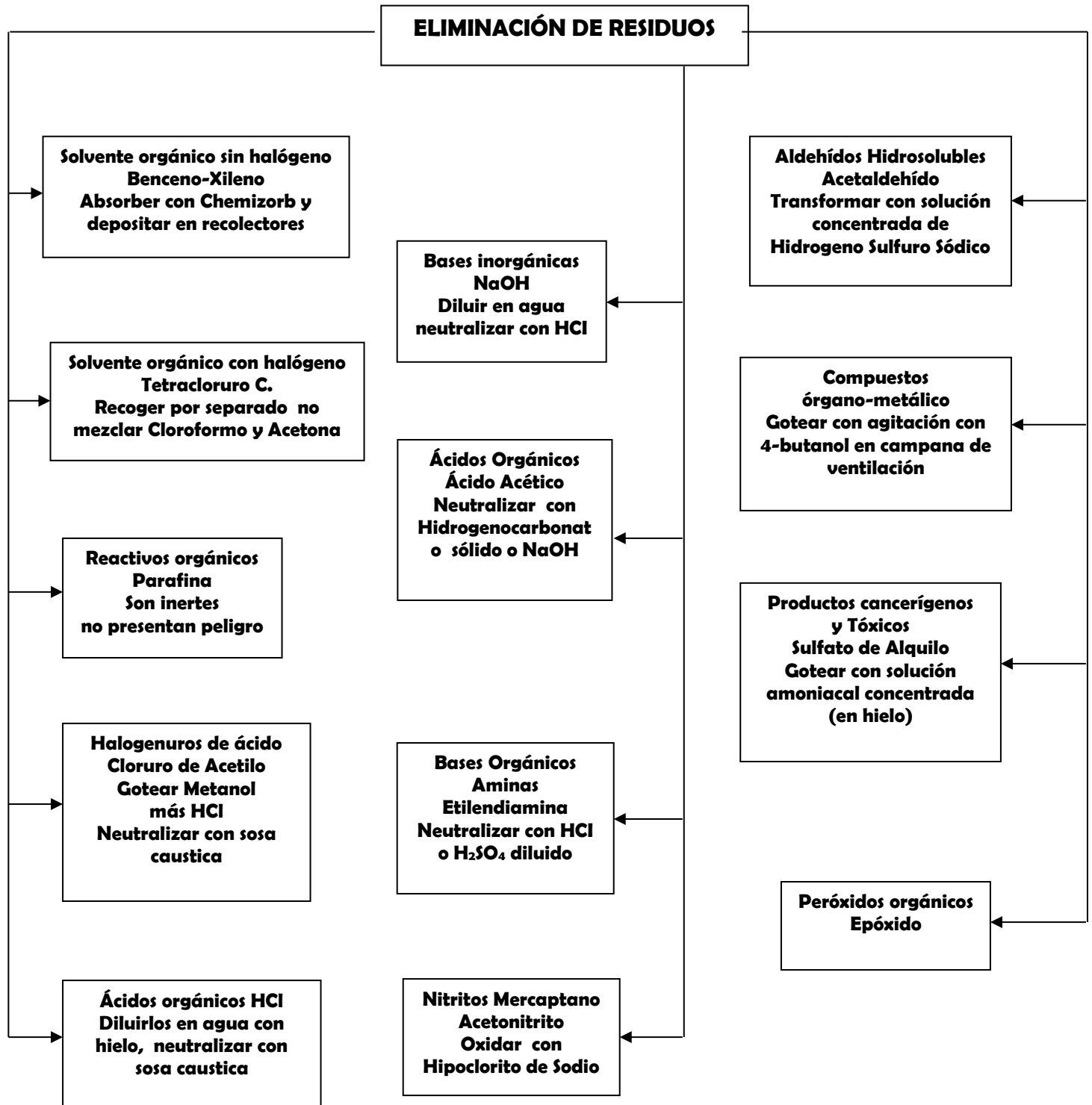
SÍMBOLO DE PELIGROSIDAD	REACTIVOS	PRECAUCIÓN	MANEJO FINAL REALIZADO CON DIRECCIÓN DE UN PROFESIONAL EXPERTO
 TÓXICO	MERCURIO DE ORO	Evitar contacto con el cuerpo humano.	Tratamiento especial.
 CORROSIVO	ACIDOS INORGÁNICOS <ul style="list-style-type: none"> • HCl • H₂SO₄ ALCALIS HIDRÓXIDOS	<ul style="list-style-type: none"> • Adecuada ventilación. • Evitar contacto con ojos, piel y ropa. • No inhalar vapores 	<ul style="list-style-type: none"> • Diluir con grandes cantidades de agua. • Acidos, neutralizarlos con solución de NaOH • Bases, neutralizarlas con solución de HCl.
 NOCIVO	<ul style="list-style-type: none"> • TRICLOROETILEN O • XILENO • SOLUCIÓN DE AMONIACO 	<ul style="list-style-type: none"> • evitar contacto con el cuerpo humano. • No inhalar vapores. 	Diluir con grandes cantidades de agua.
 IRRITANTES	<ul style="list-style-type: none"> • SOLUCIÓN DE AMONIACO. • CLORURO DE BENCILO 	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar contacto con el cuerpo humano. • No inhalar vapores. 	Diluir con grandes cantidades de agua.



DESECHOS	MANEJO INICIAL	MANEJO FINAL
BIOTERIO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN MUERTOS MATERIA FECAL PRODUCTO RESIDUAL DEL LECHO	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Colocar en bolsa roja. ◆ Llevar al sitio de almacenamiento intermedio. <ul style="list-style-type: none"> ◆ Colocar en bolsa roja. 	Enterrar Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.
LAVADO DE MATERIAL CEPAS Y CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS Y MICOLÓGICOS TUBOS Y FRASCOS CON RESTOS DE REACTIVOS QUÍMICOS. RESTOS ANATOMO – PATOLÓGICOS	Eliminación de residuos sólidos previamente esterilizados en bolsa roja. <ul style="list-style-type: none"> ◆ Eliminar cuidadosamente en el vertedero. ◆ Dejar correr abundante agua. Colocar en bolsa roja.	<p style="text-align: center;">Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.</p> <p>MATERIAL REUTILIZABLE</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Colocar en Hipoclorito de Na. al 1% (Sanitización). ◆ Lavar con agua jabonosa. ◆ Enjuagar. <ul style="list-style-type: none"> ◆ Colocar en Hipoclorito de Na. al 1% (Sanitización). ◆ Lavar con agua jabonosa. ◆ Enjuagar. Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.



FLUJORAMA DEL MANEJO DE RESIDUOS QUÍMICOS





EQUIPO DE PROTECCIÓN Y MATERIAL DE USO COMÚN

EQUIPO DE PROTECCIÓN

En cada práctica es requisito indispensable el uso de:

Bata blanca hasta la rodilla de manga larga, en buenas condiciones, limpia y planchada

Cubre bocas nivel 3

Guantes de nitrilo para cirujano

Lentes de seguridad, aun cuando se usen anteojos

MATERIAL DE USO COMÚN

Cada alumno debe contar con:

Manual de prácticas con nombre y engargolado con **pastas en color morado**

Marcador indeleble de punto fino de color oscuro

Lápices de colores

Propipeta

1 Regla

1 Tijeras

Cada equipo de trabajo debe contar con:

1 L de alcohol 96°

1 L de cloro

Detergente líquido para trastes

Escobillón para tubos de ensaye

Escobillón para vasos y matraces

1 Rollo de servitoallas

1 Pinzas de disección

1 Navaja de un solo filo

10 gasas de 10x10 cm

Una franela para el área de trabajo de 50 x 60 cm

2 jergas o franelas (una para secar material y otra para derrames)

5 abatelenguas

5 lancetas

Papel aluminio

1 espátula de cromo-níquel

1 poco de algodón

Cerillos o encendedor

10 Bolsas de plástico chicas para
basura



PRÁCTICA 1

pH EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

Las moléculas presentes en las células vivas, existen y reaccionan en un ambiente acuoso. El agua es fundamental para la vida, solubiliza, modifica y determina las propiedades de las biomoléculas, porque propicia la formación de enlaces débiles entre los grupos funcionales de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. Un sistema acuoso determina también una propiedad muy importante, el pH y la comprensión de los mecanismos homeostáticos mediante los cuales los organismos conservan un ambiente intracelular relativamente constante, incluye la consideración del pH y del amortiguamiento en los líquidos corporales y compartimientos subcelulares. La disociación de los grupos funcionales de las biomoléculas en solución acuosa a diversos valores de pH, es crucial para el correcto desarrollo de las reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar tanto en los seres vivos como, a nivel experimental, en el laboratorio.

El termino pH fue introducido en 1906 por Sorensen, quien lo definió como el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno. Esta definición, si bien no muy estricta, es adecuada para casi todos los propósitos bioquímicos; el pH de una solución que contiene un ácido débil (como lo es el agua) se correlaciona con la constante de disociación de dicho ácido. La interrelación puede establecerse de modo convencional en la ecuación de Henderson-Hasselbach. Las soluciones de ácidos débiles y sus bases conjugadas o bases débiles y sus ácidos conjugados tienen capacidad amortiguadora, lo cual se refiere a la tendencia de una solución a resistir un cambio en el pH después de la adición de un ácido o una base fuertes de manera más eficaz, que un volumen igual de agua.

Ya que los cambios sutiles en el pH de un ácido débil en la vecindad de su pKa modifican de modo significativo las proporciones relativas de sus variantes ionizada y no ionizada, las reacciones intracelulares se amortiguan para minimizar los cambios en el pH. El amortiguamiento también se requiere, ya que el metabolismo produce la liberación y captación de protones. En realidad, un producto final del metabolismo oxidativo es el bióxido de carbono, el anhídrido de ácido carbónico que, de no amortiguarse, acidifica intensamente los líquidos intracelulares. Los mecanismos homeostáticos que conservan el pH intracelular incluyen los amortiguadores fisiológicos, sobre todo el fosfato, bicarbonato y proteínas. Todos aceptan o liberan protones, por tanto, amortiguan o resisten los cambios en el pH.

Cuando se realizan experimentos con extractos de tejidos o enzimas purificadas, el pH se conserva mediante la adición de amortiguadores, como MES, fosfatos, HEPES y TRIS, entre otros.



OBJETIVO

Explicar la función de una solución buffer, por medio de la preparación de un sistema de amortiguamiento y la demostración de su capacidad para oponerse a los cambios de pH, para comprobar la importancia de éstos en los sistemas biológicos.

Extraer las antocianinas de la col mediante un tratamiento térmico, para comprobar su función como indicador ácido base.

INVESTIGACIÓN PREVIA

1. Defina ácido y base, según las teorías de Arrhenius, Brönsted-Lowry y Lewis
2. Concepto de pH. ¿Cómo se calcula? ¿De qué formas se puede medir?
3. ¿Qué es una solución buffer, como está constituida?
4. Escriba la ecuación de Henderson-Hasselbach. ¿Cuál es su utilidad?
5. Describa los sistemas fisiológicos de amortiguamiento de pH. Anote también las reacciones de cada uno y sus valores de pka.
6. Anote la formula, reacción y rango de vire del rojo neutro así como los colores obtenidos en los diferentes valores de pH
7. Describa el fundamento del potenciómetro y las tiras de papel para medir pH.
8. Anote la estructura de las antocianinas y explique porque se comportan como indicadores de pH
9. Anote las fórmulas y colores de las antocianinas en la escala de pH

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
1 aguja para vacutainer
1 tubo para vacutainer con anticoagulante
Un trozo pequeño de col morada

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACION
Na ₂ HPO ₄ 0.15 M	
KH ₂ PO ₄ 0.15 M	
Rojo neutro	0.01g en 50 mL de etanol. Agregar 50 mL agua
NaOH 0.4 N	
HCl 0.4 N	
Buffer de referencia pH 4 y 7	



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Durante la explicación se tomará una muestra sanguínea de uno de los integrantes del equipo, misma que será procesada por los asesores para obtener plasma.

A) PREPARACIÓN DE SISTEMAS AMORTIGUADORES

Col morada.

En un mechero ponga a hervir 100 mL de agua destilada, en ella coloque unos trozos pequeños de col de forma que queden cubiertos por el agua. Deje hervir durante 10 minutos y apague el mechero.

Buffer de fosfatos

1. Rotular 4 tubos marcándolos con el pH esperado.
2. Agregar en cada tubo con una pipeta, las soluciones y cantidades mostradas en la siguiente tabla, TENGA CUIDADO DE MEDIR LAS CANTIDADES PRECISAS, USAR UNA PIPETA PARA LA SAL (Na_2HPO_4) Y OTRA DIFERENTE PARA EL ACIDO (KH_2PO_4).

Na_2HPO_4 0.15M (mL)	KH_2PO_4 0.15M (mL)	pH esperado
9.7	0.3	8.3
8.0	2.0	7.4
6.1	3.9	7.0
2.7	7.3	6.4

B) MEDICIÓN POTENCIOMÉTRICA DEL pH

1. Seguir las instrucciones de su asesor con relación al calibrado y manejo del potenciómetro, tomar las lecturas de pH de los tubos y anotar en la sección correspondiente.

C) COMPROBACIÓN DE pH CON TIRA INDICADORA UNIVERSAL

1. Introducir una tira de indicador universal de pH en los tubos, comparar los colores desarrollados con la tabla del frasco de las tiras y anotar el valor obtenido. Anotar sus resultados



D) ESTIMACIÓN DEL pH POR USO DE UN INDICADOR

Rojo neutro

1. Añadir dos gotas de indicador rojo neutro, a cada uno de los tubos con buffer de fosfatos, mezclar bien y anotar los colores desarrollados.

Antocianinas

En la gradilla coloque 7 tubos de ensayo rotulados del 1 al 7

A cada uno de ellos agregue 5 ml de agua destilada y un ml del agua de la col donde se encuentran las antocianinas

Se busca obtener 3 colores ácidos, 3 básicos y el neutro de acuerdo a la siguiente imagen



Heredia-Avalos, S., (2006). Experiencias sorprendentes de química con indicadores de pH caseros. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias, 3(1), 89-103.

Para lograrlo realice lo siguiente:

Para el tubo 1 que será el más ácido con un color rosa agregue gotas del HCl 0.4 N y agite entre cada una hasta obtener el color de la imagen

Para el tubo 7 que será el más básico de color verde agregue gotas del NaOH 0.4 N y agite entre cada una hasta obtener el color de la imagen



Para los tubos ácidos coloque en otro tubo de ensaye 3 ml de agua destilada y coloque una gota del HCl 0.4 N, mezcla bien.

Al tubo 2 y 3 agrega gota a gota mezclando entre cada una la mezcla ácida hasta obtener colores diferentes entre rosa y violeta como en la imagen.

Para los tubos básicos coloque en otro tubo de ensaye 3 ml de agua destilada y coloque una gota del NaOH 0.4 N, mezcla bien.

A los tubos 5 y 6 agrega gota a gota mezclando entre cada una la solución básica hasta obtener uno de los colores entre azul y verde como en la imagen.

Para el tubo 4 que es el neutro revise el color obtenido y agregue según sea necesario la solución ácida o básica para obtener el color azul de la imagen.

Una vez que logres los colores avisa a tu asesor para su revisión

E) EFECTOS DE UN BUFFER PARA Oponerse a los Cambios de pH

1. Un solo equipo con una tira de indicador universal, medir el pH de la solución de NaOH 0.4 N y del HCl 0.4 N. Anotar el resultado.

Buffer fosfatos

2. Del tubo con pH 7, tomar 5 mL y transferirlos a otro tubo de ensaye rotulado como 7b.

3. Al tubo 7, añadir gota a gota con una pipeta, solución de NaOH 0.4 N, contar las gotas necesarias para que el color de la solución del tubo, sea igual a la del tubo más básico.

4. Al tubo 7b, añadir gota a gota con una pipeta, solución de HCl 0.4 N, contar el número de gotas necesarias para que el color de la solución del tubo 7b vire hasta color rosa.

5. Tomar 5 mL del tubo de pH 8.3, añadir con cuidado, gota a gota con una pipeta, solución de HCl 0.4 N y contar el número de gotas necesarias para virar el color a rosa.

Agua

7. Realizar el procedimiento descrito en los puntos 3 y 4 sustituyendo las soluciones buffer por agua destilada utilizando 2 gotas de indicador rojo neutro (PRIMERO MEDIR EL pH INICIAL).



Plasma

- Realizar el procedimiento descrito en los puntos 4 y 5 sustituyendo las soluciones buffer por 1 mL de plasma empleando 2 gotas de indicador rojo neutro (PRIMERO MEDIR EL pH INICIAL).
- Tomar en cuenta las variables implicadas y comparar los resultados.

Antocianinas

Colocar 50 ml agua en un vaso y añadir la cantidad necesaria de indicador de pH de col lombarda para que la disolución tenga un color apreciable. Si se coloca un papel blanco debajo del vaso se observa mejor su color.

A continuación se agregan unas gotas de NaOH 0.4 N a la disolución coloreada hasta que ésta adquiera una coloración verdosa.

Se toma la mitad de esa disolución y se coloca en otro vaso, que será el color de referencia.

Seguidamente se sopla através de una pipeta en el interior de la disolución durante un minuto hasta que la disolución cambiará de color volviéndose azul.

RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Medición potenciométrica de pH

Tubo pH esperado				
pH				

Uso de tira indicadora universal de pH

Tubo pH esperado				
pH				

Determinación de pH por uso de un indicador

Tubo pH esperado				
pH* de acuerdo al cálculo				
Color obtenido				

* Realizar los cálculos de pH de cada sistema utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach



Efectos de un buffer para oponerse a cambios de pH:

pH del NaOH 0.4 N _____

pH del
0.4 N

HCl

Muestra	pH inicial	Solución adicionada	Número de gotas
Tubo 7		NaOH 0.4 N	
Tubo 7b		HCl 0.4 N	
Agua destilada		NaOH 0.4 N	
Agua destilada		HCl 0.4 N	
Plasma		NaOH 0.4 N	x ___ =
Plasma		HCl 0.4 N	x ___ =
Tubo pH 8.3			

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Realicen un párrafo para cada una de las partes de la práctica, tomando como guía lo que se pide. Empleen las cuartillas que sean necesarias para ello.

Medición de pH

- Fundamente a que se deben las diferencias en los valores obtenido para un mismo tubo con los distintos métodos y considerando los resultados ¿Cuál consideran el método más eficiente? y ¿Por qué?



Determinación de pH por uso de un indicador

- Explique en base a la composición química (estructura) del rojo neutro y de las antocianinas ¿Por qué un indicador me permite tener más rangos en cuanto coloraciones de vire que el otro?

Resistencia a los cambios de pH

- Para explicar químicamente a que se debe la diferencia en el número de gotas gastadas de forma experimental para lograr el cambio en el pH, toma en cuenta lo siguiente: ¿El agua es capaz de amortiguar el pH? Qué solución resiste más los cambios de pH el buffer de fosfatos o el plasma anoten las reacciones químicas implicadas en ambos casos.

- Anote la reacción química que ocurre en el momento de soplar en el vaso, que compuesto contiene el aire que soplamos y que sucede químicamente para lograr el cambio de color.

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Tiras de pH impregnadas con soluciones buffer	30 tiras	No aplica	Depositar en la basura municipal
R2	Na ₂ HPO ₄ 0.15 M, KH ₂ PO ₄ 0.15M	1L	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R3	Tiras de pH impregnadas con NaOH 0.4 N	10 tiras	No aplica	Depositar en la basura municipal
R4	Tiras de pH impregnadas con HCl 0.4 N	10 tiras	No aplica	Depositar en la basura municipal
R5	Na ₂ HPO ₄ 0.15M, KH ₂ PO ₄ 0.15M, NaOH	150 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R6	H ₂ O, NaOH, H ₂ O, HCl	100 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R7	Plasma sanguíneo, NaOH, HCl	100 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R8	Tubos con tapón morado y coágulos sanguíneos	10 tubos	No aplica	Inactivar en un vaso de precipitados con solución de agua: cloro (3:1) , enjuagar en la tarja al chorro de agua para desechar coágulos y depositar los tubos en la basura municipal



REFERENCIAS

Murray, K., Granner K. y Rodwell, W. (2008). *Harper: Bioquímica Ilustrada* (18ª ed.) México D.F: El Manual Moderno,

Areal, R. (1996). *Química Orgánica Aplicada I* (2ª ed.). Barcelona, España: Servei de Publicacions de la UPC.

Devlin, T. (2006). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas* (4ª ed.). Barcelona, España: Reverté.

Flores A., Sánchez, S. y Uribe, S. *Bioquímica. Manual de Prácticas*. México DF: Mc Graw-Hill Interamericana

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92030108>



PRÁCTICA 2

MANEJO Y CUIDADO DEL MICROSCOPIO

INTRODUCCIÓN

El microscopio es un instrumento óptico que amplifica la imagen de un objeto pequeño, es un aparato que ha contribuido en gran parte al desarrollo de la biología como ciencia, es el resultado de una infinidad de hechos y experiencias científicas realizadas durante varios siglos. Posterior a su descubrimiento sobrevino el de las partículas internas de los seres animales y vegetales. Cada científico que construía un nuevo microscopio ayudaba a que los estudios en células vivas tuvieran un gran avance.

Un microscopio simple es una lente de aumento ordinaria con la que se pueden observar múltiples objetos microscópicos. El microscopio compuesto difiere del microscopio simple en que tiene dos sistemas de lentes, uno conocido como objetivo y el otro como ocular, montados en un tubo o cuerpo del microscopio; la imagen que percibe el ojo tiene un aumento igual al producto de los aumentos de los dos sistemas de lentes. Los microscopios pueden aumentar de 100 a cientos de miles de veces el tamaño original de los objetos que se observan.

