



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

CLAVE CARRERA:10539 CLAVE ASIGNATURA:1338

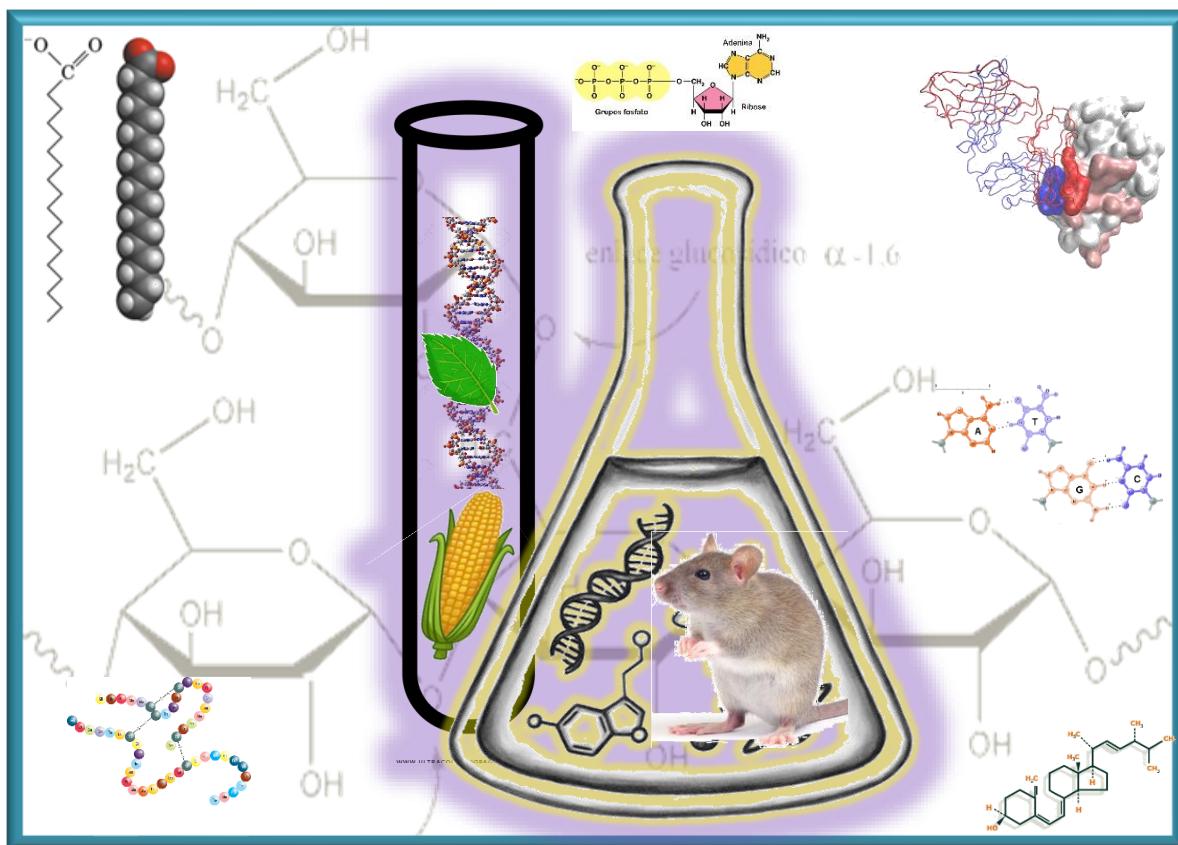
CLAVE CARRERA:10540 CLAVE ASIGNATURA:1443

PAPIME PE 205615

REVISIÓN: Agosto 2024

# BIOQUÍMICA GENERAL

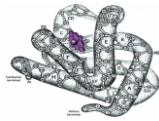
## MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO



NOMBRE DEL ALUMNO: \_\_\_\_\_

SEMESTRE LECTIVO: 2025-II GRUPO: \_\_\_\_\_ EQUIPO: \_\_\_\_\_

ASESORES: \_\_\_\_\_



## ÍNDICE

	Página
Introducción.....	2
Objetivos generales de la asignatura.....	3
Cronograma.....	4
Reglamento.....	6
Relación de las actividades experimentales con el programa de la asignatura.....	5
Criterios de evaluación.....	8
Seguridad en el laboratorio.....	11
Equipo de protección y material de uso común.....	14
Practica 1. pH en sistemas biológicos .....	15
Practica 2. Homogeneización y centrifugación.....	24
Practica 3. Técnicas cromatográficas.....	34
Practica 4. Electroforesis y diálisis.....	43
Practica 5. Extracción de DNA.....	52
Practica 6. Cuantificación de proteínas y factores que alteran su solubilidad.....	58
Practica 7. Reacciones de identificación de carbohidratos.....	65
Practica 8. Extracción, separación e identificación de lípidos.....	74
Practica 9. Cinética enzimática de la ureasa.....	83
Practica 10. Metabolismo:Fermentación.....	95
Hojas para examen .....	104
Vales de material.....	115



## INTRODUCCIÓN

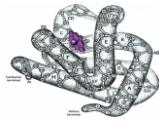
El manual de prácticas de laboratorio para Bioquímica General está diseñado para los alumnos inscritos en la asignatura, sin embargo es útil para todos aquellos que requieran iniciarse en el conocimiento básico de la bioquímica, realizando actividades prácticas sencillas que tienen como finalidad que los estudiantes de ciencias de la salud adquieran los conocimientos, habilidades y destrezas que se requieren para desarrollarse en esta área.

Las actividades prácticas contemplan el empleo del equipo básico que se usa en los laboratorios de bioquímica. El manual incluye diez prácticas, las cuales están relacionadas con los temas del programa de la asignatura y siguen el mismo orden que los conceptos revisados en la teoría. En la primer práctica se estudia la importancia del pH en los sistemas biológicos; en las prácticas 2 a la 4 se trabaja con métodos y técnicas para la separación y purificación de biomoléculas; en la práctica 5 se realiza extracción de DNA de diversas fuentes; en la práctica 6 se realiza separación y cuantificación de proteínas y se trabaja con factores que alteran su solubilidad. En la práctica 7 se realizan reacciones de identificación de carbohidratos; en la práctica 8 extracción, separación e identificación de lípidos. En la práctica 9 se realiza una cinética enzimática y en la práctica 10 se trabaja con fermentación bajo diferentes condiciones. La metodología utilizada en cada actividad da la oportunidad de generar un conocimiento básico, objetivo y aplicable en futuras asignaturas.

Cada práctica consta de una introducción con el fin de darle al estudiante una idea acerca de los conceptos que se van a trabajar, para que él con ayuda de las preguntas que debe resolver de la investigación previa pueda profundizar en ellos, sea capaz de integrarlos y entender plenamente el tema. También se da a conocer el objetivo general para cada práctica, el cuál se espera cumpla al final de la misma. Se enlista el material y reactivos a utilizar y se desglosa de manera sencilla la metodología experimental a seguir para cumplir con el objetivo.

Al final de algunas prácticas se plantean interrogantes con el fin de dirigir al alumno en el análisis de los resultados obtenidos y la adquisición de nuevos conocimientos, lo que ayuda al alumno a concluir sobre los conceptos revisados en el laboratorio. Finalmente se enlistan referencias en la que se enumeran los libros, revistas o información en internet que pueden consultar.

Se espera que el estudiante al concluir la asignatura de Bioquímica General cuente con los conocimientos necesarios, además de nuevas actitudes y valores para continuar con éxito su formación profesional en el área.



## OBJETIVO GENERALES DE LA ASIGNATURA

Analizar y comparar la composición, estructura, propiedades y función de las biomoléculas, así como distinguir los procesos metabólicos en los que estas participan y sus mecanismos de regulación a través de su descripción y diferenciación para comprender la química de los seres vivos, con la finalidad de aplicarlo en las asignaturas biológicas de la carrera.

## OBJETIVO DEL CURSO EXPERIMENTAL

Adquirir los conocimientos, habilidades y destrezas en el manejo de biomoléculas al realizar actividades prácticas que permitan; separar, purificar, identificar y cuantificarlas con diversos métodos, técnicas y reacciones de identificación para que los estudiantes de ciencias de la salud sean capaces de aplicarlas en otras asignaturas y en su desarrollo profesional.