Actualmente existen varios tipos de microscopios, entre ellos el óptico (ver Figura 1) y el electrónico. En el microscopio óptico el aumento del objeto se consigue usando un sistema de lentes que manipula el paso de los rayos de luz entre el objeto y los ojos. El microscopio electrónico utiliza un rayo de electrones controlado por un campo magnético.

MICROSCOPIO ÓPTICO

Los microscopios de este tipo generalmente producen un aumento de 1000 veces el tamaño original. El límite lo tienen en unas 2000 veces.

Las lentes de un microscopio óptico son el objetivo y el ocular. La luz que entra en el sistema debe dirigirse sobre la preparación y para esto se utiliza el condensador. Elevando o bajando el condensador puede alterarse el plano del foco de luz y elegirse una posición que consiga el foco preciso. El objetivo es la lente situada cerca del objeto que se observa. El aumento primario del objeto es producido por la lente objetivo y la imagen se transmite al ocular, donde se realiza el aumento final.

Los microscopios están equipados con tres objetivos: bajo poder, alto poder y objetivo de inmersión. Estos objetivos están montados sobre una pieza que se llama revolver que puede rotarse para alinear el objetivo deseado con el condensador.

Además del aumento, una propiedad importante de un microscopio es su poder de resolución; esto es la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy cercanos. Cuanto mayor sea el poder de resolución, mayor será la definición de un objeto.



Los microscopios de gran poder resolutivo son especialmente buenos para ver pequeñas estructuras, esta propiedad de un microscopio compuesto depende de la longitud de onda utilizada y de una característica óptica de la lente conocida como apertura numérica. Como los microscopios ópticos utilizan luz visible, la longitud de onda está fijada y es por lo que la resolución de un objeto esta en función de la apertura numérica; cuanto mayor sea la apertura, el objeto resuelto será más pequeño.

$$d = \frac{0.5l}{N \text{sen } a}$$

d : poder de resolución; l : longitud de onda; a : mitad del ángulo de la lente objetivo; N : índice de refracción del medio; $N \text{ sen } a$: apertura numérica.

Un factor que afecta a la apertura numérica, además de la construcción de la lente, es el medio a través del cual pasa la luz. Mientras el objetivo esté separado del objeto por el aire, su apertura numérica nunca será mayor de 1,0; para conseguir aperturas numéricas mayores que ésta, el objetivo debe estar inmerso en un líquido de mayor índice de refracción que el aire. A este líquido se le denomina aceite de inmersión que se utiliza con los objetivos de inmersión obteniendo una apertura numérica entre 1,2 y 1,4. Aún así, al utilizarse la luz visible (longitud de onda) estos microscopios llegan a tener un poder de resolución de aproximadamente 0,25 μm , lo que significa que las partículas con un tamaño más pequeño de 0,25 μm no pueden distinguirse unas de otras.

Además del microscopio de campo claro existen otros microscopios ópticos como son el de campo oscuro, fluorescencia y contraste de fases.

Microscopio de campo claro: usa como fuente de luz directa una bombilla. Ya que los microorganismos son transparentes es difícil distinguirlos con este tipo de microscopía y es por lo que se suelen teñir.

Microscopio de campo oscuro: usa un microscopio óptico equipado con un condensador y objetivo especial que iluminan los microorganismos en la muestra frente a un fondo oscuro. Este método se utiliza para visualizar microorganismos vivos sin teñir.

Microscopio de fluorescencia: la muestra se tiñe con una sustancia fluorescente que absorbe la energía de las ondas cortas de la luz (azul) y emite la luz de longitudes de ondas más largas (verde). Se utiliza en inmunofluorescencia, técnica en la cual una sustancia fluorescente se une a un anticuerpo específico de ciertos microorganismos. Si el anticuerpo fluorescente se une al microorganismo, este microorganismo emite fluorescencia y se puede identificar. Esta técnica se usa en clínica.



Microscopio de contraste de fases: es un microscopio óptico modificado que permite contrastar sustancias de diferente grosor o densidad. Mediante un condensador y un objetivo especial, se controla la iluminación de tal manera que vaya en diferentes rutas a través de las distintas partes de una célula. El resultado es una imagen con diferentes grados de brillo y oscuridad. Con este método, el material denso aparece brillante, mientras que las partes de la célula que tienen una densidad cercana al H_2O (citoplasma) aparecen oscuras. Se utiliza para visualizar estructuras celulares sin necesidad de usar colorantes.

En el campo del profesional químico, la microscopía también tiene su aplicación, permite la observación y el análisis de sistemas no biológicos, como son los complejos cristalinos o fenómenos coloidales y permite por tanto la formulación de modelos teóricos más adaptados a la realidad molecular.

El avance en el conocimiento celular está ligado no solo al desarrollo de nuevos y modernos microscopios, sino también al uso de técnicas auxiliares como son la tinción y el microcorte. En una tinción se colorean ciertas partes de las células utilizando colorantes específicos, que permiten un contraste entre las partes teñidas y otras no coloreadas, o en las que se utilizó un colorante diferente, con lo que se facilita la observación. En el microcorte, los tejidos se cortan en secciones tan finas que se pueden examinar bajo el microscopio.

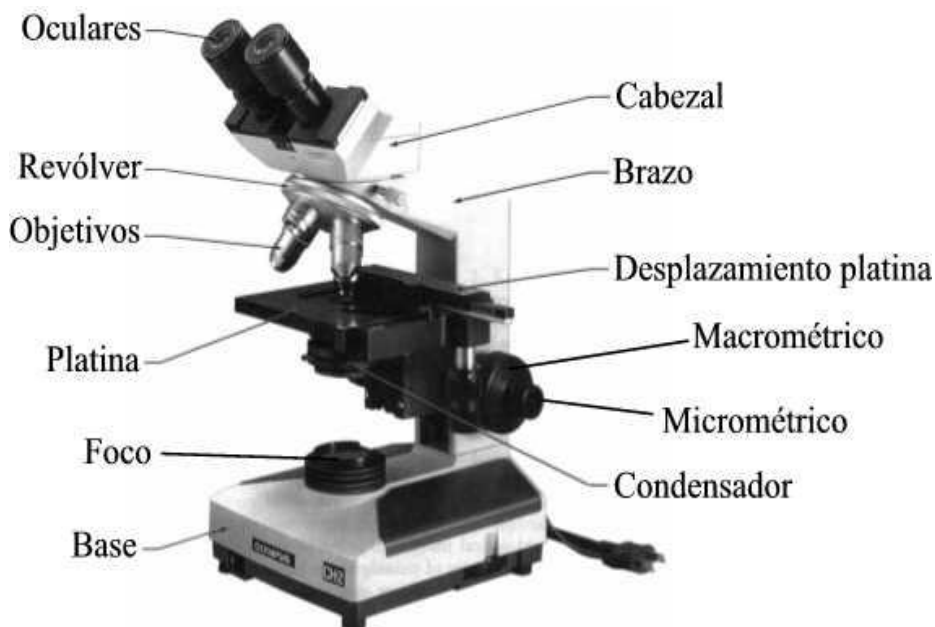


FIGURA 1. MICROSCOPIO ÓPTICO

El microscopio óptico consta de tres sistemas: mecánico, de iluminación y óptico. El S. Mecánico consta de: pie, columna, platina, revolver, pinzas, tubo y los tornillos macrométrico, micrométrico. El S. De iluminación consta de lámpara de luz, condensador y diafragma. El S. Óptico consta de lentes oculares y lentes objetivos.



Las células animales, vegetales y los microorganismos, pueden ser observados mediante microscopios ópticos, pero en general se deben teñir.

Técnicas de tinción

El proceso seguido en todas las tinciones conlleva las siguientes etapas: extensión, fijación, tratamiento con colorantes y observación.

1. Extensión: se realiza sobre un portaobjetos que ha de estar totalmente limpio. Si la muestra es líquida se hace directamente y si es sólida, hay que resuspenderla previamente en una gota de H₂O.

2. Fijación: tiene por objeto adherir la muestra al portaobjetos y desnaturalizar las proteínas para facilitar la acción del colorante. Normalmente se realiza con calor, pasando la muestra repetidamente a 10 cm de la llama del mechero.

3. Tinción: se realiza añadiendo los colorantes sobre los tejidos o muestras sometidos a los procesos anteriores. Puede ser de varios tipos:

Negativa: Los colorantes no tiñen a las células, sino el entorno, aumentando de este modo su contraste. La muestra se extiende sobre una gota del colorante.

Simple: Se utiliza un solo colorante que puede ser de cualquier tipo. Al igual que la tinción negativa, sólo nos permite observar la forma, el tamaño y el tipo de agrupación de las células.

Diferencial: Intervienen dos o más colorantes y cada uno diferencia una estructura. El colorante que se usa en segundo lugar es de color diferente al del primero, denominándose colorante de contraste.

OBJETIVO

Identificar las partes fundamentales del microscopio óptico compuesto a través de la preparación de un frotis sanguíneo, así como la tinción de diversas células para observarlas al microscopio y practicar su funcionamiento, además de recordar los cuidados que deben tenerse en cuenta para su manejo.



PREGUNTAS PREVIAS

1. ¿Cuáles son los sistemas del microscopio óptico compuesto y de que partes consta cada uno?
2. ¿Cómo se puede conocer el aumento total al que se observa algún objeto bajo el campo del microscopio óptico?
3. ¿Qué significan poder de resolución, distancia frontal y objetivo de inmersión?
4. Haga una lista de los principales cuidados que se deben proporcionar para el cuidado del microscopio óptico compuesto.
5. Haga una lista de los pasos a seguir para lograr el enfoque correcto de una preparación.
6. ¿Por qué es necesario realizar tinciones para la observación de células en tejidos? Mencione los nombres de cinco colorantes diferentes, que se utilicen para la tinción de células.
7. Fundamente el uso de cada uno de los reactivos utilizados en la tinción de epidermis de cebolla.

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

Hojas de elodea
1 cebolla pequeña
Paño de microfibra para anteojos

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
100 mL de hematoxilina de Harris	1 g de Hematoxilina se disuelve en 10 mL de alcohol absoluto; 20 g de alumbre de amonio o de potasio se disuelve en 200 mL de agua y se calienta. Se mezclan, se hierve y se agrega 0.5 g de óxido de mercurio. Se enfría rápidamente.
100 mL de eosina amarillenta	Solución al 1% en alcohol. 1g de Eosina en 100 mL de Etanol
10 mL de albúmina en NaCl al 1% en gotero	Solución al 1% en solución 0.9% de NaCl
10 mL de solución Lugol en gotero	0.7 g de yodo metálico + 1.8g de KI + 1 mL de HCl al 2% aforado a 50 mL con agua.



100 mL de colorante Giemsa	Solución madre: 3 g de azur II eosina, 0.8 g de azur II, 375 g de alcohol metílico absoluto y 135 g de glicerina. Se disuelve y se agita. Se deja reposar 24 hrs., se filtra y se guarda. Solución de trabajo: 0.25 g de la solución madre, se mezcla con 30 mL de alcohol metílico y 10 mL de glicerina
10 mL de azul de metileno al 1% en gotero	1 g de azul de metileno en 100 mL de etanol de 96°
100 mL de alcohol ácido	3 mL de HCl concentrado y 97 mL de etanol 96°
100 mL de xilol Q.P.	
25 mL de aceite de inmersión en gotero	
200 mL de alcohol 96°	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. OBSERVACIÓN DE DIFERENTES LAMINILLAS

a). Enfoque con el microscopio las laminillas previamente preparadas que le proporcione su asesor. Cerciórese de emplear el objetivo de menor aumento; coloque la muestra en la platina y siga las instrucciones de su asesor para lograr un enfoque correcto.

2. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS DE *ELODEA*

- Coloque sobre un portaobjetos una hoja de *elodea* que esté lo suficientemente húmeda.
- Coloque encima un cubreobjetos y presione para que la hoja quede perfectamente horizontal. Presione nuevamente con la goma de un lápiz.
- Repita el procedimiento del inciso a); sobre la hoja agregue 1 o 2 gotas de colorante azul de metileno (el necesario para cubrir la hoja)
- Coloque encima un cubreobjetos. Elimine el exceso de colorante con papel absorbente.
- Observe las muestras al microscopio.

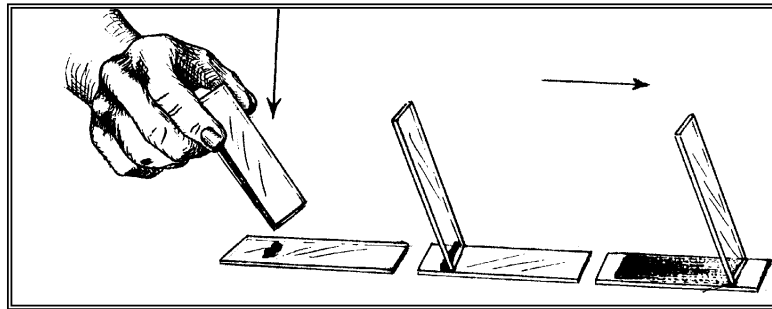
3. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES

- Con el extremo de un hisopo raspe cuidadosa pero fuertemente el interior de su mejilla.
- Frote el aplicador en una gota de solución de lugol colocada en el centro de un portaobjetos y coloque encima un cubreobjetos.
- Observe al microscopio.

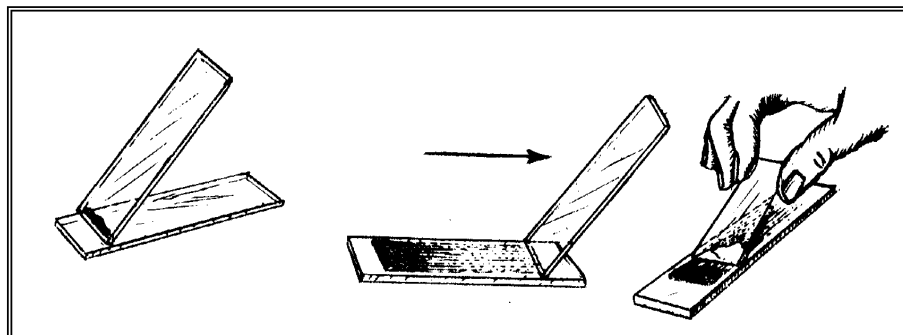


4. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

- Limpie con algodón humedecido en alcohol la yema de un dedo.
- Puncione con lanceta estéril.
- Coloque una gota de sangre sobre un portaobjetos limpio y desengrasado (Ver figura 2. (a) y (b)).



(a) Para un frotis de sangre la forma más común consiste en jalar la gota en movimiento.



(b) En este caso el material se arrastra y se tritura al mismo tiempo

Figura 2. Dos formas de hacer un frotis

- Tome otro portaobjetos tan limpio como el anterior y acerque el borde de uno de sus extremos hasta que toque la sangre.
- Incline el segundo portaobjetos hasta que forme un ángulo agudo con el primero, permitiendo que la sangre se extienda por capilaridad en el borde que toca la sangre.
- Deslice con un solo movimiento el portaobjetos inclinado dirigiéndolo al extremo contrario y procurando que el deslizamiento sea suave.
- Deje secar.
- Deje gotear etanol sobre el frotis y espere a que seque.
- Sumerja el portaobjetos en el colorante de Giemsa por 10 minutos.
- Saque la laminilla y enjuague con agua corriente.
- Realice la observación.



5. TINCIÓN DE EPIDERMIS DE CEBOLLA

- Haga un corte de la capa delgada de una cebolla fresca de aproximadamente 2 x 1 cm.
- coloque 2 gotas de albúmina sobre un portaobjetos, y encima el tejido con la parte brillante hacia abajo, fijando con calor.
- Sumerja en una cámara de tinción con hematoxilina de Harris por 4 min (Ver figura 3).
- Coloque en una cámara con agua para eliminar el exceso de colorante.
- Pase a una cámara con alcohol ácido (éste debe ser un paso rápido).
- Sumerja nuevamente en agua.
- Coloque la preparación en eosina por 2 min.
- Lave con alcohol de 96 dos veces.
- Sumerja en xilol durante 2 min.
- Seque la preparación con papel absorbente.
- Observe al microscopio.

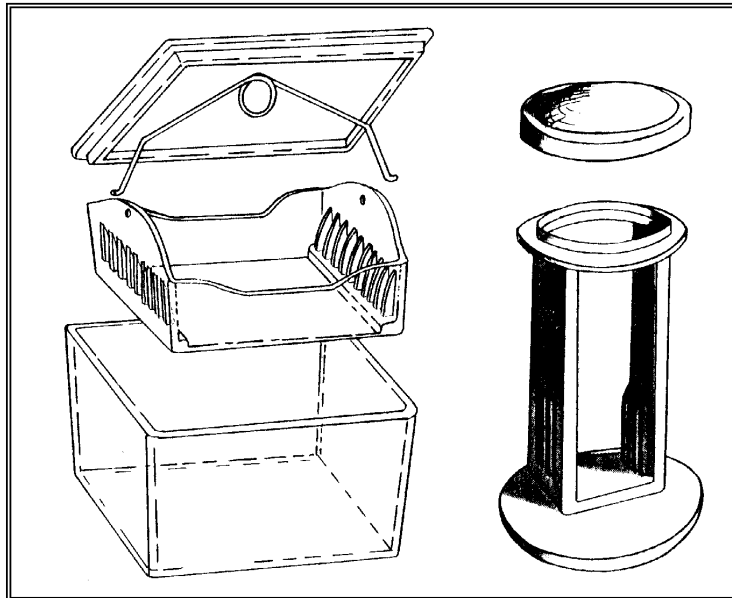


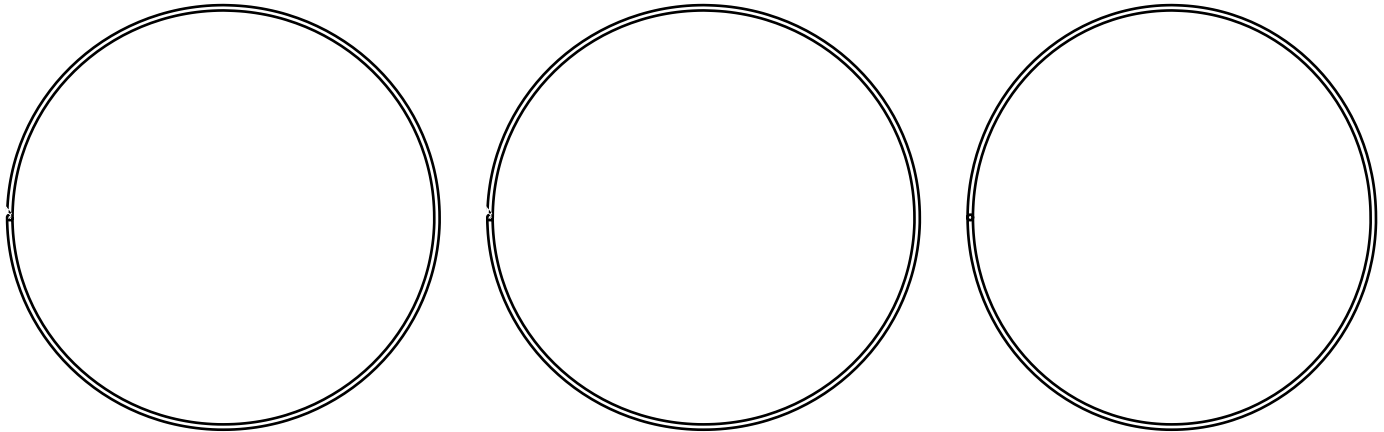
Figura 3. Dos modelos de cajas de vidrio que se utilizan para tinción y deshidratación de tejidos montados o pegados sobre portaobjetos: Cámara y vaso de Coplin



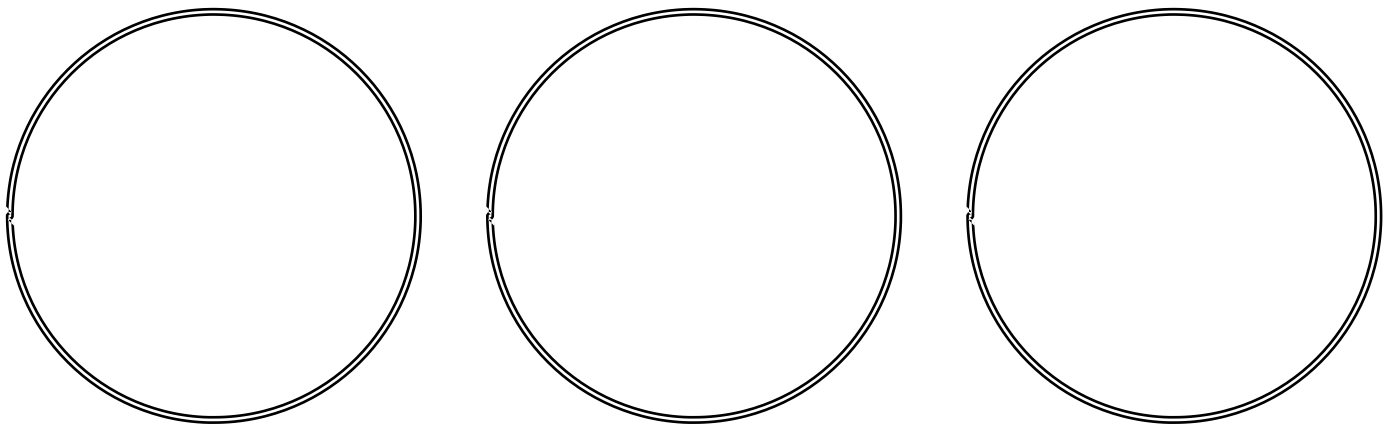
OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Realice todas las observaciones cuidadosamente. Dibuje y anote sus resultados para desarrollar adecuada y ampliamente su reporte.

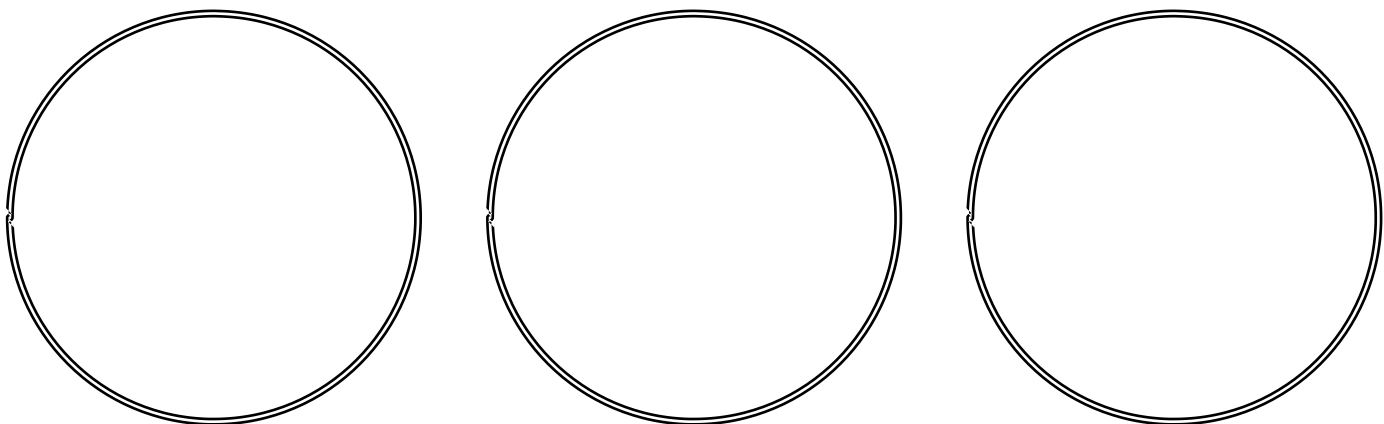
OBSERVACIÓN DE DIFERENTES LAMINILLAS



OBSERVACIÓN DE CÉLULAS DE *ELODEA*

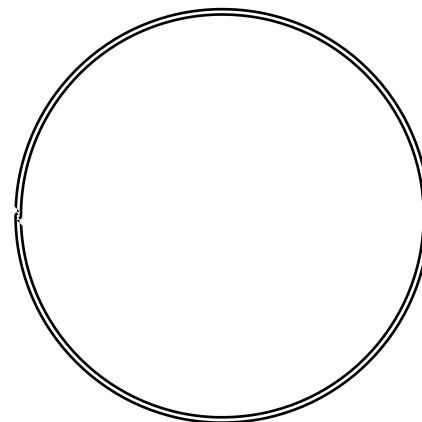
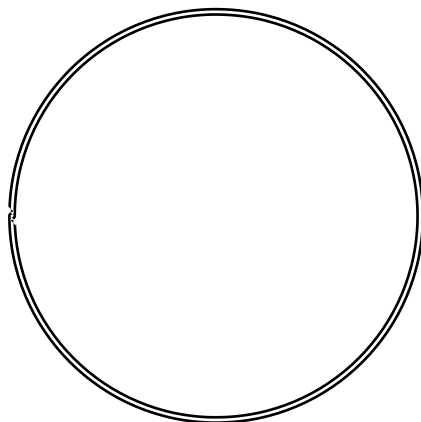
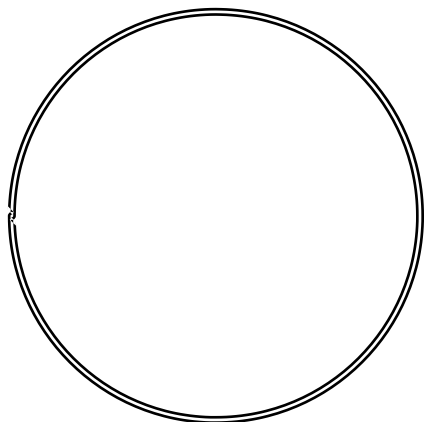


OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES

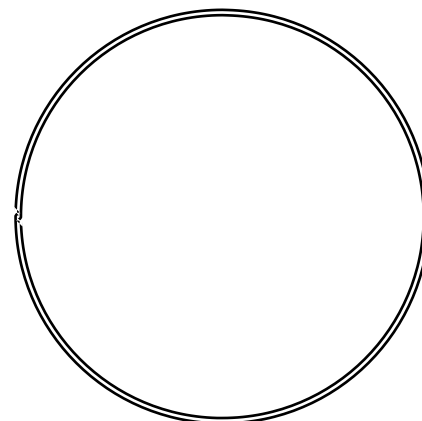
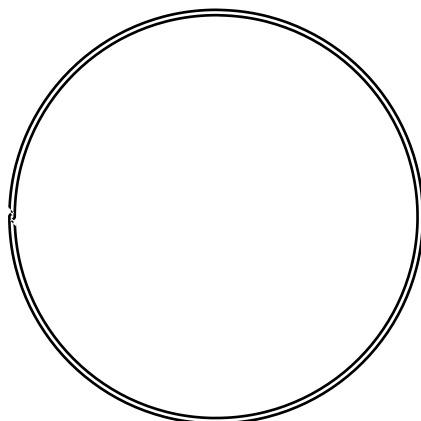
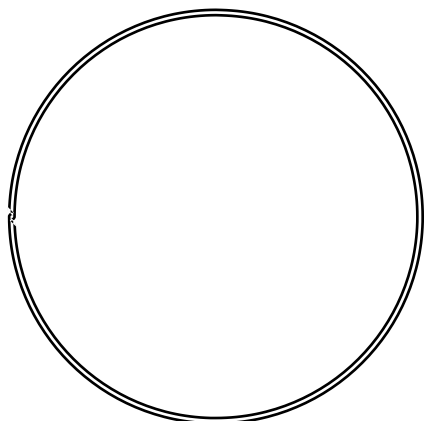




OBSERVACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS



TINCIÓN DE EPIDERMIS DE CEBOLLA





DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones que se encuentran en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura, fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Explique brevemente: si el microscopio empleado tenía un poder de resolución adecuado, cuales cuidados realizó al usar, transportar y limpiar el microscopio durante las observaciones y al termino de las mismas.

Explica ¿Por qué las muestras tuvieron que ser teñidas para poderse observa al microscopio?

Explique el fundamento de cada paso de las diferentes tinciones, que ocurre químicamente en las células con cada paso de las técnicas realizadas.

Con base al fundamento de cada una de las tinciones empleadas explique en cada una de las muestras que partes de las células lograron identificar y considerando el tipo de muestra ¿Se puede observar las mismas estructuras celulares en todas? si, no ¿Por qué?

BIBLIOGRAFÍA

1. Gaviño de la Torre, G. (1995). "Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo". (2ª ed.) México. Limusa.
2. D'Ocon, M., García, M. (1998). "Fundamentos y técnicas de análisis bioquímico, principios de análisis instrumental". Madrid, España. Paraninfo.
3. Williams, B. (1981). "Principios y técnicas de bioquímica experimental". Barcelona, España. Omega.



PRÁCTICA 3

HOMOGENIZACIÓN, CENTRIFUGACIÓN Y CROMATOGRAFIA

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones bioquímicas se diseñan para estudiar las sustancias que comprenden la materia de los organismos vivos, es decir, las biomoléculas. En esta área se estudia en detalle una o todas las sustancias que participan en un fenómeno biológico. Sin embargo, el tipo de moléculas que se analizan presentan ciertas propiedades que dificultan su estudio. Por ejemplo, estas sustancias poseen características fisicoquímicas muy similares, son más difíciles de fraccionar y purificar que otras sustancias de bajo peso molecular, además son inestables a ciertos valores de pH, temperatura y a cambios de solventes.

El avance de la Bioquímica está íntimamente ligado al desarrollo de nuevos y mejores métodos e instrumentos de laboratorio, que se puedan utilizar en análisis cualitativos, cuantitativos o para el aislamiento de diversas sustancias.

Los objetivos básicos de un análisis bioquímico son:

- a). Separación. Esta es fundamental en la investigación de sustancias. El componente a investigar se separa primero como parte de una fracción subcelular (homogenización, ruptura o lisis celular). Esta fracción se procesa para lograr el aislamiento del componente. Sin embargo esta etapa presenta dificultad, porque la mezcla contiene una gran diversidad de sustancias, y muchas de ellas de características similares.
- b). Purificación. La purificación se realiza en varias etapas del esquema de fraccionamiento de la investigación. Se puede realizar demostrando que no existen otras sustancias contaminantes.
- c). Identificación o caracterización. Consiste en la determinación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas que distinguen a la sustancia en estudio.
- d). Determinación de la estructura y correlación con la función. Esta etapa requiere de la determinación completa de la forma y estructura total, y se deben correlacionar las características estructurales específicas con las actividades bioquímicas.
- e). Mantenimiento de la integridad estructural y funcional. Consiste en tomar precauciones para asegurar que las sustancias no se expongan a procedimientos extremos que puedan dañar su estructura y por tanto sus propiedades biológicas.



Para cumplir con estos objetivos en bioquímica se dispone de muy variadas técnicas como son: homogenización, centrifugación, cromatografía, electroforesis, espectroscopía, uso de radioisótopos, difracción de rayos X, microscopía, diálisis, etc. Estos se emplean de acuerdo a las características de la muestra y al objetivo del estudio, y se elige aquel que presente mejores resultados al más bajo costo.

La ruptura o lisis celular se puede realizar por diferentes técnicas; se puede hacer uso de un mortero con pistilo, un aparato de aspas (Virtis), un homogeneizador de embolo (Potter) (ver Figura 4) o utilizar técnicas de mayor sofisticación como el uso de frecuencias ultrasónicas, enzimas, detergentes, etc.



Figura 4: Homogeneizador potter

La centrifugación es un método de separación de componentes que se basa en las diferencias de sedimentación, de los componentes de una mezcla en un campo gravitacional aumentado dado por una alta velocidad rotacional.

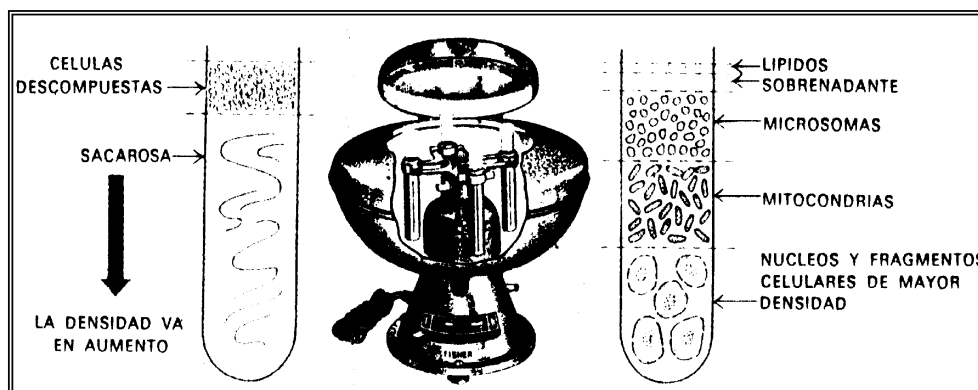


Figura 5. Esquema de una centrifuga clínica, se muestran también las fracciones celulares que se pueden separar por centrifugación en gradiente de sacarosa.



La cromatografía es un método muy versátil que se entiende como la diferencia de migración de los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria por influencia de una fase móvil. Existen diferentes tipos de cromatografía lo que le permite ser un método de amplia aplicación no sólo en la bioquímica sino en otras áreas científicas.

OBJETIVO

Identificar los métodos más usados en Bioquímica para el análisis de una muestra, al conocer el fundamento de cada uno de ellos, así como las ventajas y desventajas que presentan, con ayuda de estos métodos practicar la homogenización mecánica con mortero, realizar la centrifugación del homogenado obtenido, separar pigmentos vegetales por cromatografía en papel y en columna.

PREGUNTAS PREVIAS

1. Explique en qué consiste la homogeneización e indique los diferentes tipos de homogeneización.
2. ¿Qué son y para qué sirven el potter y el virtis?
3. Explique el fundamento de la centrifugación.
4. Explique el fundamento de la cromatografía.
5. Explique que es el R_f y cual es su utilidad.
6. ¿Qué pigmentos se encuentran en las muestras vegetales a trabajar. Investigue las fórmulas químicas de cada uno, así como sus características principales
7. Cuáles son las fases móviles y estacionarias de las cromatografías a realizar?
8. ¿Cómo se realizan la cromatografía en papel, en capa fina y en columna?
9. Investigar la polaridad de los solventes que conforman las fases móviles.

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
Hojas de espinacas
Pétalos de rosa roja, geranio rojo o anaranjado, bugambilia rosa
Hojas de plantas de ornato con dos colores
Algodón
100 g azúcar refinada



REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
300 mL de etanol absoluto Q.P.	
700 mL de éter de petróleo Q.P.	
20 mL de acetona Q.P.	
20 mL de benceno Q.P.	
500 mL de butanol	
150 mL ácido acético	
20 g de sulfato de sodio anhidro Q.P.	
500 g de silica gel para columna	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A) HOMOGENEIZACIÓN

1. Pesar 3 g de hojas de espinaca y cortarlas en trozos pequeños
2. Pesar 3 g de cada una de las otras muestras y cortar en trozos pequeños
3. Colocar cada muestra en morteros por separado
4. Adicionar 10 mL de etanol absoluto a cada muestra
5. Homogenizar fuertemente.

B) CENTRIFUGACIÓN

1. Colocar en tubos para centrifuga cada uno de los homogenados obtenidos, un tubo por cada homogenado
2. Equilibrar los tubos en una balanza granataria de dos platos, junto con las camisas correspondientes
3. Colocar los tubos dentro de la centrifuga

Nota: No olvidar colocar cada par de tubos en posiciones opuestas.

4. Centrifugar durante 10 min a 2500 rpm
5. Sacar los tubos de la centrifuga y realizar sus observaciones en cuanto a color e intensidad del sobrenadante y de la pastilla

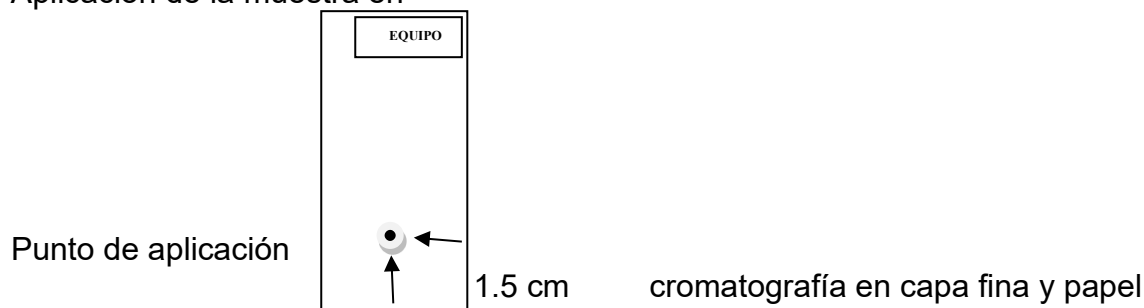


C) SEPARACIÓN DE PIGMENTOS VEGETALES POR CROMATOGRAFÍA

1. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL (HOMOGENADO DE ESPINACA)

1.. Cortar una tira de papel Whatman de 3 x 20 cm. Hacer las marcas indicadas por su asesor. Todas las marcas se deben hacer con lápiz y no debe tocarse el papel con las manos, utilice guantes.

Fig. 1. Aplicación de la muestra en



2. Colocar sobre la tira de papel, con ayuda de un capilar o micropipeta una muestra del sobrenadante del homogenado de hojas de espinaca. La mancha debe tener una coloración lo más intensa posible y además debe ser lo más compacta que se pueda (por lo menos ocho aplicaciones en el mismo punto, dejar secar entre cada una) (figura 1) INTRODUCIR SIMULTÁNEAMENTE, TODAS LAS TIRAS DE PAPEL DEL GRUPO A LA CÁMARA DE CROMATOGRAFIA SIGUIENDO LAS INSTRUCCIONES DE SU ASESOR.

3. Correr la cromatografía en una mezcla: éter de petróleo-acetona-benceno (85:5:10) en una cámara cromatográfica de 25x25x10 cm, previamente saturada durante 15 min.

4. Sacar el cromatograma, marcar inmediatamente con lápiz el frente del disolvente. Posteriormente marcar las manchas. Dejar secar y calcular los R_f de cada componente, registrar los resultados en la tabla I de la sección resultados y observaciones.

2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (HOMOGENADO DE PÉTALOS DE FLORES)

1. Cortar las placas de silica gel 60F en rectángulos de 2 x 5 cm, cuidar de no maltratarla ni tocarla con los dedos.

2. Aplicar la muestra con un capilar aproximadamente a 1.5 cm del borde (figura 1), aplicar varias veces (mínimo 5 veces) dejar secar entre una y otra aplicación para obtener una gota concentrada y compacta.

3. Correr la cromatografía en una mezcla: butanol-ácido acético concentrado-agua destilada (63:16:21) en una cámara de cromatografía 20x15x8 cm, previamente saturada durante 15 min.

4. Colocar la placa en la cámara de cromatografía, cuidar que el solvente no toque la gota de muestra y tapar rápidamente



5. Sacar la tira de la cámara cuando el solvente se encuentre aproximadamente a 1 cm del borde superior.
6. Dejar secar y calcular los R_f de cada componente, registrar los resultados en la tabla II de la sección resultados y observaciones

3a. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

1. Lavar y secar perfectamente una columna para cromatografía o una bureta de 25 mL. Colocar un pequeño trozo de algodón en el fondo.

En cada mesa un equipo realizará esta cromatografía con espinacas y el otro con flores de acuerdo a las instrucciones de su asesor.

Espinacas

2. Para empacar la columna para cromatografía coloque el embudo en la parte superior y agregue la sacarosa. La columna empacada debe tener 20 cm de longitud. Una vez empacada adicionar una pequeña capa de sulfato de sodio anhidro, puede golpear suavemente la columna para que se compacte ligeramente.
3. Agregar el éter de petróleo para eluir la columna con la llave abierta siempre para obtener un goteo lento pero constante, **evitar cerrar la llave** durante el proceso, esto podría fraccionar la columna y ya no funcionará. Una vez logrado esto permitir que la fase móvil se absorba casi por completo y adicionar inmediatamente 1 mL del sobrenadante de espinaca, cuidar que no entre aire a la columna.
4. Una vez introducida la muestra permitir que se estratifique dentro de la fase estacionaria, y entonces agregar un exceso de fase móvil para dejar que la muestra corra sin permitir que se seque la superficie; recibir las diferentes fracciones coloridas en tubos de ensaye.
5. Anotar sus resultados en la tabla III de la sección resultados y observaciones

Pétalos u hojas de planta de diferente color

2. Para empacar la columna para cromatografía coloque el embudo en la parte superior y agregue la sacarosa. La columna empacada debe tener 20 cm de longitud. Una vez empacada adicionar una pequeña capa de sulfato de sodio anhidro, puede golpear suavemente la columna para que se compacte ligeramente.
3. Eluir la columna con la fase móvil y cuando ya exista un goteo constante, adicionar 1 mL del sobrenadante de pétalos, de manera que se permita estratificar la muestra en todo lo ancho de la pipeta para evitar un mal corrimiento.
4. Permitir que las muestras penetren en la fase estacionaria. Después se debe eluir con la fase móvil y recibir las diferentes fracciones coloridas en tubos de ensaye.
5. Anotar sus resultados en la tabla IV de la sección resultados y observaciones

NOTA: las primeras fracciones recibidas que no presenten color pueden reutilizarse ya que aún no presentan componentes de la muestra.



RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Tabla I. Cromatografía en papel de pigmentos de espinaca.

Número	color de los componentes separados	Rf de cada componente	Observaciones
1			
2			
3			
4			

Tabla II. Cromatografía en capa fina de pigmentos de pétalos de flores u hojas de plantas de distintos colores.

Muestra	color de los componentes separados	Rf de cada componente	Observaciones



Tabla III. Cromatografía en columna de pigmentos de espinaca.

	color de los componentes separados	Observaciones
1		
2		
3		
4		
5		

Tabla IV. Cromatografía en columna de pigmentos de pétalos de flores u hojas de plantas con distintos colores.

Muestra (nombre de la flor)		color de los componentes separados	Observaciones
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Recuerden redactar un párrafo por cada parte donde justifiquen químicamente y argumenten sus resultados, tomando en cuenta lo siguiente:

De la homogeneización explique brevemente con base en los resultados reportados, si el homogeneizador empleado es el adecuado para el tejido vegetal. Porque se emplea el etanol como solvente.



De la centrifugación - la importancia de equilibrar los tubos y colocarlos uno frente a otro, a qué velocidad centrifugó y a cuantas g equivale, es suficiente para separar la muestra trabajada?

Y de la cromatografía...compárelas indicando:

- Si el orden de separación de los pigmentos es el mismo
- se observaron los mismos pigmentos en ambos casos para las espinacas y para los pétalos de las flores.
- Como es la interacción entre los pigmentos y la fase móvil en cada caso.
- Con base a sus resultados cual considera mejor para cada una de las muestras.