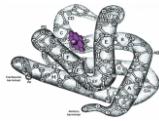


## **CRONOGRAMA 2025- II**

CARRERA	GRUPO	PROFESORES DE LABORATORIO
BQD	2301	QFB. Gabriela Escalante Reynoso/ MenC. Tais Nopal Guerrero/ Dr. Samuel Alvarez Almazán
BQD	2351	MenC. Tais Nopal Guerrero/ Dra. Azucena Lee Mendoza/ QFB. Nydia Berenice González Angeles
BQD	2302	MenC. Jessica Georgina Filisola Villaseñor/ IA. Miriam Alvarez Velasco/ Q. Karla Hernández Pérez.
F	2401	QFB. Gabriela Escalante Reynoso/ IA. Miriam Alvarez Velasco/ Q. Yesica Natali Alvarez Pacheco
F	2451	Dra. Azucena Lee Mendoza

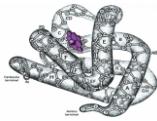
SEMANA	FECHAS	ACTIVIDAD
3	10-14-febrero-25	Inscripción / Presentación
4	17-21-febrero-25	pH en Sistemas Biológicos
5	24-28-febrero-25	Homogeneización y Centrifugación
6	3-7-marzo-25	Técnicas Cromatográficas
7	10-14-marzo-25	Electroforesis y Diálisis
8	17-21-marzo-25	Extracción de DNA
9	24-28-marzo-25	Cuantificación de Proteínas y Factores que alteran su solubilidad
10	31-marzo, 1-4-abril-25	Reacciones de Identificación de Carbohidratos
11	7-11-abril-25	Extracción, Separación e Identificación de Lípidos
12	21-25 abril-25	Cinética Enzimática
13	28-30-abril, 2, 8-mayo-25	Metabolismo: Fermentación
14	1, 5-7, 9-mayo-25	Inhábil
15	12-16-mayo-25	Inhabil
16	19-23-mayo-25	Discusión

24-mayo-25	Examen departamental
<b>FECHAS DE REGISTRO AL EXAMEN DEPARTAMENTAL : ABRIL</b>	



## RELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXPERIMENTALES CON EL PROGRAMA DE LA ASIGNATURA

Prácticas de laboratorio		Número y nombre de la Unidad Temática en el programa de la Asignatura
Número	título	
1	pH en sistemas biológicos	Unidad 1. Introducción a la bioquímica
2	Homogenización y centrifugación	Unidad 2. Metodología para el estudio de las biomoléculas
3	Técnicas cromatográficas	Unidad 2. Metodología para el estudio de las biomoléculas
4	Electroforesis y diálisis	Unidad 2. Metodología para el estudio de las biomoléculas
5	Extracción de DNA	Unidad 3. Biomoléculas
6	Cuantificación de proteínas y factores que alteran su solubilidad	Unidad 3. Biomoléculas
7	Reacciones de identificación de carbohidratos	Unidad 3. Biomoléculas
8	Extracción, Separación e identificación de lípidos	Unidad 3. Biomoléculas
9	Cinética enzimática de la ureasa	Unidad 5. Catalizadores biológicos
10	Metabolismo: fermentación	Unidad 7. Metabolismo primario



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

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

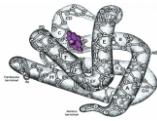
1. Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
2. Para todo trabajo realizado en el laboratorio, sobre la vestimenta se deberá utilizar bata blanca, con manga larga completamente abotonada, calzado cerrado o la vestimenta adecuada en cada laboratorio, así como traer el 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 recibirla 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 tentamiento**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
**Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 5 de agosto del 2024**

VoBo Comité de Calidad de Ciencias Biológicas	
Jefe del Comité de Calidad: M.C. Elizabeth Miranda Hernández	
Representante del Jefe de CC: M.C. Ericka Torres Pérez	
Jefes de Sección	Responsables de Calidad
I.A. Miriam Alvarez Velasco	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso
Q.F.B María de Lourdes Galván Ruiz	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales
M.C. Javier Froylán Lazcano Reyes	M.V.Z. Luis Jesús López Morales
M. en M.V.Z. Sonia Torres Patiño	M.C.E. Andrea De Santos López
M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	M.V.Z. Yesica Virginia Torres Durán



## CRITERIOS DE EVALUACIÓN

La evaluación del curso consiste en el 70% de teoría y 30% de laboratorio. Se debe tener el 80% de asistencia mínimo **a la teoría y al laboratorio**.