DISPOSICIÓN DE RESÍDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Fragmentos de muestras vegetales: hojas de espinaca y pétalos de flores		No aplica	Residuo biológico no tóxico ni infeccioso, depositar en la basura municipal
R2	Pastillas de los homogenados y sobrenadantes		No aplica	Depositar en la basura municipal Sobrenadantes: disponer en frascos debidamente etiquetados
R3	Mezcla de butanol-Acido acético concentrado-agua destilada	100 mL	Inflamable	Reutilizar para otros grupos o disponer en un frasco debidamente etiquetado
R4	Papel filtro con pigmentos vegetales	10 tiras	No aplica	Depositar en la basura municipal
R5	Mezcla: éter de petróleo-acetona-benceno	100 mL	No aplica	Reutilizar para otros grupos o disponer en un frasco debidamente etiquetado
R6	Placas de cromatografía con pigmentos de flores	20 placas pequeñas		Depositar en la basura municipal
R7	Azúcar refinada con una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro e impregnada con eter de petroleo	Aproximadamente 300 g	No aplica	Dejar secar al aire y depositar en la basura municipal
R8	Eter de petróleo	Alcohol con pigmentos vegetales	Inflamable	Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R9	Silica gel con una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro e impregnada con butanol-ácido acético concentrado-agua destilada		Toxico	Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R10	Pequeñas cantidades de pigmentos de pétalos de flores con butanol-ácido acético concentrado-agua destilada		No aplica	Volumenes muy pequeños. Disponer en un frasco debidamente etiquetado para el residuo



REFERENCIAS

- Pavia D., Lampman, G. & Kriz, G. (1982). *Introduction to Organic Laboratory Techniques. A Contemporary Approach* (2^a ed.). USA: CBS College Publishing.
- Sikorski, Z. (2007). *Chemical and Functional Properties of Food Components* (3^a ed.). LLC, USA: Taylor & Francis Group.
- Hernández H. y González, C. (2002). *Introducción al Análisis Instrumental*. Barcelona, España: Ariel, S.A.
- Landgrebe, J. (2005). *Theory and Practice in the Organic Laboratory* (5^a ed.). USA: Thomson LeRNAing, Inc.
- Mackenzie, C. (2004). *Experimental Organic Chemistry* (4^a ed.). USA: Prentice-Hall.
- Cela, R., Lorenzo, R. y Casais, M. (2002). *Técnicas de Separación en Química Analítica*. España: Síntesis, S.A.



PRÁCTICA 4

ESPECTROFOTOMETRÍA Y ELECTROFORESIS

INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría es una técnica del análisis instrumental que permite medir la intensidad de luz absorbida o transmitida por una sustancia. La utilidad de esta técnica en los análisis bioquímicos es muy amplia, en virtud de que todas las sustancias en solución tienen la característica de absorber energía radiante de una determinada longitud de onda del espectro electromagnético. Sin embargo, el espectro de absorción de una sustancia en especial puede variar dependiendo de las condiciones bajo las cuales se haya determinado; esta situación llevó al establecimiento de la ley de Beer- Lambert que plantea una ecuación matemática que ha tenido una gran aplicación y que en palabras dice “la absorción de luz de una solución es proporcional al número de moléculas de la sustancia absorbente en solución presentes por donde pasa el haz luminoso”.

Las técnicas espectroscópicas permiten detectar y analizar cantidades pequeñas de material, aún cuando se encuentren en sistemas relativamente impuros. Por ejemplo, se pueden observar cambios en los pigmentos respiratorios en sus formas oxidadas y reducidas en mitocondrias intactas bajo condiciones metabólicas específicas.

La electroforesis es un método de separación y purificación que se basa en la migración de partículas cargadas en un campo eléctrico, requiere que los componentes de la mezcla a separar posean carga o sea fácil hacer que adquieran una carga (P. ej. al ponerlos en un buffer de pH determinado) y que además las cargas netas de los componentes sean diferente.

OBJETIVO

Practicar la espectrofotometría para estimar la utilidad de este método en el análisis de una muestra y realizar la separación electroforética de una mezcla de aminoácidos.



PREGUNTAS PREVIAS

- 1.- ¿Cuál es el fundamento de la espectrofotometría?
- 2.- ¿Cuál es la diferencia entre espectrofotometría y colorimetría?
- 3.- Realice un diagrama de los componentes básicos de un espectrofotómetro
- 4.- ¿Qué es una curva patrón, tipo o de calibración y como se construye?
- 5.- ¿Cuál es la utilidad de una curva patrón?
6. ¿Cuál es el fundamento de la electroforesis?
7. ¿Qué condiciones debe cumplir una mezcla para poder separarla por electroforesis?
8. ¿Qué parámetros influyen en una separación electroforética?
9. ¿Qué tipo de compuestos se pueden separar por electroforesis?
10. Importancia, función y estructura de los aminoácidos.

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
250 mL solución de sulfato de cobre 200mg/mL	Pesar 50 g de sulfato de cobre y disolver en 150 ml de agua destilada. Aforar a volumen
1 L de solución Buffer de fosfatos a pH 8.6	2.48 g NaH_2PO_4 + 3.33 g Na_2HPO_4 aforar a 1 L con agua destilada. Ajustar pH=8.6
3 mL de mezcla de aminoácidos solución 1% (lisina, prolina y ác. glutámico de reciente preparación) en frasco gotero pequeño con capilar	Pesar 0.03 g de cada aminoácido y agregar a 3 mL de solución salina (NaCl 0.9%)
30 mL de revelador de ninhidrina en butanol (en recipiente ámbar con rociador de vidrio)	Disolver 0.5 g de ninhidrina en 100 mL de butanol
1 pliego de papel Whatman No.1	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. ESPECTROFOTOMETRÍA

a). De una solución de sulfato de cobre de concentración 200 mg/mL, prepare 5 mL de las siguientes soluciones: 200 mg/mL; 160 mg/mL; 120 mg/mL; 80 mg/mL y 40 mg/mL; 0 mg/mL.

Nota: Realice los cálculos correspondientes y muéstrelos a su asesor antes de proceder a la preparación de cada una de las diluciones.



- b). Utilice la solución de 0 mg/mL (agua destilada) como “Blanco de reactivos” para calibrar a cero al aparato.
- c). Haga en un espectrofotómetro un barrido de 10 en 10 nm, desde 400-600 nm en la región del UV-Visible del espectro, de la absorbancia de las soluciones de sulfato de cobre y determine la longitud de onda de máxima absorción. Haga la estimación en forma gráfica.
- d). Haga las lecturas de las soluciones a la longitud de onda determinada, así como de la muestra problema.
- e). Realice la gráfica correspondiente con las soluciones de concentración conocida y determine la concentración del problema.

2. ELECTROFORESIS DE AMINOÁCIDOS EN PAPEL

- a). Corte una tira de papel Whatman No. 1, de 2 X 25 cm y marque el centro (todas las marcas deben hacerse con lápiz y no debe tocarse el papel con las manos; utilice pinzas o guantes), anote en el extremo derecho el número de equipo, así como la dirección del cátodo.
- b). Llene la cámara de electroforesis con buffer fosfatos de pH 8.6.
- c). Sujete con una pinza la tira de papel filtro y sumérgala en la tina de la cámara; sáquela y escúrrala. (Alternativa: rociar la tira de papel con buffer)
- d). Coloque la tira en la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones de su asesor (utilice imanes para fijar el papel) (Ver Figura 9).
- e). En el centro del papel, con una micropipeta coloque la mezcla de aminoácidos en solución al 1 % (Lys, Glu, Pro).
- f). Coloque la tapa a la cámara de electroforesis y conéctela a la fuente de poder (Precaución: el cable negro con la terminal negra y el rojo con la roja), con esta acción se cierra el circuito.
- g). Corra la electroforesis a 200 voltios durante 40 minutos y al amperaje señalado por el aparato. ¡Peligro!, el circuito es de alto voltaje, evite el contacto con éste.
- h). Después de transcurrido el tiempo destinado a la separación desconecte la cámara. Destápela y saque con ayuda de una pinza la tira de papel.
- i). Deje la tira sobre papel absorbente para que se elimine el exceso de humedad.
- j). Rocíe uniformemente con ninhidrina y con ayuda de una parrilla muy caliente séquela hasta que aparezcan manchas de color amarillo y moradas.

- k). Observe las manchas, analice y concluya.

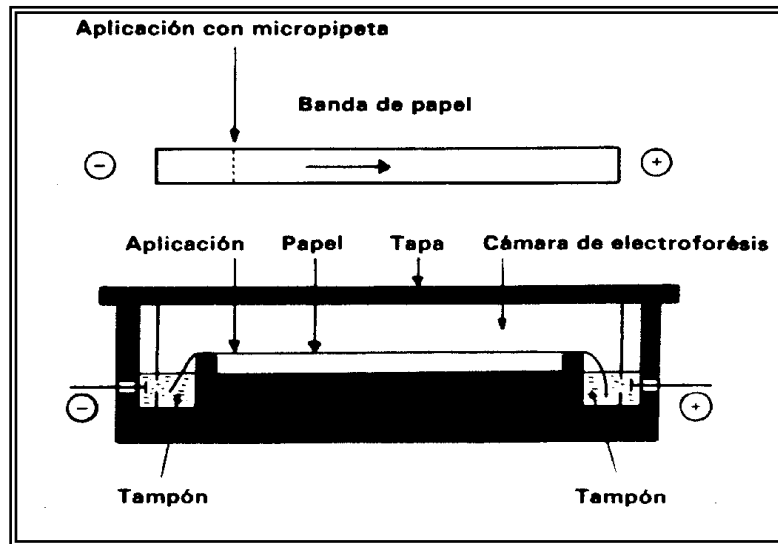


Figura 9. Esquema de la cámara de electroforesis

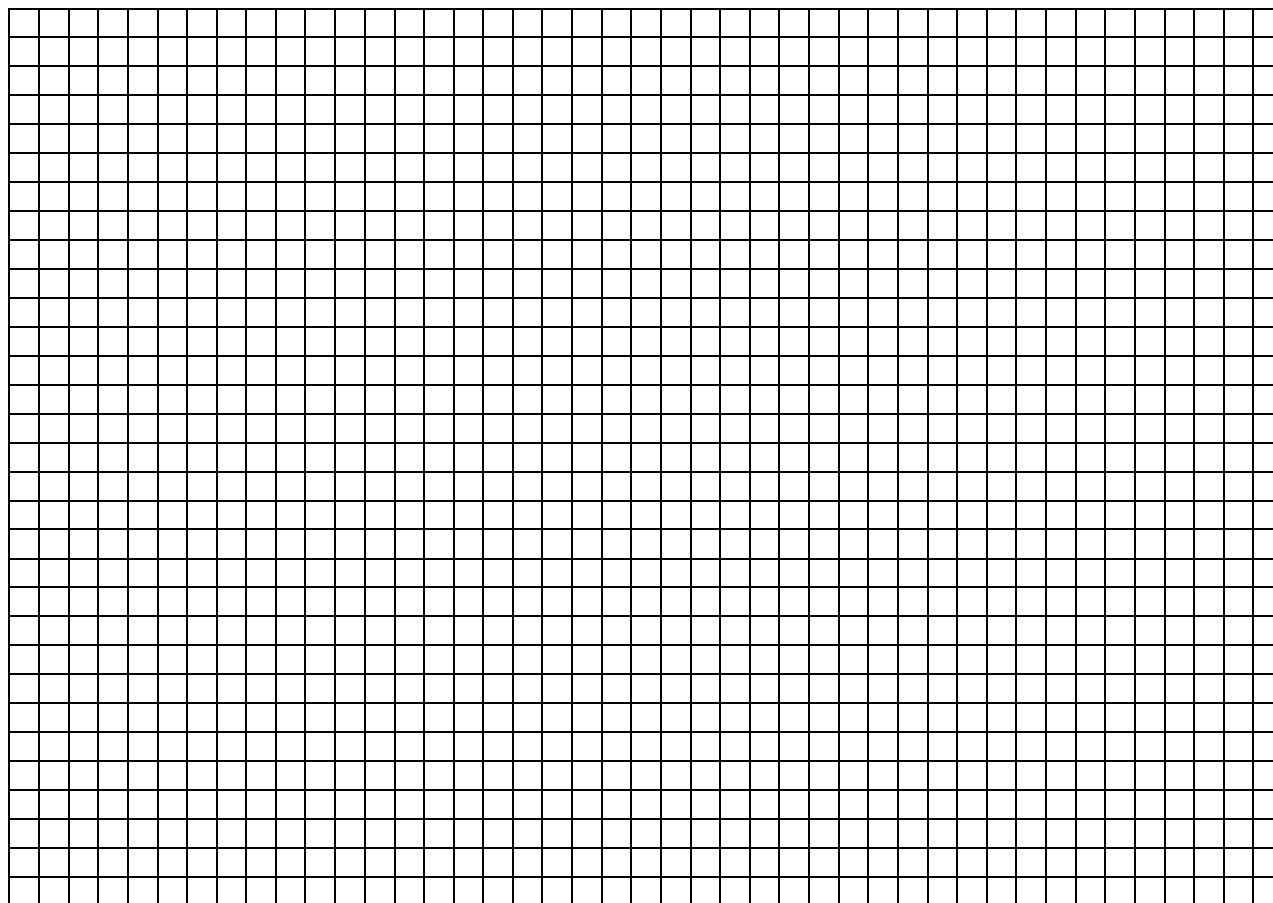
OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Realice sus observaciones cuidadosamente, haga anotaciones y esquemas o los dibujos que se requieran e investigue los datos necesarios para la discusión de resultados. Anote el cuadro de resultados y ejemplifique los cálculos necesarios, haga sus gráficos y no olvide escribir en cada uno los títulos completos y todos los datos necesarios para su completa identificación.



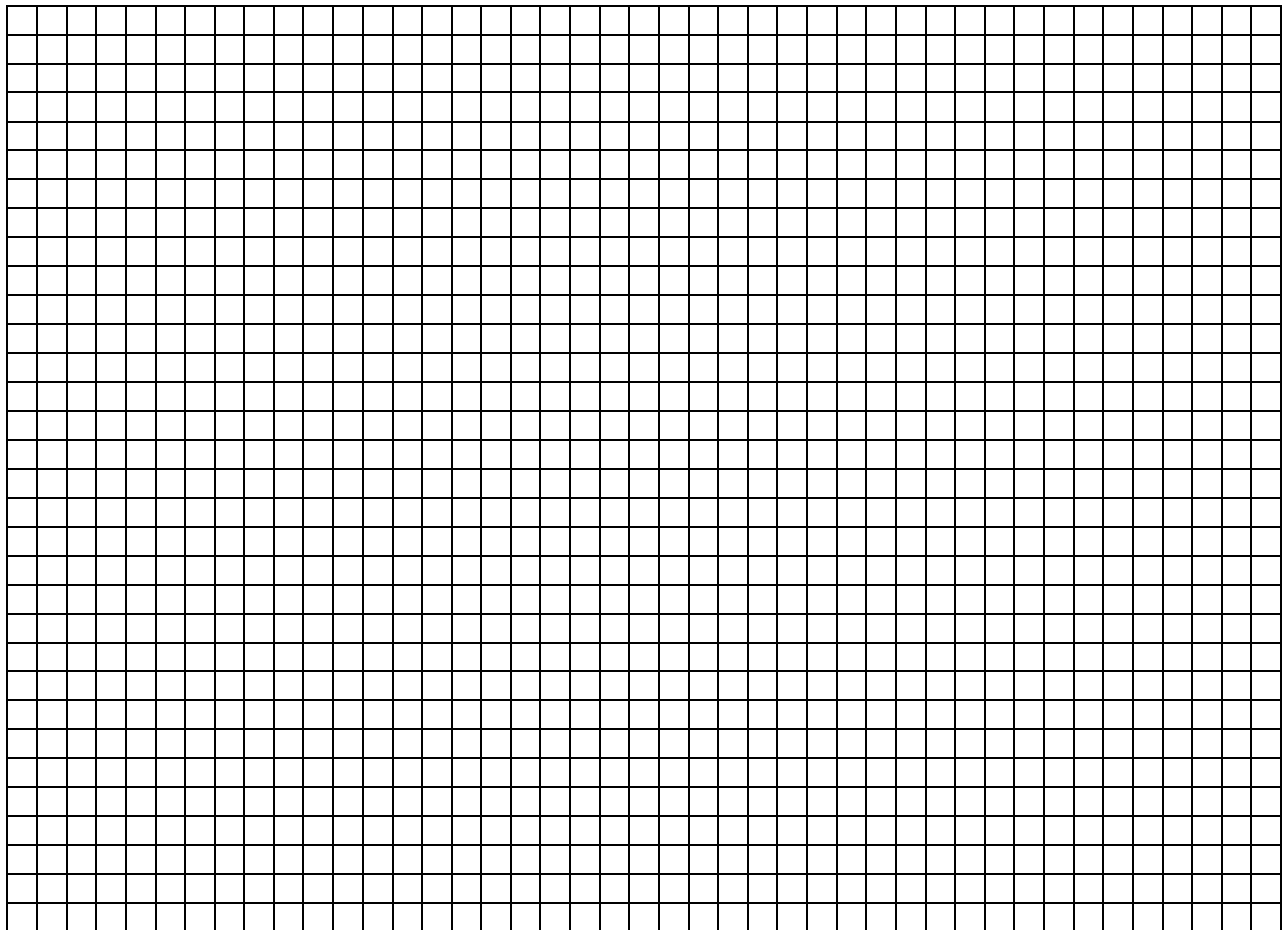
ESPECTROFOTOMETRÍA

Longitud de onda	Absorbancia	Longitud de onda	Absorbancia
400		510	
410		520	
420		530	
430		540	
440		550	
450		560	
460		570	
470		580	
480		590	
490		600	
500		610	





Concentración	Absorbancia





ELECTROFORESIS

Electroforegrama revelado

+	No.EQUIPO -
----------	--------------------

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Redacte un párrafo para cada parte de la práctica en la que explique químicamente sus resultados:

- Como estableció la longitud de onda adecuada para leer el sulfato de cobre.
- Explique la utilidad del tubo blanco.
- Con base a sus resultados y el valor de la r^2 si los resultados son los óptimos, y si considera adecuada la concentración del problema.
- De no haber obtenido los resultados óptimos cuales serían las acciones a seguir para obtener mejores resultados.
- Importancia de establecer un pH de trabajo al realizar la electroforesis
- Con base a las estructuras químicas de los aminoácidos al pH de 8.6 justifique su desplazamiento electroforético.
- Explique por qué la ninhidrina y los aminoácidos de la mezcla, reaccionan de forma distinta y en el caso de la prolina se obtiene un color amarillo.

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. Si tiene dudas consulte a su asesor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rendina, G. (1974). "Técnicas de bioquímica aplicada" México: Interamericana.
2. Williams, B. (1981). "Principios y técnicas de bioquímica experimental". Barcelona, España: Omega.
3. Bohinski, R. (1991). "Bioquímica". (5ª ed.) México: Addison-Wesley Iberoamericana.



PRÁCTICA 5

REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son compuestos orgánicos formados en su mayoría de carbono, hidrógeno y oxígeno, algunos contienen azufre y nitrógeno también, son productos primarios de la fotosíntesis. Químicamente se pueden definir como polihidroaldehydos, polihidroacetonas o compuestos que por hidrólisis producen estos compuestos. Muchos de ellos tienen la fórmula empírica $C_n(H_2O)_n$ por lo que recibieron el nombre de hidratos de carbono, que actualmente ya no se usa. Sin embargo, reciben otros nombres como el de glúcidos, sacáridos o azúcares.

Este grupo de biomoléculas constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la Tierra y desempeñan una gran variedad de funciones celulares como son almacén de energía, combustibles e intermediarios metabólicos, son estructurales, forman parte de los ácidos nucleicos, antibióticos y coenzimas, de las paredes celulares de las bacterias y plantas y del exoesqueleto de insectos. Además unidos a otro tipo de biomoléculas sirven para el reconocimiento y adhesividad entre células, para la respuesta inmunológica y la comunicación entre células adyacentes o distantes a través de receptores.

Los carbohidratos se clasifican de acuerdo al número de unidades monoméricas que contienen. Así los monosacáridos son las unidades fundamentales de la estructura de los carbohidratos, por hidrólisis ya no producen azúcares más sencillos, como ejemplos están la glucosa, fructosa, manosa, ribosa, galactosa, etc. Los oligosacáridos contienen en su estructura de 2 a 10 unidades de monosacárido y de estos los más comunes son los disacáridos, que están formados por dos unidades de monosacárido unidos por enlace glucosídico, los ejemplos típicos son la sacarosa, maltosa y lactosa. Los polisacáridos son polímeros formados por más de 10 unidades monosacáridas que pueden ser iguales o diferentes por lo que se conocen una gran variedad de homo y heteropolisacáridos. Como ejemplos de polisacáridos se pueden mencionar el almidón, glucógeno, celulosa, quitina, etc.

La presencia del grupo carbonilo en los carbohidratos, permite que estas biomoléculas presenten reacciones muy variadas, algunas de las cuales hacen posible su identificación. Entre las reacciones más comúnmente usadas para la identificación de carbohidratos se encuentran: Benedict, Tollens, Fehling, formación de osazonas, Bial, Molish-Udransky, Seliwanoff, Dishe y para polisacáridos la reacción de lugol. Varias de las pruebas coloridas son de mayor o menor sensibilidad en unos carbohidratos que en otros, dependiendo de las características químicas, es decir, si se trata de cetosas, aldosas, pentosas, ácidos urónicos, etc.