La evaluación del laboratorio se hará con base en:

CONCEPTO	PORCENTAJE
Promedio de prácticas	70
Discusión de prácticas	10
Examen Departamental	20

El examen departamental cuenta el 20% de la calificación de teoría y el 80% restante será establecido a criterio del profesor del grupo.

**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, se entrega 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.

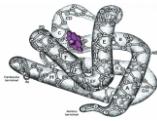
**OBSERVACIONES Y RESULTADOS:** VALOR 2.0. Esta es una parte muy importante del reporte, no se debe omitir nada.

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 DEPARTAMENTAL.** Al término de las actividades programadas para el semestre todos los alumnos inscritos en la asignatura, realizan un examen global en el que se incluyen preguntas de todos los temas de teoría y de todas las prácticas del laboratorio. Equivale al 20% de la calificación tanto de teoría como de laboratorio.

El examen se realiza en línea y el periodo de registro está al final del cronograma

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

En la liga anterior encontrará el enlace para registrarse y la información necesaria.

## SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

El término seguridad hace referencia a las condiciones que permiten controlar aquellas circunstancias que pueden dar lugar a hechos repentinos capaces de producir daño. Otro aspecto relevante en los aspectos de seguridad, son los primeros auxilios, los cuales son los cuidados o la ayuda inmediata, temporal y necesaria que se le da a una persona que ha sufrido un accidente, enfermedad o agudización de ésta hasta la llegada de un médico o profesional paramédico que se encargará, sólo en caso necesario, del trasladado a un hospital tratando de mejorar o mantener las condiciones en las que se encuentra.

Es imprescindible el contar con las hojas de datos de seguridad de las sustancias químicas con que se trabaja en el laboratorio para consulta específica en caso de accidente.

El objetivo de esta sección es el de presentar sugerencias generales para atender a personas que hayan sufrido algún accidente, específicamente en el laboratorio de bioquímica general y/o biología celular.

Los accidentes más frecuentes en un laboratorio son:

### 1. Cortes y heridas

Quitar cualquier prenda de vestir que cubra la herida, protegerse las manos con guantes o una bolsa de plástico limpia. Lavar la parte del cuerpo afectada con agua y jabón. No importa dejar sangrar algo la herida, pues ello contribuye a evitar la infección. Aplicar después agua oxigenada y cubrir con gasa, tapar después con gasa esterilizada y sujetar con venda o tela adhesiva. Si persiste la hemorragia o han quedado restos de objetos extraños (trozos de vidrio, etc...), se acudirá a un centro sanitario.



## 2. Quemaduras o corrosiones

### Por fuego u objetos calientes

Nota: Quitar la ropa que cubra el área afectada, si está pegada a la zona no quitar

QUEMADURA	QUÉ HACER	QUÉ NO HACER
Primer grado (enrojecimiento, inflamación ligera y dolor)	Aplique agua fría y/o una gasa esterilizada seca	No aplique ningún ungüento casero
Segundo grado (formación de ampulas, inflamación, dolor severo)	Sumerja en agua fría, seque con una tela esterilizada. Consiga atención médica.	No reventar ampulas, no quitar jirones de tejido.
Tercer grado (presencia de tejido carbonizado, no hay dolor)	Cubra con una tela estéril. Consiga atención médica.	No retirar ropa pegada, no aplicar hielo.

Por ácidos, en la piel. Cortar lo más rápidamente posible la ropa empapada por el ácido. Agregar abundante agua a la parte afectada. Neutralizar la acidez de la piel con disolución de bicarbonato sódico al 1%. (Si se trata de ácido nítrico, utilizar disolución de bórax al 2%). Despues vendar.

- Por álcalis, en la piel. Aplicar agua abundante y aplicar disolución de ácido bórico al 2%, o ácido acético al 1 %. Posteriormente secar, cubrir la parte afectada con pomada y vendar.

- Por otros productos químicos. En general, eliminar los fluidos emanados con grandes cantidades de agua cuando menos por 10 minutos. Conseguir atención médica.

## 3. Salpicaduras en los ojos

- Por ácidos. Inmediatamente después del accidente irrigar los dos ojos con grandes cantidades de agua templada de ser posible. Mantener los ojos abiertos, de tal modo que el agua penetre debajo de los párpados. Continuar con la irrigación por lo menos durante 15 minutos. A continuación lavar los ojos con disolución de bicarbonato sódico al 1 % con ayuda del lavador ocular, cambiando la disolución dos o tres veces, dejando por último en contacto durante 5 minutos. Conseguir atención médica.

- Por álcalis. Inmediatamente después del accidente irrigar los dos ojos con grandes cantidades de agua, templada a ser posible. Mantener los ojos abiertos, de tal modo que el agua penetre debajo de los párpados. Continuar con la irrigación por lo menos durante 15 minutos. A continuación lavar los ojos con disolución de ácido bórico al 1 % con ayuda del lavador ocular, cambiando la disolución dos o tres veces, dejando por último en contacto durante 5 minutos.



- Por otros productos químicos. Inmediatamente después del accidente, irrigar ambos ojos con grandes cantidades de agua, a ser posible templada, a chorro o con ayuda de una pera de goma grande. Mantener los ojos abiertos. Si es necesario, enganchar los párpados, estirarlos hacia el exterior de modo que el agua penetre por debajo de los mismos. Continuar la irrigación por al menos 15 minutos más.

#### 4. Ingestión de productos químicos

Antes de cualquier actuación concreta: SE REQUIERE ATENCIÓN MÉDICA URGENTE. Retirar el agente nocivo del contacto con el paciente. No darle a ingerir nada por la boca ni inducirlo al vómito.

- Ácidos corrosivos. No provocar jamás el vómito. Administrar lechada de magnesia en grandes cantidades. Administrar grandes cantidades de leche.

- Álcalis corrosivos. No provocar jamás el vómito. Administrar abundantes tragos de disolución de ácido acético al 1 %. Administrar grandes cantidades de leche.

#### 5. Inhalación de productos químicos

Aislar a la víctima de la atmósfera tóxica y hacerle respirar aire puro. Si se observa paro respiratorio practicarle las maniobras de resucitación en el ambiente exterior del mismo lugar del accidente.

#### Referencias:

- Hackett, W. y Robbins, G. (1992). *Manual de Seguridad y Primeros Auxilios*. México, D.F: Alfaomega.
- Garibay,C.,Peláez, I. 2006. "Manual de Primeros Auxilios Básicos". UNAM, México D.F.
- Mateo, P., Gonzalez, A. 2004. "Manual para el Técnico en prevención de riesgos laborales". FC Editorial, Tomo I, Madrid, España.
- <http://www.quimicaweb.net/ciencia/paginas/laboratorio/auxilios.html> (Agosto 2008)
- <http://www.quimicaweb.net/ciencia/paginas/laboratorio/normas.html> (Agosto 2008)



## 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

Cubrebocas 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 engargolado con pastas EN COLOR AZUL REY y con nombre

Marcador indeleble de punto fino de color oscuro

Lápices de colores Propipeta

1 regla 1 espátula pequeña

1 tijeras

Cada equipo de trabajo debe contar con:

1 L de alcohol 96° 1 caja de tubos capilares

Detergente líquido para trastes 25 gasas no estériles

Escobillón para tubos de ensaye papel aluminio

Escobillón para vasos y matraces algodón

1 rollo de servitoallas 500 mL cloro

1 pinzas de disección 5 abatelenguas

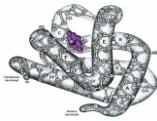
1 navaja de un solo filo 5 palillos de madera largos

Cerillos o encendedor

10 bolsas de plástico para basura pequeñas

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

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



## 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 término pH fue introducido en 1906 por Sorenson, 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 fórmula, 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.15 M	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 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 5 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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) Y OTRA DIFERENTE PARA EL ACIDO ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.15M (mL)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 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 ensaye 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



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 mezca 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 mas 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.

Aqua

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

8. 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).
9. 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 atraves 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				

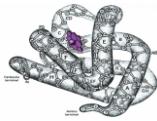
### Uso de tira indicadora universal de pH

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 HCl 0.4 N \_\_\_\_\_

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	
Plasma		HCl 0.4 N	
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?