OBJETIVO

Realizar reacciones químicas con diversos carbohidratos, tanto en muestras puras como en productos que los contengan, para utilizarlas como métodos de identificación.

PREGUNTAS PREVIAS

- 1.- Haga una breve descripción de la importancia de los carbohidratos.
2. ¿Cuáles son las propiedades físicas, químicas y biológicas de los carbohidratos?
3. Escriba la nomenclatura y clasificación de los carbohidratos.
4. Escriba la estructura de Fisher y Haworth de los principales monosacáridos.
5. Explique la importancia del enlace glucosídico.
6. Escriba la estructura química de los siguientes disacáridos: maltosa, lactosa y sacarosa.
7. Represente y explique la estructura del almidón.
8. Explique el fundamento de las siguientes reacciones de identificación:

Molish-udranksy

Bial

Fehling

Osazonas

Hidrólisis de polisacáridos

Reacción almidón-iodo

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

Jarabe de maíz	1 limón
Miel de abeja	1 papa pequeña
10 mL de leche descremada	

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
25 mL de solución al 0.5% de c/u de los siguientes carbohidratos: glucosa, ribosa y 50 mL de sacarosa	0.5 g del carbohidrato en 100 mL de agua destilada
Soluciones A y B de Fehling (30 mL de cada una)	Sol. A: 6.93 g de sulfato de cobre aforado a 100 mL con agua Sol. B: 25 g de NaOH + 34.6 g de tartrato doble de sodio y potasio aforado a 100 mL con agua mezclar 1:1
Lugol (dos frascos gotero con 10 mL c/u)	0.7 g de yodo metálico + 1.8 g de KI + 1 mL de HCl al 2% aforado a 50 mL con agua



30 mL de solución de almidón al 1%	1g de almidón en 100 mL de agua
40 ml reactivo de Molish (en frasco gotero)	5 g de alfa naftol en 100 mL de etanol 96°
40 mL de reactivo de Bial (en frasco gotero)	3 g de orcinol aforado a 100 mL con etanol + 20 gotas de FeCl ₃ al 10% en agua
10 mL glucosa al 1% en frasco gotero	1 g de glucosa en 100 mL de agua destilada
100 mL de HCl concentrado	
60 mL de H ₂ SO ₄ concentrado	
25 mL de NaOH 1M	
5 sobres con 0.2 g de clorhidrato de fenilhidracina Q.P c/u	
5 sobres con 0.3 g de acetato de sodio c/u	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Nota: Al realizar cada una de las reacciones no debe usar exceso de reactivo. Si después de 20 minutos de iniciada la reacción no observa ningún cambio, puede considerar la prueba como negativa.

1. DILUCIÓN DE MUESTRAS

- Diluya 2 gotas de jarabe de maíz con 10 mL de agua. Esta dilución se utilizará en algunas pruebas posteriormente.
- Diluya 2 gotas de miel de abeja con 10 mL de agua. Esta dilución se utilizará en algunas pruebas posteriormente.
- Diluya 2 mL de leche con 10 mL de agua. Adicione gotas de limón hasta desnaturalizar las proteínas. Deje reposar. El suero de leche se utilizará posteriormente en la reacción de Fehling.
- Raspe un trozo pequeño de papa y colóquelo en un tubo de ensaye. Agregue 5 mL de agua destilada y disgregue con ayuda de una varilla de vidrio toda la muestra. Filtre la solución que se utilizará en algunas pruebas posteriores.



2. HIDRÓLISIS ÁCIDA

a).

Tubo almidón	Tubo raspado de papa	Tubo sacarosa
2 mL de almidón al 1%.	2 mL de solución de papa.	2 mL de solución de sacarosa
Agregue 1 mL de HCl concentrado	Agregue 1 mL de HCl concentrado	Agregue 1 mL de HCl concentrado

b) . Hierva durante 10 minutos.

c). Neutralice cada tubo con 1 mL de NaOH 1 M

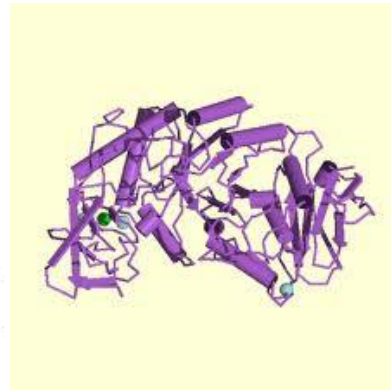
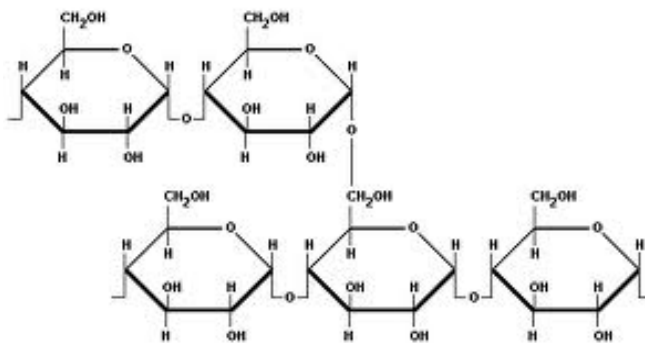


Figura 10. Estructura de la fracción amilosa del almidón

3.FORMACIÓN DE OSAZONAS

Las funciones aldehído o cetona de los carbohidratos reaccionan con la fenilhidracina para formar las fenilhidrazonas, que en presencia de otra fenilhidracina forman las osazonas correspondientes. Las osazonas sirven para la identificación de azúcares porque tienen una forma cristalina definida, tiempos de formación, puntos de fusión y rotación específica característicos y su estabilidad en caliente y en frío.

- Coloque en un tubo de ensaye 0.2 de clorhidrato de fenilhidracina, 0.3 g de acetato de sodio y añada 2 mL del carbohidrato de acuerdo a las instrucciones de su asesor
- Tape el tubo con tapones proporcionados por el asesor y colóquelo en un baño maría hasta aparición de color (tome el tiempo).
- Saque los tubos y deje enfriar.
- Decantar casi todo el líquido.
- Con cuidado decantar los cristales sobre un portaobjetos y coloque el cubreobjetos sin presionar.
- Observe al microscopio la forma de los cristales de las diferentes osazonas.
- Dibuje las observaciones de todos los equipos.



3. REACCIÓN DE FEHLING

Los azúcares reductores reaccionan con el reactivo de Fehling en un baño a ebullición para formar un precipitado color rojo ladrillo, producto de reducción del cobre. El ácido úrico y la creatinina también dan prueba positiva.

NOTA: El Reactivo de Fehling está compuesto por dos soluciones: A y B

- Rotule 5 tubos de ensayo con glucosa al 1%. sacarosa, miel de abeja diluida, sacarosa hidrolizada y suero de leche. Y agregue a cada uno 4 mL de agua destilada
- Agregue 5 gotas de solución de muestra
- Añada 1mL de reactivo de Fehling a cada uno
- Coloque el tubo en baño maría.
- Observe si aparece o no el precipitado.

4. REACCIÓN DE MOLISH-UDRANSKY

Esta prueba general para carbohidratos es muy sensible, ya que basta una solución al 0.001% para que sea positiva. Las glicoproteínas también reaccionan. Los carbohidratos en medio ácido se deshidratan para formar furfural o sus derivados los cuales se condensan con molécula ricas en dobles enlaces conjugados para formar compuestos de condensación coloridos que resultan de fácil identificación.

- Coloque en un tubo de ensayo 5 gotas de solución de glucosa al 0.5 %.
- Agregue 2 gotas de reactivo de Molish y mezcle bien.
- Deje resbalar por las paredes del tubo cuidadosa y lentamente 1 mL de H_2SO_4 concentrado.
- No agite. Observe el anillo rojo violeta que se forma en la interfase de los dos líquidos
- Realice esta prueba para almidón, sacarosa, miel de abeja y jarabe diluidos.

5. REACCIÓN DE BIAL

Esta prueba sirve para identificar pentosas y nucleótidos que también presentan pentosas. Se forman coloraciones azul-verdoso como producto de la condensación del furfural con el orcinol que contiene el reactivo de Bial.

- Rotule 4 tubos como: ribosa, glucosa, miel de abeja y jarabe de maíz. En cada tubo de ensayo coloque 1 mL de muestra, añada 8 gotas del reactivo de Bial y 1.5 de HCl concentrado.
- Caliente en baño maría y retire en cuanto cambie de color.
- Observe el color producido.



6. OBSERVACIÓN DE POLISACÁRIDOS AL MICROSCOPIO

a). Observación de granos de almidón

1. Con una navaja haga un corte muy fino de una papa.
2. Coloque el corte sobre un portaobjetos.
3. Agregue una o dos gotas de solución de lugol de forma que se humedezca todo el corte de manera homogénea y sin exceso de reactivo.
4. Observe al microscopio y haga sus esquemas.

b). Observación de fibras de celulosa.

1. Coloque muy pocas fibras de algodón en un portaobjetos.
2. Agregue una gota de lugol y una de ácido sulfúrico concentrado que humedezca perfectamente las fibras de algodón con los reactivos.
3. Coloque un cubreobjetos y observe al microscopio.

8. PRUEBA DE LUGOL

El yodo forma un complejo con el almidón al acomodarse entre la hélice de la fracción amilosa de la molécula de polisacárido

1. Coloque en una placa de porcelana por separado una gota de solución de almidón al 1 % y de solución de papa hidrolizada, hidrolizado de almidón e hidrolizado de papa.
2. Agregue a cada una de las muestras una gota de solución de yodo.
3. Observe el color que se produce.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Realice cuidadosamente sus observaciones y no olvide de tomar nota para hacer una correcta discusión de resultados.

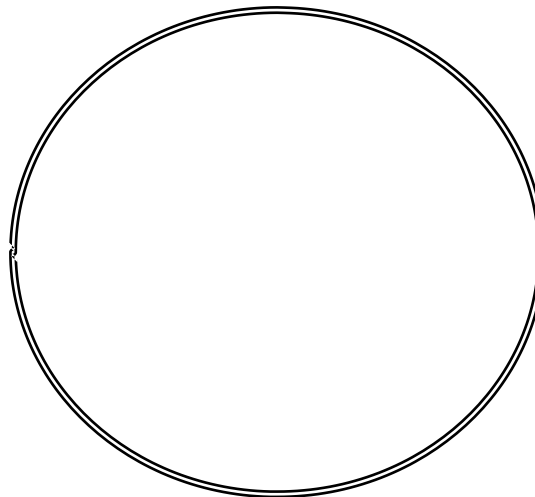
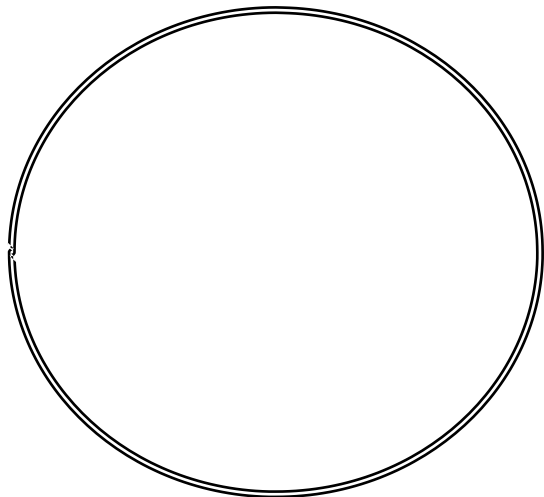


CUADRO A: Resultados de las reacciones generales para carbohidratos.

CARBOHIDRATO	PRUEBA DE MOLISH	PRUEBA DE BIAL	PRUEBA DE FEHLING	PRUEBA DE LUGOL
ALMIDÓN				
SACAROSA				
GLUCOSA				
RIBOSA				
MIEL DE ABEJA				
JARABE DE MAÍZ				
PAPA				
HIDROLIZADO DE SACAROSA				
HIDROLIZADO DE ALMIDÓN				
SUERO DE LECHE				
HIDROLIZADO DE PAPA				



Observación de polisacáridos al microscopio





CUADRO B: Resultados de la formación de sazonas

CARBOHIDRATO	CRISTALES DE OSAZONAS	FÓRMULA DE LA OSAZONA
GLUCOSA		
MANOSA		
XILOSA		
RIBOSA		
FRUCTOSA		



DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Para su discusión consideren lo siguiente, recuerden explicar químicamente con los fundamentos y no solo describir sus resultados.

¿Qué productos se obtuvieron al hidrolizar las soluciones de papa, almidón y sacarosa espera obtener en cada caso? ¿Para qué se adiciona NaOH a los hidrolizados?

De acuerdo a las reacciones realizadas y resultados obtenidos

- cuáles de las muestras trabajadas tienen o son carbohidratos
- cuáles son pentosas
- cuáles son hexosas
- cuáles de las muestras originales y obtenidas por hidrólisis son carbohidratos reductores
- químicamente a que se debe la diferencia en la reacción del almidón con lugol hidrolizado y sin hidrolizar, dibuje como interacciona el lugol con el almidón

Explique cuales monosacáridos producen la misma osazona y químicamente porque sucede así.

Que se observa en el microscopio, explique químicamente el tratamiento y/o tinción que se le dio a cada muestra para su observación.

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. Si tiene dudas consulte a su asesor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bohinsky, R. (1998). "Bioquímica". (5ª ed.) México: Pearson Education.
2. Campbell, K. y Rell, O. (2004). "Bioquímica". México: International Thomson Editores.
3. Nelson, D. y Cox, M. (2000). "Lehninger. Principios de Bioquímica". (4ª ed.) España: Omega.
4. Murray, K., Granner, K., Mayes, A. y Rodwell, W. (2007). "Bioquímica de Harper". (17ª ed.) México: El Manual Moderno.
5. Rendina, G. (1974). "Técnicas de bioquímica aplicada". México: Interamericana.



PRÁCTICA 6

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos constituyentes de los seres vivos, que tienen la propiedad de ser insolubles en agua, pero que se pueden extraer con solventes orgánicos como éter, cloroformo, éter de petróleo, bisulfuro de carbono, alcohol caliente, etc. Químicamente son ésteres reales o potenciales de ácidos grasos.

Este grupo de compuestos desempeñan dentro de la célula funciones como amortiguadores físicos, aislante térmico, reserva energética, protección, transporte, son estructurales y muchos de ellos tienen funciones muy específicas y de gran importancia fisiológica y médica. Una gran cantidad de lípidos que se producen en las plantas se almacenan en forma de aceites que tienen utilidad en industrias como la de los alimentos, cosméticos, farmacia, etc. por la capacidad que tienen para proveer aromas y sabores.

Una de las funciones más sobresalientes de los lípidos es la de formar membranas celulares y ello es posible gracias a la propiedad que tienen de formar agregados entre sí y permitir además la interacción con otras biomoléculas. Varias de las funciones de los lípidos son posibles precisamente por la unión que presentan con carbohidratos o proteínas.

Este tipo de biomoléculas presentan varias propiedades químicas como hidrólisis, saponificación, halogenación, oxidación, hidrogenación, etc. y se puede hacer uso de ellas para realizar la caracterización de algunos lípidos, además de utilizar también propiedades físicas. Por su constitución química los lípidos presentan otras características de gran importancia como son la detergencia, ligada también a su capacidad para organizarse y formar micelas y bicapas en solución acuosa.

La separación (extracción) de los lípidos de otro tipo de biomoléculas en un sistema biológico se realiza aprovechando sus características de solubilidad y para esto se utilizan mezclas de solventes como cloroformo: metanol en proporción 2:1 v/v. Se pueden utilizar otros solventes dependiendo del tipo de lípido a separar, por ejemplo, éter etílico para ácidos grasos o éter de petróleo para lípidos no saponificables. Para realizar la separación de una mezcla de lípidos y la identificación de los mismos se utilizan técnicas cromatográficas en todas sus variantes.



OBJETIVO

Realizar la extracción, separación, identificación de los fosfolípidos de la yema de huevo mediante el aislamiento con solventes orgánicos, corrimiento cromatográfico bidimensional y la identificación con diferentes reactivos reveladores, así como, comprobar la solubilidad que tienen algunos lípidos de muestras puras y comerciales en solventes polares y apolares con la finalidad de confirmar algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

PREGUNTAS PREVIAS

- 1.- Investigue los siguientes términos: lípido, ácido graso, índice de acidez, índice de iodo, índice de saponificación.
2. ¿Cuáles son las propiedades físicas, químicas y biológicas de los lípidos?
3. Escriba la clasificación modificada de Bloor para los lípidos.
4. Describa brevemente cada tipo de lípido.
5. Escriba la estructura de los principales ácidos grasos.
6. Investigue que tipo de lípidos están presentes en la yema de huevo y escriba la estructura química ellos.
7. Describa 2 métodos de separación e identificación de lípidos.
8. ¿Cómo se realiza una cromatografía bidimensional y cuál es su utilidad?

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

	Aceite Comestible
Aceite de olivo	Mantequilla
Cera	2 Huevos



REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
500 mL de metanol Q.P.	
900 mL cloroformo Q.P.	
20 mL de ácido acético Q.P.	
30 mL de revelador de ninhidrina al 0.5 % (en frasco ámbar con rociador)	0.5 g de ninhidrina se aforan a 100 mL en butanol.
30 mL de revelador de molibdato (en frasco ámbar con rociador)	6.85 g de molibdato de sodio + 0.4 g de sulfato de hidracina, se llevan a 100 mL con agua y se le agregan 100 mL de H ₂ SO ₄ concentrado, enfriar y aforar a 1000 mL
30 mL de reactivo de bismutato (en frasco ámbar con rociador)	A) 1.7 g de nitrato de bismuto se aforan a 100 mL con una solución al 20 % de ácido acético en agua B) 40 g de yoduro de potasio se aforan a 100 mL con agua Se hace una solución de 16 mL de A + 4 mL de B y se aforan a 100 mL con la solución al 20 % de ácido acético en agua
400 mL de solución de KCl al 0.1 M	1.86 g de KCl aforado a 250 mL con agua destilada
25 mL de glicerina en frasco gotero	
1 g Colesterol	
25 mL de ácido oléico en frasco gotero	
1 g de ácido palmítico	
100 mL Etanol en frasco gotero	
100 mL Acetona en frasco gotero	
100 mL Benceno en frasco gotero	
10 placas de silica para cromatografía de 10 x 10cm	



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. PROPIEDADES DE SOLUBILIDAD

- Etiquete 5 tubos de ensaye con el nombre del lípido indicado en la tabla
- Coloque 5 gotas del lípido indicado o una pizca en el caso de ser sólido más 20 gotas del solvente respectivo
- Mezcle suavemente, observe y anote los resultados en la siguiente tabla

Muestra	Solvente				
	Agua	Etanol	Acetona	Benceno	Cloroformo
Glicerina					
Ac. Oléico					
Ac. palmítico					
Aceite Olivo					
Aceite comestible					
Mantequilla					
Cera					
Colesterol					

- Llene la tabla utilizando las siguientes claves:

- +++ muy soluble
- ++ soluble
- + poco soluble
- +/- parcialmente soluble
- insoluble

2. EXTRACCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS CON SOLVENTES

- Separe y coloque una yema de huevo en un vaso de precipitados de 250 mL
- Prepare 60 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1)
- Añada 40 mL de la mezcla a la yema de huevo y agite fuertemente con ayuda de la varilla de vidrio
- Filtre a través de gasa el contenido del vaso para eliminar los grumos.
- Transfiera la mezcla a un embudo de separación y añada los 20 mL restantes de la mezcla cloroformo-metanol
- Agitar y deje separar las capas
- En caso de no observar separación en un minuto agregue 15 mL de KCl 0.1M, agite y deje reposar
- Colecte la fase clorofórmica en el matraz Erlenmeyer y deseche la fase alcohólica



i). Evapore la fase clorofórmica hasta un 25% del volumen obtenido, en baño de agua y dentro de la campana.