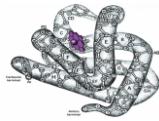
### Determinación de pH por uso de un indicador

- 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.15 M, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.15M, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15M, NaOH	150 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R6	H <sub>2</sub> O, NaOH, H <sub>2</sub> 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

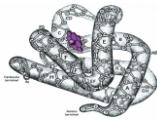
Murray, K., Granner K. y Rodwell, W. (2008). *Harper: Bioquímica Ilustrada* (18<sup>a</sup> ed.) México D.F: El Manual Moderno,

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

Devlin, T. (2006). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas* (4<sup>a</sup> 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

# HOMOGENEIZACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN

### INTRODUCCIÓN

Gran parte del conocimiento estructural y funcional con que actualmente se cuenta acerca de la célula, ha surgido del trabajo experimental realizado con biomoléculas aisladas y separadas de cualquier organismo ya sea animal, vegetal, bacteriano o viral. La bioquímica es una ciencia de laboratorio que tiene una naturaleza multidisciplinaria y abarca temas, que van desde organismos multicelulares a unicelulares, de sistemas celulares enteros a sistemas subcelulares divididos y de agregados moleculares a las moléculas mismas.

Las investigaciones en Bioquímica están enfocadas al estudio, de una o más de las moléculas que participan en un fenómeno biológico, tratan de explicar cómo participan las llamadas biomoléculas en estos fenómenos. Estas investigaciones se realizan como estudios *In vivo*, que son los que utilizan sistemas celulares intactos y estudios *In vitro*, que son los que usan componentes celulares previamente aislados, es decir, sistemas libres de células.

Para lograr aislar las biomoléculas se han utilizado diversos métodos y técnicas de laboratorio, como ejemplo de estos se encuentra la homogenización, que es un método de preparación de muestras que consiste en la ruptura de membranas celulares, de órganos y tejidos para obtener un –homogenado- que contiene los diferentes componentes moleculares y se puede realizar mediante métodos mecánicos, físicos, químicos y biológicos, la elección de alguno en particular depende del tipo de tejido que se quiera disgregar. Para minimizar los efectos causados por la homogeneización, se deben mantener las sustancias en condiciones tan próximas como sea posible a las que se considera se encuentran en la célula.

Después de la homogeneización los componentes celulares se pueden aislar mediante centrifugación. Las técnicas de separación por centrifugación se basan en el comportamiento de las partículas ante un campo centrífugo aplicado; las partículas están suspendidas en un medio líquido específico contenido en un tubo situado en un rotor. El rotor está centrado sobre el vástago propulsor de la centrífuga. Las partículas que difieren en densidad, en tamaño o en forma sedimentan a diferentes velocidades cuando se someten a un campo centrífugo; en síntesis la centrifugación es una técnica mediante la cual se separan, aíslan y purifican los componentes de un tejido en suspensión, con base en su comportamiento en un campo gravitacional aumentado cuando se le aplica una fuerza centrífuga bajo alta velocidad rotacional, y a partir de ello se van a obtener dos fracciones: el sobrenadante y la pastilla, sedimento o pellet.



## OBJETIVO

Descubrir que en bioquímica para estudiar el material biológico es necesario obtener muestras puras o enriquecidas en un determinado componente celular y para ello hay que disgregarlas u homogeneizarlas y separar sus componentes por centrifugación, tomando en cuenta las variables físicas y químicas que permitan conseguir esas fracciones celulares para que puedan ser caracterizadas con un mínimo de interferencias.

## INVESTIGACIÓN PREVIA

¿Qué es la homogenización y que parámetros físicos y químicos se deben considerar al realizarla?  
Por qué es importante considerar:

Una temperatura de 4°C

El medio utilizado en la homogenización (NaCl 0.9%)

El periodo de homogenización empleado para cada homogeneizador

Investigue la composición general del tejido vegetal y tejido animal relacionados con la práctica

¿Qué tipo de homogeneizador se debe utilizar para muestras blandas, duras y semiduras?

¿Qué es la centrifugación y cuál es su fundamento?

¿Cuáles son los parámetros físicos que se deben considerar durante la centrifugación de un homogenizado tisular?

Describa las características de una centrífuga. ¿Qué tipos de