3. SEPARACIÓN DE LÍPIDOS DE YEMA DE HUEVO POR CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL

- a). Una persona del grupo cortará la placa cromatográfica, utilizando guantes, en cuadros de 10 x 10cm atendiendo las instrucciones de su asesor
b). Marque con lápiz siguiendo el siguiente dibujo:

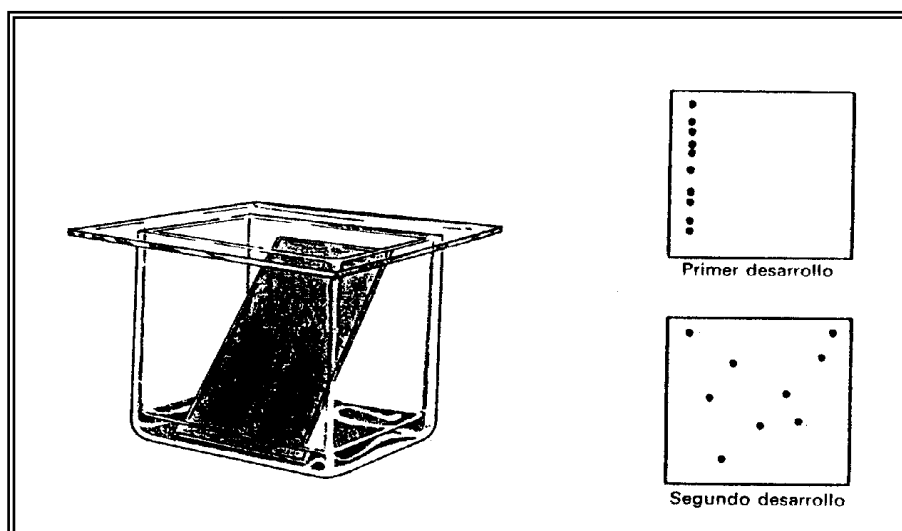
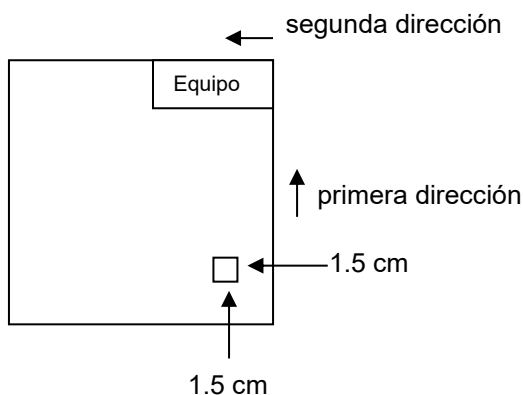


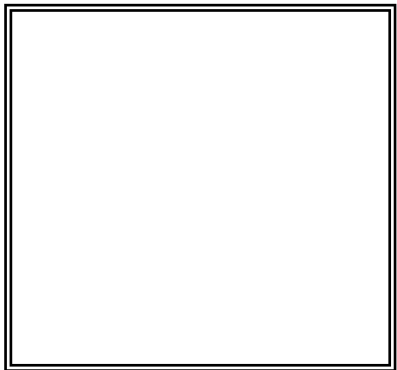
Figura 11 .Cromatografía en placa fina bidimensional



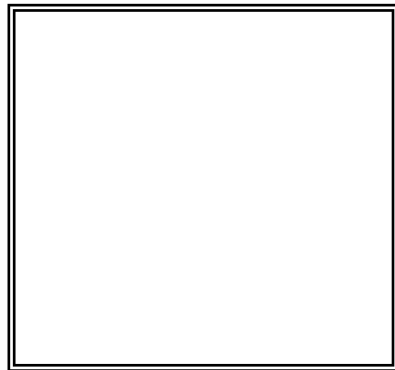
- c). Preparación de las cámaras, una persona del grupo
- Lave cuidadosamente las cámaras cromatográficas y seque perfectamente bien
 - Engrase las tapas y etiquete ambas cámaras con los nombres de las respectivas mezclas y relación
 - cámara 1: 100 mL de la mezcla cloroformo-metanol 1:1, tape y deje saturar durante 15min.
 - cámara 2: 100 mL de una mezcla de solventes formada de cloroformo-metanol-ácido acético-agua en una relación de 65:25:8:4, tape y deje saturar por 15min.
- d). Tome con un capilar una muestra del concentrado de la fase orgánica y aplique en una placa cromatográfica en el punto de aplicación marcado
- e). Deje secar y vuelva a aplicar, repita 4 o 5 veces hasta conseguir una mancha pequeña pero muy concentrada
- f). Todas las placas se introducen simultáneamente en la cámara 1 y se deja correr hasta que el solvente recorra el 80% de las placas
- k). Saque las placas y deje secar aproximadamente 10min con agitación
- l). Gírelas 90° e introdúzcalas en la segunda cámara cromatográfica
- m). Después de que la mezcla de solvente ha recorrido una distancia adecuada, saque las placas y déjelas secar
- n). Observe los cromatogramas con una lámpara de luz ultravioleta, marque con lápiz las manchas que se observan
- ñ). Revelaran sus placas con diferentes reveladores de acuerdo a las indicaciones de los profesores
- o). Una placa se rocía con el revelador de ninhidrina y se calienta en una parrilla, dentro de la campana, hasta la aparición de manchas de color violeta
- p). Otra placa se rocía con el revelador de molibdato, hasta la aparición de manchas de color azul
- q). Y una última placa se rocía con el revelador de bismuto, hasta la aparición de manchas amarillas o naranja

OBSERVACIONES Y RESULTADOS

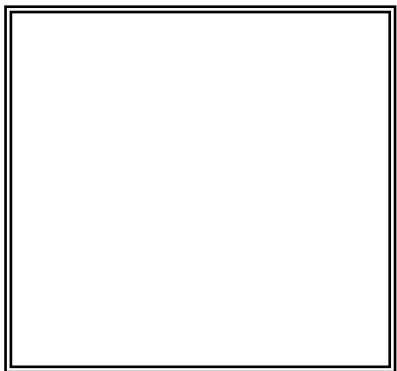
Realice cuidadosamente sus observaciones y no olvide tomar nota, para hacer una correcta discusión de resultados y obtener conclusiones.



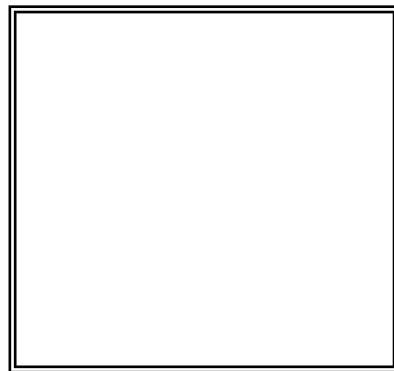
Revelador: _____



Revelador: _____



Revelador: _____



Revelador: _____

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

INSTRUCCIONES: Analizar y discutir cada resultado obtenido, con base en un contexto bioquímico, utilice citas bibliográficas para sustentar sus argumentos, apóyese de la investigación previa. Las siguientes preguntas guía podrán utilizarse solo de apoyo para desarrollar su análisis.



Con base en la solubilidad, explique:

Químicamente en las pruebas de solubilidad, ¿por qué en algunos casos las muestras son solubles en los solventes empleados? ¿y en otras no?, justifique con las fórmulas y las características químicas de cada uno.

Con base en la extracción, explique:

¿Por qué se realiza la extracción con la mezcla de cloroformo-metanol?

¿En cuál fase, de los componentes de la mezcla, se encuentran los lípidos?

¿Qué sucede con los componentes de interés al evaporar la fase clorofórmica?

Con base en la cromatografía, explique:

¿Por qué se considera útil, en esta práctica, el empleo de la cromatografía bidimensional?

Explique cómo influye en la separación cromatográfica, la polaridad y proporción de los solventes empleados en cada cámara, emplee las estructuras de las muestras y los solventes

Con base en la Cámara cromatográfica, explique:

Cámara 1: Cloroformo:Metanol 50:50

¿Qué componentes lipídicos se separan con esta mezcla? Justifique químicamente su respuesta

Cámara 2: Cloroformo: metanol: ácido acético: agua 64:24:8:4

¿Qué pasa con la polaridad de la mezcla?, ¿los componentes lipídicos se separan con dicha fase? Justifique químicamente su respuesta

Con base en el revelado, explique:

Al observar el revelado, ¿qué ocurre al hacer incidir luz ultravioleta en el cromatograma?.

Explique y justifique la reacción y condiciones empleadas en el ensayo con ninhidrina e indique que componentes se hacen evidentes.

¿Qué componentes se hacen evidentes al utilizar Bismutato como revelador?

Fundamente químicamente

¿Qué componentes se hacen evidentes al utilizar Molibdato como revelador?

Fundamente químicamente



MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. Si tiene dudas consulte a su asesor

BIBLIOGRAFÍA

1. Bohinsky, R. (1998). "Bioquímica". (5ª ed.) México: Editorial Pearson Education.
2. Campbell, K. y Rell, O. (2004). "Bioquímica". México: International Thomson Editores, México.
3. Nelson, D. y Cox, M. (2000). "Lehninger. Principios de Bioquímica". (3ª ed.) España: Omega.
4. Murray, K., Granner, K., Mayes, A. y Rodwell, W. (2007). "Bioquímica de Harper". (17ª ed.) México: El Manual Moderno.
5. Rendina, G. (1974). "Técnicas de bioquímica aplicada". México: Interamericana.



PRÁCTICA 7

TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS

INTRODUCCIÓN

Las proteínas en su acepción más simple se consideran polímeros de elevado peso molecular formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

En sentido general el término aminoácido se refiere a cualquier molécula que tenga en su estructura química los grupos funcionales (-NH₂) y carboxilo (-COOH). Sin embargo, este término se ha convertido en la forma común de nombrar a las unidades monoméricas de las proteínas. Las miles de proteínas que existen en las diferentes células, tienen estructura y función muy diferentes, están constituidas por sólo 20 aminoácidos.

Los aminoácidos, que forman a las proteínas, tiene los grupos funcionales αL-amino (-NH₂) y αL-carboxilo (-COOH), ambos unidos al mismo átomo de carbono, el carbono α, que presenta otros dos sustituyentes; una cadena lateral diferente para cada aminoácido que se designa como (R) e Hidrógeno (H) como cuarto sustituyente.

Los aminoácidos se pueden clasificar con base en criterios fisicoquímicos y se les clasifica de acuerdo a la polaridad de sus cadenas laterales R, a pH de 7 en: no polares, polares sin carga, iónicos.

Así también un aminoácido al tener en su molécula dos grupos ionizables presenta una reacción interna ácido-base, lo que da lugar a un ión dipolar, llamado *zwitterión* (del alemán *zwitter*: "híbrido"), esta es la forma química de los aminoácidos.

El comportamiento iónico y el papel amortiguador de los aminoácidos dependen de la presencia de los grupos funcionales amino y ácido, dicho comportamiento se relaciona con la capacidad de ionización de esos grupos funcionales. El grupo amino puede aceptar un protón transformándose en un catión, en tanto que el grupo ácido puede donar un protón y convertirse en anión. Ambos procesos de ionización son reacciones reversibles, cuya constante de equilibrio tiene un valor específico para cada aminoácido. Cuando el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas (*zwitterión*), el aminoácido no tiene carga neta, por lo que en presencia de un campo eléctrico se mantiene inmóvil sin desplazarse hacia ninguno de los polos, el pH al que esta especie iónica es la forma predominante, es el punto isoeléctrico (pI) del aminoácido, a valores de pH inferiores al punto isoeléctrico la especie iónica predominante es la forma catiónica del aminoácido, ion que en un campo eléctrico se desplaza hacia el cátodo. A valores de pH mayores que el punto isoeléctrico, predomina la especie aniónica, es decir, el aminoácido se dirige hacia el ánodo si se somete a un campo eléctrico. Esto explica la actividad amortiguadora de los aminoácidos, ya que pueden actuar como aceptores y como donadores de protones.



El equilibrio ácido-base nos explica el importante papel amortiguador que desempeñan los aminoácidos en los fluidos orgánicos, al igual que los péptidos y las proteínas.

OBJETIVO

Determinar en forma práctica los valores de pK de un aminoácido, mediante el método de titulación por neutralización y comparar los valores obtenidos experimentalmente con los valores teóricos para su identificación.

PREGUNTAS PREVIAS

1. Fórmula general de un aminoácido
2. Comportamiento ácido-base de los aminoácidos
3. ¿Qué representa el pK de un grupo carboxilo o de un grupo amino?
4. Indicar si los aminoácidos pueden usarse como amortiguadores y explicar en qué casos.
5. ¿Cuál es el fundamento del potenciómetro?

MATERIAL Y REACTIVOS

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
70 mL de solución de 5 aminoácidos diferentes 0.06M	en HCl 0.005M, pH de 1.0
50 mL de soluciones amortiguadoras de referencia pH 4, pH 7 y pH 10	para calibrar el potenciómetro
300 mL de solución de HCl 0.1N	
300 mL de solución de NaOH 0.1N	
20 Tiras reactivas de pH	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La parte experimental se realizará cada dos equipos. Uno de ellos titulará con HCl y otro con NaOH.

1. En un vaso de precipitados de 100 mL, coloque una alícuota de 30 mL de la solución del aminoácido
2. Coloque el vaso sobre una parrilla de agitación e introduzca la barra magnética, cuidadosamente, evite que salpique
3. Coloque la solución titulante que corresponda (HCl o NaOH) 0.1N en la bureta



4. Calibre el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras, según las indicaciones
5. Mida el pH de la solución titulante (HCl o NaOH) y anote los resultados
6. Coloque el electrodo dentro del vaso que contiene el aminoácido, evitando que toque las paredes del vaso y cuidando que esté dentro del líquido. Tenga cuidado de no golpear el electrodo con el agitador
7. Mida el pH inicial del aminoácido y anote
8. Inicie la titulación, adicionando volúmenes de 0.5 mL y midiendo el pH en cada adición
9. En la tabla de resultados anote los valores de pH para cada volumen
10. Adicione tanto HCl o NaOH como sea necesario, hasta alcanzar el pH de la solución del titulante
11. Registre los resultados de ambos equipos, para poder realizar la gráfica correspondiente completa

OBSERVACIONES Y RESULTADOS

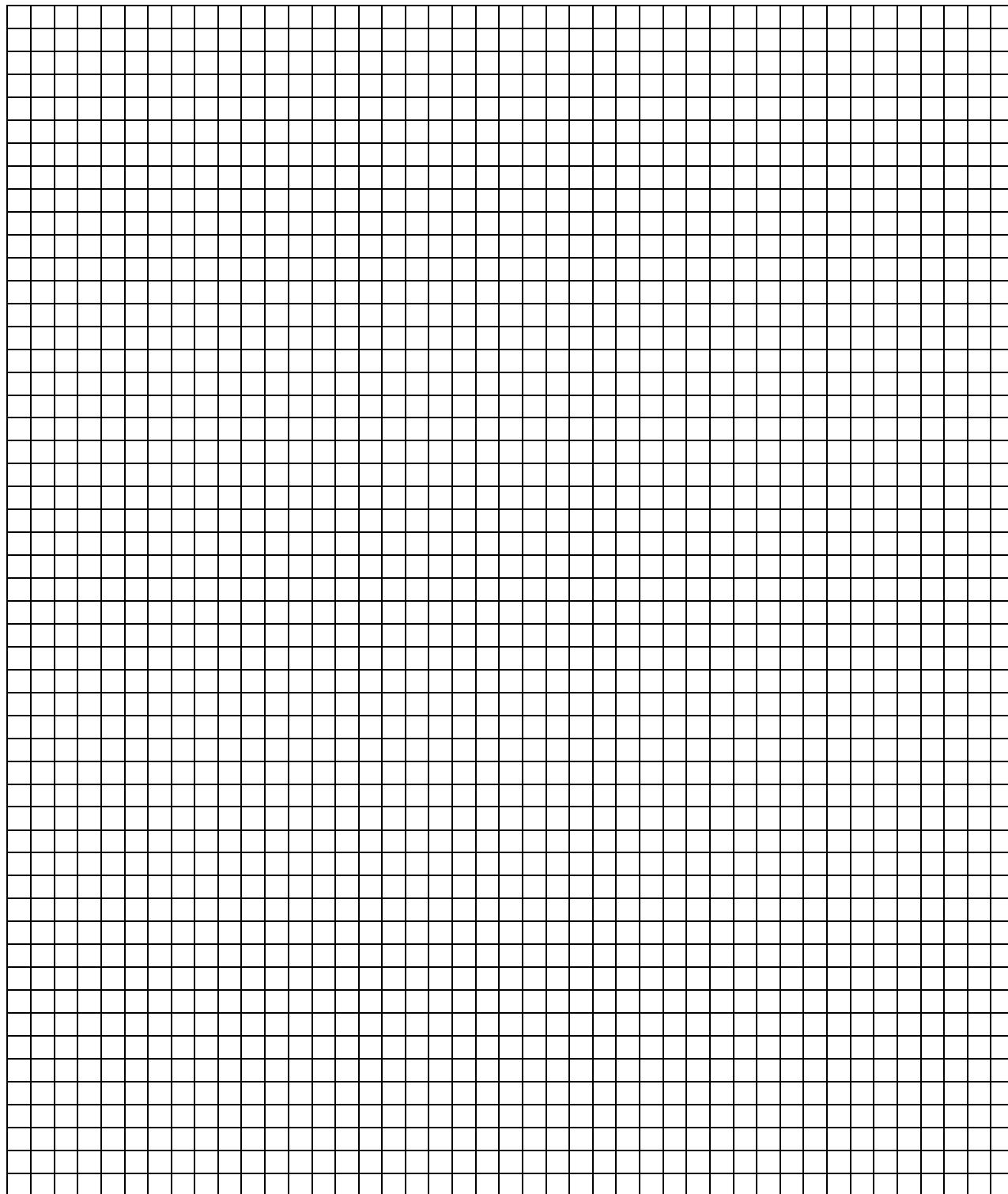
pH del HCl: _____

pH de NaOH: _____

mL DE HCL AÑADIDO	VALOR DE pH	mL DE NaOH AÑADIDO	VALOR DE pH



Con los resultados obtenidos elaborar una gráfica, colocando en el eje de las abscisas el volumen de NaOH y en el eje de las ordenadas el valor de pH. Obtener valores de pK del aminoácido y compararlos con valores reportados en la bibliografía.





DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Compare las diferentes valores de pka y el pl obtenidos de manera gráfica con una tabla de valores de pka y proponga de que aminoácido podría tratarse, justifique químicamente. Indique si la experimentación se llevó a cabo sin inconvenientes

Explique como la estructura química de los aminoácidos permite realizar una titulación con un ácido y también con una base.

Explique cómo obtuvo los datos a partir de la gráfica.

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. Si tiene dudas consulte a su asesor.

BIBLIOGRAFÍA

1. González E., Bucio, L., Damián, P., Díaz de León, F., Cortés, E. y Pérez, L. (2002). "Manual de Bioquímica 1". México: UAM Unidad Iztapalapa.
2. Williams, B. (1981). "Principios y técnicas de bioquímica experimental". Barcelona, España: Omega.
3. Bohinski, R. (1991). "Bioquímica". (5ª ed.) México: Addison-Wesley Iberoamericana.



PRÁCTICA 8

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES QUE ALTERAN SU SOLUBILIDAD

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son biopolímeros de elevado peso molecular, formadas por aminoácidos unidos por enlace peptídico; son macromoléculas fundamentales en la morfología y fisiología celular. Tienen la capacidad de desempeñar una gran diversidad de funciones entre las que destacan su papel como: enzimas, hormonas, medio de transporte, anticuerpos, toxinas, antihemorrágicas, almacén, sostén tisular, etc.

Existen diversas formas de clasificar a las proteínas que se basan en características como son: solubilidad, composición, conformación en el espacio, papel que desempeñan en la célula, desde un punto de vista nutricional, etc. Por su composición se clasifican en simples y conjugadas; por su conformación en el espacio en fibrosas y globulares; de acuerdo al papel que desempeñan dentro de la célula en estructurales y funcionales; con base en la complejidad de su estructura en primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La composición y secuencia aminoácida de las proteínas les confiere características muy importantes como son: carácter anfótero, movilidad electroforética, carga, solubilidad, absorción de energía radiante, capacidad amortiguadora, conformación en el espacio, afinidad biológica con otras moléculas, etc; finalmente todas estas características condicionan y determinan la función de una proteína en especial, y además permiten hacer uso de diferentes métodos de separación y purificación.

Algunos de los métodos utilizados para la separación y purificación de proteínas son: diálisis, liofilización, centrifugación, precipitación salina, cromatografía de afinidad, de exclusión molecular, electroforesis, ultracentrifugación, ultrafiltración, etc. Para cuantificar proteínas el bioquímico dispone de varios métodos como: el de Folin y Ciocalteu, Biuret, y Lowry, todos ellos de tipo colorimétrico.

OBJETIVO

Separar las proteínas de la leche mediante cambios de pH para cuantificar proteínas totales por dos técnicas diferentes, así como, verificar los factores que alteran la solubilidad de las proteínas en soluciones acuosas.



PREGUNTAS PREVIAS

- 1.- Explique los siguientes términos: péptido, polipéptido y proteína.
- 2.- De por lo menos tres tipos de clasificación de proteínas.
- 3.- Describa las funciones que las proteínas pueden desempeñar.
- 4.- Explique y esquematice la desnaturalización proteica e indique que factores la provocan.
- 5.- ¿Es posible renaturalizar una proteína desnaturalizada? Explique.
- 6.- Explique 2 métodos de separación de proteínas.
- 7.- ¿Qué proteínas se encuentran en la leche y el huevo?
- 8.- ¿Cuál es el fundamento del método de Biuret para la cuantificación de proteínas? Explique.

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

Leche descremada	1 huevo
1 limón	

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACION
500 mL de NaCl al 0.9%	2.25g de NaCl en 250 mL de agua destilada
30 mL de HCl al 2% en frasco gotero	4.54 mL de HCl y aforar a 100 mL con agua destilada
30 mL de (NH ₄) ₂ SO ₄ saturado	100g de sulfato de amonio en 250 mL
50 mL albúmina (5mg de albúmina sérica/mL)	250mg de albúmina en 50 mL de NaCl 0.9% Disolver la albúmina en la mitad del disolvente, agitando lentamente y evitando la formación de espuma. Una vez disuelta transferir a un matraz volumétrico y aforar
150 mL de reactivo de Biuret	Disolver 1.5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato doble de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada. Adicionar 300 mL de hidróxido de sodio al 10 % con agitación constante. Agregar 1 g de yoduro de potasio y agitar hasta que se disuelva. Aforar a 1 L con agua destilada. Guardar en frasco ambar.
10 mL de caseína 1mg/mL	
50 mL acetona Q.P.	
50 mL etanol al 96°	
1/2 pliego de papel filtro	



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. SEPARACIÓN DE CASEÍNA DE LECHE

- Diluya 10 mL de leche descremada con 20 mL de agua destilada
- Añada lenta y cuidadosamente gotas de limón hasta que observe precipitación

Nota: En el punto isoeléctrico una proteína presenta su mínima solubilidad y por tanto precipita. El punto isoeléctrico de la caseína es de 4.8

- Agite suavemente y transfiera a tubos de centrifuga
- Centrifugue a 2500 rpm durante 10 min
- Una todo el sobrenadante y rotúlelo como L
- Deje los tubos en la gradilla con la boca hacia abajo hasta terminar la los demás experimentos.
- Saque el precipitado de los tubos y colóquelo en un pape filtro previamente pesado. Lave el precipitado con 1 mL de etanol y posteriormente con 1 mL de acetona
- Deje secar el precipitado varios días y obtenga por diferencia el peso de la caseina

2. DILUCIÓN DE ALBÚMINA DE HUEVO

- Pese un huevo. Separe la clara y mida el volumen total
- Diluya 5 mL de clara de huevo con 15 mL de solución de NaCl al 0.9%
- Filtre la solución sobre gasa y mida el volumen obtenido
- Recoja el filtrado y rotularlo como H

3. COMPROBACIÓN DE LOS FACTORES QUE ALTERAN LA SOLUBILIDAD PROTEICA

- Tome por separado en tubos de ensaye, 4 alícuotas de 1 mL cada una del sobrenadante de leche (L) y del filtrado de huevo (H), rotúlelo cada uno como L₁, L₂, L₃, L₄; H₁, H₂, H₃, H₄, según corresponda
- Adicione a los tubos 1, 1 mL de HCL al 2%
- Adicione a los tubos 2, 1 mL de acetona
- Adicione a los tubos 3, 1 mL de (NH₄)₂SO₄ saturado
- Caliente en un baño a ebullición los tubos L₄ y H₄
- Haga sus observaciones



4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BIURET

1. Prepare una serie de tubos para la curva patrón de la siguiente manera:

- Disponga de una solución patrón de albúmina en NaCl al 0.9% de concentración 5 mg de albúmina sérica por mililitro
- Prepare una serie de tubos que contengan cantidades crecientes de solución patrón. De acuerdo al siguiente cuadro. El tubo No. 1 es el "tubo blanco o blanco de reactivos" (contiene todos los reactivos con excepción de la proteína)
- Se debe respetar el orden de adición de los reactivos**

Tubos

Prob L. Prob. H Prob. C

Reactivos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Albúmina patrón 5 mg/mL (mL)	-	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	-	-	-
Sobrenadante L (mL)	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-
Filtrado H (mL)	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-
Caseína problema	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
NaCl al 0.9 % (mL)	3.5	3.4	3.2	3.0	2.5	2	2.5	3.4	3.0
Reactivo de Biuret (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

d).

Prepare simultáneamente los tubos 7, 8 y 9, son los tubos problema de suero de leche, filtrado de clara de huevo y caseína.

- Mezcle con cuidado cada uno de los tubos. Incube en un baño de agua a 50° C durante 10 min, para desarrollar el color. Los colores que aparecen son estables durante 1 hora
- Lea en un espectrofotómetro a 540 nm
- Trace la curva D.O. vs C (mg/mL) de proteína y por interpolación obtenga la cantidad de proteína de cada muestra problema
- Obtenga la cantidad total de caseína presente en la muestra de leche que usted trabajó
- Calcule la concentración de proteína por mL de clara de huevo



OBSERVACIONES Y RESULTADOS

FACTORES QUE ALTERAN LA SOLUBILIDAD PROTEICA

MUESTRA	OBSERVACIONES
H ₁	
H ₂	
H ₃	
H ₄	
L ₁	
L ₂	
L ₃	
L ₄	

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

No. TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C (mg/mL)									
D.O (Absorbancia)									

Leche

Dilución inicial 10 mL de leche + 25 agua destilada= 35 mL Volumen empleado para Biuret 1 mL. Color del tubo después de la reacción _____ Lectura _____

Clara de huevo

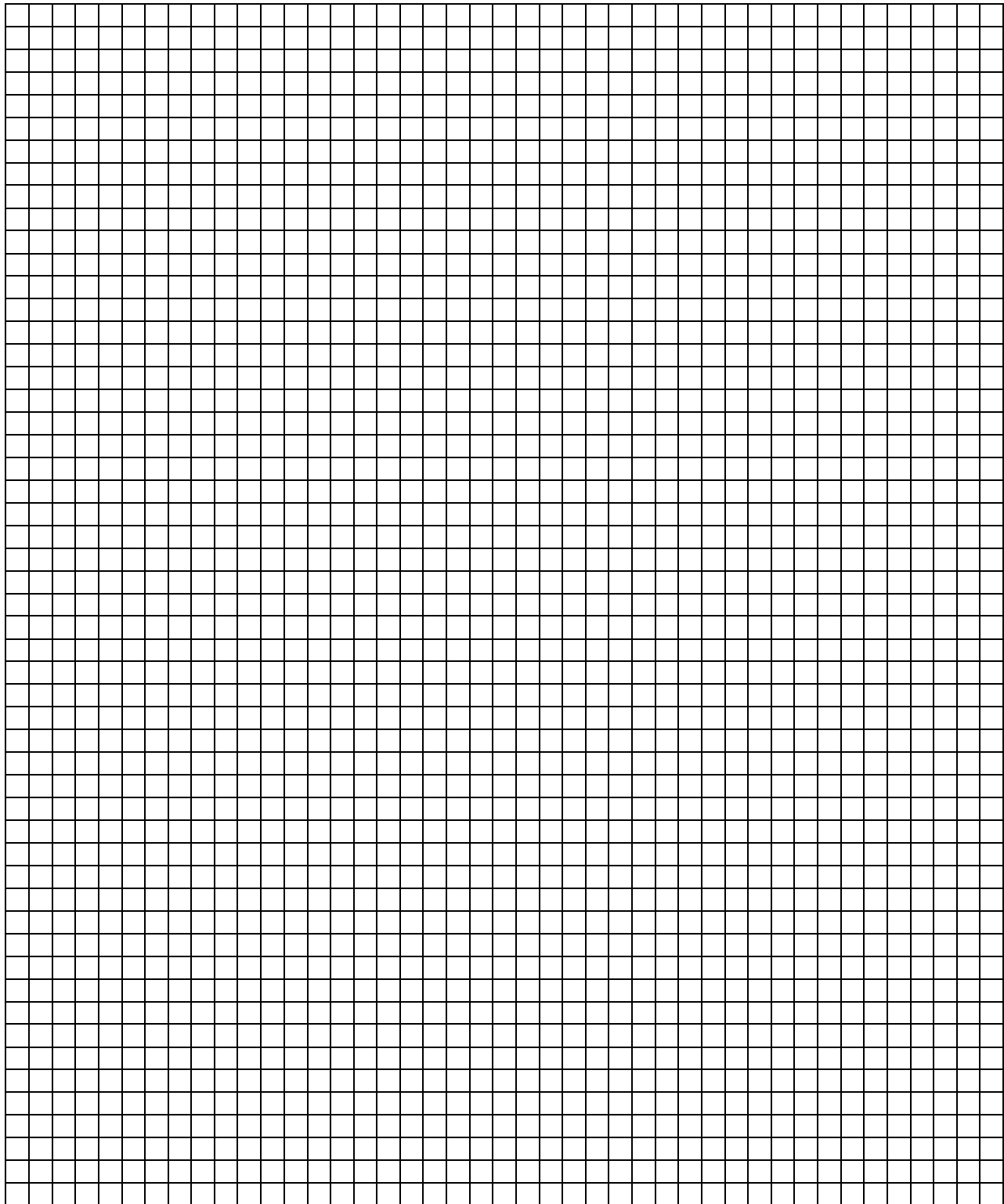
Peso del huevo entero _____ g volumen de clara _____ mL

Dilución inicial: 5 mL clara + 15 mL de NaCl volumen del filtrado _____

Muestra para biuret 0.1 mL

Color del tubo después de la reacción _____

Absorbancia _____





DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

NOTA: El trabajo lo deben realizar en equipo. Recuerden que deben redactar empleando enunciados cortos. Consideren estos puntos para su discusión, sin embargo, no son preguntas. Por otro lado, se pueden considerar más puntos que sean de interés que no estén contemplados en estos puntos mínimos. Recuerden que se deben considerar los resultados que obtuvieron como equipo.

Principales componentes del huevo y la leche, mencione las principales proteínas.

Fenómeno que ocurre al agregar limón a la leche.

Función del etanol y acetona con el precipitado obtenido.

Explicar lo que ocurre con cada una de las muestras y con cada uno de los factores que afectan la solubilidad proteica, que proteínas son las que se estarían afectando.

Explicar lo que ocurre con la cuantificación de proteínas en la leche.

Comparar los valores de proteínas obtenidas con lo reportado por los fabricantes.

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. Si tiene dudas consulte a su asesor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bohinsky, R. 1998. "Bioquímica". Quinta Edición, Editorial Pearson Education, México, D. F.
2. Nelson, D. y Cox, M. 2000. Lehninger, "Principios de Bioquímica". Tercera Edición, Editorial Omega, España.
3. Williams, B. 1981. "Principios. y técnicas de Bioquímica Experimental". Editorial Omega, Barcelona, España
4. Rendina, G. 1974. "Técnicas de bioquímica aplicada". Editorial Interamericana, México, D. F.



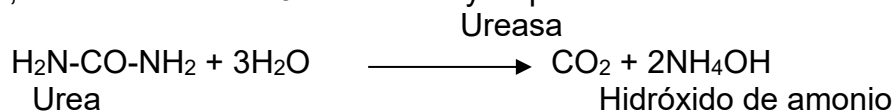
PRÁCTICA 9 CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA UREASA

INTRODUCCIÓN

De todas las funciones de las proteínas, la catálisis es tal vez de las más importantes. En ausencia de catálisis, casi todas las reacciones de los sistemas biológicos se llevarían a cabo con demasiada lentitud. Los catalizadores que desempeñan esta función en los organismos se llaman enzimas.

La cinética enzimática es una parte de la bioquímica que se encarga del estudio de la velocidad de las reacciones enzimáticas y de los factores que la afectan. Algunos de ellos son: la temperatura, el pH, la concentración de enzima, la concentración de sustrato, el tiempo, presencia o ausencia de moduladores, cofactores, inhibidores, etc. Todos estos factores determinan la actividad de una enzima y existe para cada una de ellas condiciones bajo las cuales su actividad se considera óptima.

La ureasa o amino urea hidrolasa (E.C. 3.5.1.5.) es una metaloenzima-níquel dependiente, con peso molecular de 483 kDa, cataliza la hidrólisis de urea a hidróxido de amonio y dióxido de carbono, a una velocidad 10^{14} veces mayor que una reacción no catalizada.



La ureasa está presente en muchas plantas, hongos, algas y bacterias, tiene un papel importante en el metabolismo del nitrógeno en la naturaleza. Tanto las plantas como los microorganismos descomponen una gran variedad de fuentes de urea en su medio ambiente.

El sitio activo de la ureasa se encuentra en la subunidad alfa de la enzima conteniendo 2 Ni^{2+} . La ureasa contiene tres o cuatro grupos sulfhidrilos activos, algunos de los cuales están involucrados en el sitio activo, la oxidación de estos grupos puede ocasionar una inactivación reversible de la enzima. Metales como Ag^+ , Hg^{++} , Pb^{++} , Cu^{++} y otros, forman complejos con los grupos sulfhidrilos (-SH) inactivando a la enzima.

OBJETIVO

Realizar la extracción de la enzima ureasa de frijol de soya, mediante una homogeneización mecánica en mortero y analizar los factores: concentración de sustrato, T ($^{\circ}\text{C}$), pH y tiempo como modificadores de la velocidad de una reacción enzimática para determinar las condiciones óptimas de trabajo de la enzima.



INVESTIGACIÓN PREVIA

1. ¿Qué es la cinética enzimática? ¿Cómo se realiza una cinética enzimática?
2. ¿Qué factores modifican la velocidad de una reacción enzimática?
3. Investigue las gráficas teóricas de los factores que modifican la velocidad de reacción enzimática e indique qué datos se obtienen de cada una de ellas
4. Investigue el modelo de Michaelis-Menten.
5. ¿Qué es la K_m y la V_{max} , ¿cómo se calcula y que indica su valor?
6. anote cual es la reacción que cataliza la ureasa, estructuras y condiciones óptimas.
- 7.. ¿Cuál es el inhibidor de la ureasa empleado en la práctica y cómo actúa?
8. Explique y grafique los tipos de inhibición enzimática
9. ¿Cuál es el indicador que usará para titular? ¿
¿Cuál es su estructura química y las especies y colores que genera en medio ácido y básico?
10. ¿Cuál es la utilidad práctica de conocer una cinética enzimática? Ejemplifique a nivel doméstico y laboral.

MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL POR EQUIPO	MATERIAL POR GRUPO
1 bureta de 50 mL	1 vaso de precipitado de 600 mL
2 vaso de precipitado de 100mL	5 baños María con gradilla
20 tubos de ensaye grandes (15 cm x 2 cm)	3 tripies
	3 telas de asbesto
2 pipetas graduadas de 5 mL	3 mecheros
1 pipetas graduadas de 10 mL	7 termómetros
1 embudo de filtración	1 probeta graduada de 100 mL
6 matraces Erlenmeyer de 125 mL	5 pipetas graduadas de 5 ml
2 gradilla	7 vasos de precipitado de 50 ml
1 soporte universal	3 vasos de precipitado de 250 ml
1 pinzas para bureta	2 pipetas graduadas de 10 ml
1 piseta	1 embudo de vidrio
1 pinza para tubo de ensaye	10 propipetas
2 propipetas	6 vaso de precipitado de 100 mL

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
300 mL de solución de etanol al 30%	90 mL de etanol absoluto en 300 mL de agua destilada.
250 mL de solución de urea 0.25 M	3.75 g de urea aforados a 250 mL con agua destilada
150 mL de Buffer de fosfatos pH 4.5	



150 mL de Buffer de fosfatos pH 6.0	
300 mL de Buffer de fosfatos pH 7.2	
150 mL de Buffer de fosfatos pH 8.5	
150 mL de Buffer de fosfatos pH 10.0	
bicloruro de mercurio al 1 % (2 frascos gotero con 10 mL c/u)	1g de bicloruro de mercurio en 100 mL de agua destilada.
HCl al 0.1 N	
Solución de rojo de metilo al 1% (2 frascos gotero con 10 mL c/u)	1g de rojo de metilo en 100 mL de etanol al 96°
10L de agua destilada	
parafilm	
hielo	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

EXTRACCIÓN DE LA UREASA

1. Un solo equipo colocará en el vaso de precipitado de 600 mL 300 frijoles de soya con 400 mL de etanol al 30% y los homogeneizara con ayuda de un procesador de aspas. Tape el vaso durante el proceso para que no salpique y homogeneice, aproximadamente 3 minutos, hasta que todos los frijoles se hayan molido y en el fondo del vaso se encuentre un sedimento fino.
2. Filtrar sobre gasa doble recibiendo el filtrado en un vaso de precipitado de 600 mL y etiquetar perfectamente como extracto enzimático (ureasa).

Preparación de los sistemas de trabajo.

Rotule de acuerdo al factor que vaya a trabajar el número de tubos necesario por ejemplo en el caso de pH: blanco pH 4.5 y problema pH 4.5 una vez rotulados todos colóquelos en la gradilla y proceda a preparar los sistemas de acuerdo a las tablas

Es indispensable respetar el orden de adición de los reactivos y condiciones de trabajo

Deben prepararse simultáneamente los tubos blancos y problema de cada factor.

Una sola persona pipetea para disminuir variantes.



EFECTO DEL PH SOBRE LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN

Colocar en una gradilla los siguientes tubos, que serán los blancos:

Tubo	1	2	3	4	5
Urea 0.25M (mL)	5	5	5	5	5
Sol. Buffer de pH	5	6	7.2	8.5	10
(mL)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4
Incubar a 50° C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	1	1	1	1	1
Incubar a 50° C durante 30 min.					

Preparar los tubos problema de la siguiente forma:

Tubo	1	2	3	4	5
Urea 0.25M (mL)	5	5	5	5	5
Sol. Buffer de pH	5	6	7.2	8.5	10
(mL)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Incubar a 50° C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	1	1	1	1	1
Incubar a 50°C durante 30 min.					
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4

Al término del tiempo de incubación, transferir 5 mL del tubo blanco número 1 a un matraz etiquetado y a otro matraz distinto 5 mL del tubo problema número 1 y agregar 2 gotas de rojo de metilo.

Titular con HCl 0.05 N hasta el vire de color rojo canela.

Nota: En todos los casos la titulación debe realizarse por parejas (blanco - problema)

Repetir los pasos 3 y 4 para los tubos 2, 3, 4 y 5

Registrar sus resultados en la tabla correspondiente



EFFECTO DEL TIEMPO EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

Colocar en una gradilla los siguientes tubos, que serán los blancos:

Tubo	1	2	3	4	5
Urea 0.25M (mL)	5	5	5	5	5
Sol. Buffer pH 7.2 (mL)	3	3	3	3	3
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4
Incubar a 50° C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	1	1	1	1	1
Incubar a 50° C durante _____ min.	10	20	30	40	50

Preparar los tubos problema de la siguiente forma:

Tubo	1	2	3	4	5
Urea 0.25M (mL)	5	5	5	5	5
Sol. Buffer pH 7.2 (mL)	3	3	3	3	3
Incubar a 50° C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	1	1	1	1	1
Incubar a 50° C durante _____ min.	10	20	30	40	50
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4

Al término del tiempo de incubación, transferir 5 mL del tubo blanco número 1 a un matraz etiquetado y a otro matraz distinto 5 mL del tubo problema número 1 y agregar 2 gotas de rojo de metilo.

Titular con HCl 0.05 N hasta el vire de color rojo canela.

Nota: En todos los casos la titulación debe realizarse por parejas (blanco - problema)

Repetir los pasos 3 y 4 para los tubos 2, 3, 4 y 5

Registrar sus resultados en la tabla correspondiente



EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN

Colocar en una gradilla los siguientes tubos, que serán los blancos:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Urea 0.25M (mL)	0.2	0.5	0.7	1	1.5	2
Buffer de fosfatos pH 7.2 (mL)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Agua destilada (mL)	4.8	4.5	4.3	4	3.5	3
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4	4
Incubar a 50° C durante 5 min.						
Ureasa (mL)	1	1	1	1	1	1
Incubar a 50°C durante 30 min.						

Preparar los tubos problema de la siguiente forma:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Urea 0.25M (mL)	0.2	0.5	0.7	1	1.5	2
Buffer de fosfatos pH 7.2 (mL)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Agua destilada (mL)	4.8	4.5	4.3	4	3.5	3
Incubar a 50° C durante 5 min.						
Ureasa (mL)	1	1	1	1	1	1
Incubar a 50°C durante 30 min.						
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4	4

Transferir 5 mL de los tubos blanco 1 y problema 1 a matraces diferentes y agregar 2 gotas de rojo de metilo

Titular con HCl 0.05 N hasta el vire de color rojo canela.

Repetir los pasos 3 y 4 para los tubos 2, 3, 4, 5 y 6.

Registrar sus resultados en la tabla correspondiente



EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN

Antes de iniciar asegúrese de tener los baños de agua a 50°, 70° y 90°C

Preparar la siguiente serie de tubos blancos

Reactivos	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M (mL)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Sol Buffer pH 7.2 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sulfato de cobre al 1% (gotas)	4	4	4	4	4
Incubar 5 minutos a	0° C	T° ambiente	50° C	70° C	90° C
Extracto de ureasa (mL)	1	1	1	1	1
Incubar 30 minutos a	0° C	T° ambiente	50° C	70° C	90° C

2. Prepare la siguiente serie de tubos problemas

Reactivos	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M (mL)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Sol Buffer pH 7.2 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Incubar 5 minutos a	0° C	T° ambiente	50° C	70° C	90° C
Extracto de ureasa (mL)	1	1	1	1	1
Incubar 30 minutos a	0° C	T° ambiente	50° C	70° C	90° C
Sulfato de cobre al 1% % (gotas)	4	4	4	4	4

Transferir por separado 5 mL del tubo 1 blanco y del tubo 1 problema a matraces etiquetados, agregar a cada uno 2 gotas de rojo de metilo

Titular con HC1 0.1N hasta el vire a color canela

Repetir los pasos 3 y 4 para los tubos 2, 3 y 4.

Registrar sus resultados en la tabla correspondiente



RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Para cada factor hay dos tablas, la de arriba es para los resultados de su mesa, la de abajo sus profesores le indicarán que resultados anotar.

Efecto del pH sobre la velocidad de la reacción. Equipo:

Tubo	pH	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μ moles de urea hidrolizadas/ 30 min
1					
2					
3					
4					
5					

Efecto del pH sobre la velocidad de reacción. Equipo:

Tubo	pH	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μ moles de urea hidrolizadas/ 30 min
1					
2					
3					
4					
5					



Efecto del tiempo en la velocidad de reacción. Equipo:

Tubo	Tiempo (min)	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μ moles de urea hidrolizadas/X min
	10				
	20				
	30				
	40				
	50				

Efecto del tiempo en la velocidad de reacción. Equipo:

Tubo	Tiempo (min)	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μ moles de urea hidrolizadas/X min
	10				
	20				
	30				
	40				
	50				



Efecto de la temperatura en la velocidad de la reacción

Tubo	T (°C)	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μmoles de urea hidrolizadas/30 min
1					
2					
3					
4					
5					

Efecto de la temperatura en la velocidad de la reacción

Tubo	T (°C)	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μmoles de urea hidrolizadas/30 min
1					
2					
3					
4					
5					



Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción

Tubo	Concentración inicial de urea en mmoles/mL en el medio	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μmoles de urea hidrolizadas/30 min
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción

Tubo	Concentración inicial de urea en mmoles/mL en el medio	Volumen de titulación del blanco	Volumen de titulación del problema	Volumen de titulación corregido	μmoles de urea hidrolizadas/30 min
1					
2					
3					
4					
5					
6					



CÁLCULOS

Velocidad de reacción

Calcular los micromoles de urea hidrolizados para cada uno de los tubos, teniendo en cuenta que la urea al hidrolizarse produce dos iones de amonio que reaccionan con el HCl 0.05 N que contienen 50 micromoles/mL, de tal manera que los micromoles de urea hidrolizados se obtienen multiplicando el valor de titulación corregido (VTC) de cada tubo por 25

Micromoles de urea hidrolizada = VTC x 25

$$VTC = VTP - VTB$$

donde VTP = Volumen de titulación del problema y

VTB = Volumen de titulación del blanco.

NOTA: Verificar que la concentración del HCl sea 0.05 N, de lo contrario se debe ajustar el cálculo anterior.

Micromoles de urea hidrolizada/ 30 min = serán los micromoles de urea hidrolizados en 30 min de incubación

Estos 30 minutos deben sustituirse por los minutos de incubación en el factor tiempo y

Concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.

Calcular los milimoles de urea iniciales por mL para cada uno de los tubos, teniendo en cuenta que cada mL de la solución 0.25 M de urea contiene 250 micromoles/mL considerar el volumen total en cada tubo.

Construir las gráficas correspondiente V.R. (velocidad de reacción) contra cada uno de los factores trabajados : pH, T°C, t(min) y concentración de sustrato

tomando en cuenta que la velocidad de reacción se expresa en micromoles/ 30 min

Calcular la Km e indicar qué representa su valor.

Determinar las condiciones de pH y T óptimas de trabajo de la ureasa.

Analizar el comportamiento de la gráfica de tiempo.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Los puntos referidos a continuación son una guía para realizar el análisis de resultados, no se pide que resuelvan como cuestionario. Recuerda redactar un párrafo por cada punto a analizar donde justifiquen químicamente y argumenten sus resultados, toma en cuenta lo siguiente:

Explique qué tipo de enzima es la ureasa, cuál es su reacción y los productos obtenidos además de la importancia de controlar los factores estudiados en la cinética enzimática de la ureasa.

De acuerdo con la reacción de la ureasa justifica la forma de cuantificar el producto de la reacción de esta enzima. Debes incluir la función de cada reactivo que se agrega a los tubos de reacción.

- De los gráficos generados de velocidad de reacción contra cada uno de los factores que se trabajaron experimentalmente indique sobre el gráfico los valores óptimos que se observan en cada caso. ¿Los gráficos obtenidos con sus datos experimentales, cumplen con el comportamiento teórico? Justifique su respuesta

Calcula el valor de K_m y Velocidad máxima de reacción de acuerdo con la gráfica de concentración de sustrato.

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los desechos sólidos e gases y frijol se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. El contenido de los tubos y matraces de titulación se colocan en un frasco debidamente rotulado. Si tiene dudas consulte a su asesor.

REFERENCIAS

- Flores, L., Sánchez, S. y Uribe, S. (año). *Bioquímica. Manual de Prácticas*. México, DF: Mc Graw-Hill Interamericana Editores.
- Higson, S. y Balderas, P. (2007). *Química Analítica*. México, DF: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Coyne, G. (1997). *The Laboratory Companion. A Practical Guide to Materials, Equipment and Technique*. USA: John Wiley & Sons.
- Day, R. y Underwood, A. (1989). *Química Analítica Cuantitativa* (5ª ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Frasman, G. (1989). *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. USA: CRC Press



PRÁCTICA 10

EXTRACCIÓN DE DNA

INTRODUCCIÓN

La capacidad de las células para reproducirse y transmitir su información genética se debe a los ácidos nucleicos ya que éstos almacenan esa información. El DNA (ácido desoxirribonucleico) y el RNA (ácido ribonucleico) son los que conocemos como ácidos nucleicos, a excepción de algunos virus, todos los sistemas biológicos utilizan el DNA como molécula almacenadora de información. La mayor parte de la estructura y la bioquímica de las células se debe a sus proteínas y el tipo de proteínas están presentes en un organismo está determinada por la secuencia del DNA. La información no fluye directamente del DNA a la proteína, antes tiene que pasar por la molécula de RNA mediante un proceso conocido como transcripción. A continuación la secuencia de RNA se traduce en una secuencia de proteína en los ribosomas, lo que se conoce como traducción proteica.

Los ácidos nucleicos son polímeros lineales cuya unidad repetitiva es el nucleótido, cada nucleótido consta de tres componentes: un éster fosfórico, una pentosa y una base nitrogenada. En el caso del RNA el azúcar es una ribosa y en el DNA la desoxirribosa. Las bases nitrogenadas presentes en el DNA son la adenina, guanina, timina, citosina y en el RNA el uracilo, está en lugar de la timina. El orden en el cual estas bases nucleotídicas aparece en el ácido nucleico, codifica la información contenida en la molécula. En otras palabras, las bases nucleotídicas sirven como una suerte de alfabeto genético donde está codificada la estructura de cada proteína de nuestros cuerpos. La estructura secundaria del DNA es una molécula helicoidal, en esta estructura, los esqueletos de azúcar y fosfato se encuentran en la parte exterior de la hélice. Las zonas aniónicas están en contacto con el agua, estas estructuras son solubles en agua, esto es importante ya que interactúan con el medio acuoso de las células vivas.

El RNA es el principal material genético que conforma a los virus, y este es importante en la producción de proteínas en los organismos vivos. Se ha clasificado al RNA en: de transferencia, ribosomal y mensajero, sin embargo existen otras variedades relacionadas con otras funciones celulares.

EXTRACCIÓN DEL DNA DE TEJIDOS

La extracción de DNA requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar tiene que romperse la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación debe romperse también la membrana nuclear para dejar libre el DNA. Por último hay que proteger el DNA de enzimas que puedan degradarlo y para aislarlo hay que hacer que precipite en etanol o isopropanol.



OBJETIVO

Realizar la extracción de DNA de células de tejidos vegetales y uno animal de manera sencilla, utilizando materiales de uso común, que se argumente cada paso de la metodología y se vean las fibras obtenidas para relacionar ésta molécula biológica presente en todos los seres vivos con la información genética que guarda.

INVESTIGACIÓN PREVIA

1. ¿Químicamente qué son los ácidos nucleicos y cuál es su función?
2. En una tabla enumerar las diferencias entre DNA y RNA
3. ¿Cuáles son las conformaciones estructurales más comunes del DNA?
4. ¿Cuál es la función de cada uno de los reactivos utilizados en la práctica?
5. ¿Cómo podría identificar si lo que se obtuvo es DNA?

MATERIAL Y REACTIVO

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
1 kiwi
1 cebolla
Detergente lavavajillas líquido sin cloro
NaCl
1 trozo de papaya con cáscara



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A. EXTRACCIÓN DEL DNA DE UNA CEBOLLA

1. Corte la zona central de una cebolla en cuadrados pequeños y pese 30 g.
2. En un vaso de precipitados de 250 mL agregue 10 mL de detergente líquido, 2 g de NaCl y 100 mL agua destilada.
3. Mezcle esta solución con los trozos de cebolla, en un vaso de precipitados de 600 mL. Homogenice con homogeneizador de aspas, a velocidad máxima durante 30 segundos.
4. Filtre sobre gasa el líquido obtenido a un vaso de precipitado de 100 mL hasta la mitad aproximadamente, quite la espuma del líquido obtenido.
5. Pique finamente un trozo de papaya, sin cáscara, colóquela en una gasa y exprima cuidadosamente, recolecte el jugo.
6. Añada 10 mL de jugo de papaya, recién preparado al filtrado obtenido en el punto 4 y mezcle bien.
7. Añada cuidadosamente etanol muy frío, en un volumen equivalente al del filtrado, haciéndolo resbalar por las paredes del vaso para que forme una capa sobre el filtrado. Utilice la varilla de vidrio para ayudarse.
8. Deje reposar durante 2 ó 3 minutos hasta que se forme una zona turbia entre las dos capas. A continuación introduzca la varilla y extraiga las fibras blancas de DNA.

B. EXTRACCIÓN DEL DNA DE KIWI

1. Prepare en un recipiente un baño de agua con hielo, de una profundidad entre 5 a 8 cm
2. Disponga un baño de agua caliente a 80°C de una profundidad entre 5 a 8 cm
3. Prepare la siguiente disolución de extracción de DNA: en un vaso de precipitados de 250 mL, disolver 2 g de NaCl en 90 mL de agua, agregue 10 mL de detergente líquido y agite con varilla de vidrio ¡muy suavemente!
4. Pelar el kiwi y cortarlo en trozos pequeños
5. Pesar 30 g de kiwi y homogeneizar en el mortero
6. Colocar el homogenado de kiwi en un vaso de precipitado de 100 mL
7. Verter la disolución de extracción de DNA (paso 3) sobre el homogenado de kiwi , de forma que el volumen total sea aproximadamente el doble del homogenado



8. Colocar el vaso de precipitados con la mezcla homogenado:disolución de extracción en el baño de agua caliente durante 15 minutos. Agitar ocasionalmente para distribuir el calor. La temperatura del baño no debe bajar de 60°C en ningún momento durante el periodo de incubación.
9. Después de los 15 minutos, transferir el vaso al baño de hielo y reposar allí por 5 minutos, agitarla ocasionalmente a medida que se enfría.
10. Filtrar sobre gasa recibiendo el filtrado en un vaso de precipitado de 100 mL.
11. Agregar cuidadosamente con pipeta graduada de 10 mL, 30 mL de etanol frío haciéndolo resbalar por las paredes del vaso para formar una fase alcohólica sobre el filtrado.
12. Observar lo que ocurre en la interfase entre el alcohol y el filtrado. Anotar tus observaciones.
13. Permitir que la disolución repose por dos minutos, sin moverla. Se formará un precipitado blanco en la interfase con el alcohol. Este es el DNA.
14. Si se desea, se puede recoger el DNA, enrollándolo en el palillo.

C. EXTRACCIÓN DE DNA DE SALIVA HUMANA

1. Un voluntario se enjuagará la boca vigorosamente con 25 mL de agua destilada, moviendo el agua de una mejilla a otra durante 30 segundos para desprender algunas células de las mejillas. Depositar el agua en un vaso de precipitados de 50 mL.
2. Añadir 5 mL de solución de extracción (preparada en el paso 3 de la extracción de DNA de kiwi).
3. Agitar la solución con varilla de vidrio, lentamente para que no se forme espuma.
4. Incorporar cuidadosamente 20 mL de etanol frío en el vaso de precipitados, resbalándolo por las paredes del vaso.
5. Observar la zona en que se juntan las dos capas y la formación de hilos de DNA, como filamentos nubosos que se estiran hacia la capa superior.

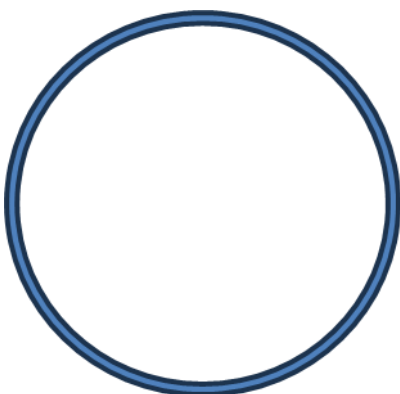


OBSERVACIONES Y RESULTADOS

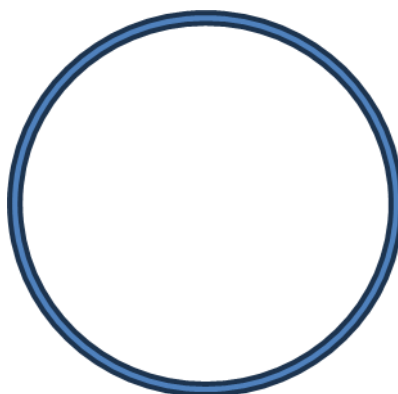
Representar en un dibujo como se observa el ADN extraído de cada una de las muestras, señala: las fases obtenidas indicando que tipo de fase es y qué es lo que contiene cada una

Vista superior del vaso con DNA extraído de:

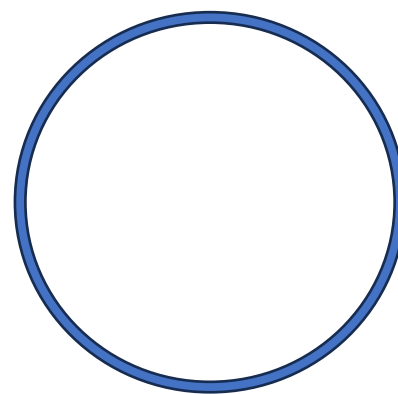
Cebolla



Kiwi o fresa

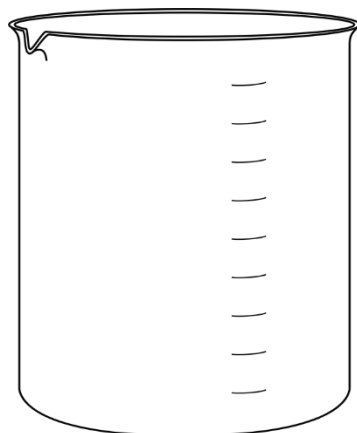


Células epiteliales

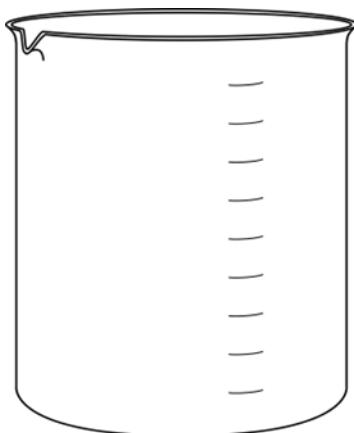


Vista lateral del vaso con DNA extraído de:

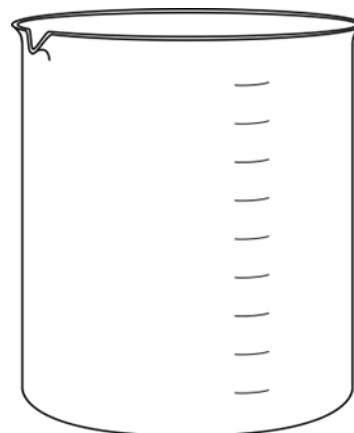
Cebolla



Kiwi o fresa



Células epiteliales





DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Explicar químicamente lo siguiente:

La función de los componentes de la solución de extracción: Agua, NaCl, detergente

En el caso de la cebolla: ¿porqué el homogeneizar con aspas? ¿Cuál es la enzima que tiene la papaya? ¿Qué tipo de enzima es y cuál es la función específica que realiza en la extracción del DNA?

¿En el caso del kiwi o las fresas porqué homogeneizar con mortero? ¿Cuál es la finalidad del aumento de temperatura durante la extracción, que moléculas específicamente interesa que se desnaturalicen? ¿Qué efecto provoca el choque térmico sobre el homogenado del kiwi?

Células epiteliales ¿Por qué no es necesario el uso de ningún homogeneizador? Fundamente. ¿Por qué se obtiene menor cantidad de DNA en la muestra de células epiteliales?

En todas las muestras... ¿Cuál es el efecto que provoca la adición del etanol frío sobre los extractos? Con base en sus resultados, ¿se encuentra el DNA totalmente puro? Justifique su respuesta.

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán, en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Los desechos sólidos se colocan en bolsas y depositan en los cestos de basura. Si tiene dudas consulte a su asesor.

REFERENCIAS

- Clark, D. (2005). "Molecular Biology". USA: Elsevier.
- Watson, J. (2003). "El Secreto de la Vida". España: Santillana Ediciones Generales.
- Flores A., Sánchez, S. y Uribe, S. "Bioquímica. Manual de Prácticas". México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores.
- Devlin, T. (2006). "Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas". (4ª ed.) España: Reverté.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 1. pH en sistemas biológicos

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 2. Manejo y cuidado del microscopio

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



-
-
-
-
-
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 3. Homogeneización, centrifugación y cromatografía

GRUPO _____ **Q** **FECHA** _____ **EQUIPO** _____

NOMBRE _____ **FIRMA** _____



-
-
-
-

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 4. Espectrofotometría y electroforesis

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



-
-
-
-

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 5. Reacciones de identificación de carbohidratos

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



-
-
-
-

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 6. Extracción, separación e identificación de lípidos

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 7. Titulación de aminoácidos

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



-
-
-
-

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 8. Cuantificación de proteínas y factores que alteran su solubilidad

GRUPO _____ **Q** **FECHA** _____ **EQUIPO** _____

NOMBRE _____ **FIRMA** _____



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 9. Cinética enzimática

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL

Practica 10. Extracción de DNA

GRUPO _____ Q FECHA _____ EQUIPO _____

NOMBRE _____ FIRMA _____

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 Nº Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Práctica 1: pH en sistemas biológicos

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Gradilla	2	
Tubos de ensaye 16 x 150 mm	20	
Pipeta graduada 10mL	1	
Pipeta graduada 5 mL	2	
Pipeta graduada 2 mL	1	
Vaso de precipitados 250mL	2	
Vaso de precipitados 100mL	2	
Propipeta	3	
Piseta	1	
Mechero	1	
Tripie	1	
Tela de asbesto	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

VALE DE MATERIAL

CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09

Nº Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____

NOMBRE DEL SOLICITANTE _____

No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____

NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO _____ **Práctica 2. Manejo y cuidado del microscopio**

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Portaobjetos	8	
Cubreobjetos	5	
Mechero	1	
Piseta	1	
Vidrio de reloj	1	
Microscopio	1	
Pipeta pasteur	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 N° Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Prác 3. Homogeneización, centrifugación y cromatografía

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Mortero con pistilo	2	
Tubos de ensaye 15 x 100	10	
Columna para cromatografía	1	
Pipeta graduada 2 ml	2	
Tubos de ensaye 16 x 150	10	
Pipeta graduada 10 ml	1	
Vaso de precipitados 100 ml	3	
Vidrio de reloj	1	
Gradilla	1	
Soporte universal	1	
Pinza para bureta	1	
Piseta	1	
Propipeta	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 N° Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Prác. 5. Pruebas de identificación de carbohidratos

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitados 600 mL	1	
Vaso de precipitados 50 mL	3	
Probeta 50 mL	1	
Tubos de ensaye 16x150 mm	20	
Pipeta graduada 1 mL	2	
Pipeta graduada 2 mL	2	
Pipeta graduada 10 mL	1	
Mechero Bunsen	1	
Placa de porcelana	1	
Gradilla	2	
Tripie	1	
Tela de asbesto	1	
Pinzas p/tubo de ensaye	3	
Piseta	1	
Varilla de vidrio	1	
Propipeta	3	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 Nº Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Prác. 6. Extracción, separación y caracterización de lípidos

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado 100 mL	2	
Vaso de precipitado 250 mL	2	
Embudo de vidrio	1	
Embudo de separación con tapón 250 mL	1	
Varilla de vidrio	1	
Soporte universal	1	
Matraz Erlenmeyer 250 mL	1	
Probeta 100 mL	1	
Triangulo de porcelana	1	
Tubo de ensaye 15x100 mm	5	
Gradilla para tubos de 15X100	1	
Aro metálico	1	
Piseta	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 Nº Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Prác. 8. Cuantificación de proteínas y factores que alteran su solubilidad

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Tubos de ensaye 16x150 mm	20	
Vaso de precipitado 100 mL	1	
Vaso de precipitado 50 mL	2	
Pipeta graduada 10 mL	1	
Pipeta graduada 1 mL	2	
Pipeta graduada 5 mL	1	
Probeta graduada 50 mL	2	
Embudo de vidrio	1	
Varilla de vidrio	1	
Tubos de ensaye 15x100	4	
Triángulo de porcelana	1	
Tripié	1	
Gradilla	2	
Pinza p/tubo de ensaye	2	
Piseta	1	
Propipeta	2	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 Nº Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Práctica 9. Cinética enzimática: Ureasa

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Bureta 50mL	1	
Vaso de precipitados 100mL	2	
Matraz Erlenmeyer 125mL	6	
Tubos de ensaye 16 x 150mm	20	
Pipeta graduada 5mL	2	
Pipeta graduada 10mL	1	
Piseta	1	
Pinza p/tubo ensaye	2	
Propipeta	2	
Gradilla	2	
Soporte Universal	1	
Pinzas para bureta	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09 Nº Revisión: 00

ASIGNATURA _____ **SEMESTRE** _____
NOMBRE DEL SOLICITANTE _____
No. DE CUENTA _____ **GRUPO** _____ **No. DE EQUIPO** _____
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO _____ **Práctica 10. Extracción de DNA**

FECHA DE SOLICITUD _____ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** _____

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado 100 mL	5	
Vaso de precipitado 250 mL	2	
Vaso de precipitado 600 mL	1	
Probeta graduada 50 mL	1	
Probeta graduada 100 mL	1	
Pipeta graduada 10 mL	1	
Vidrio de reloj	2	
Varilla de vidrio	1	
Embudo de vidrio	1	
Mortero chico	1	
Soporte universal	1	
Aro metálico	1	
Triángulo de porcelana	1	
Piseta	1	
Propipeta	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE _____

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL
Nombre y firma

LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR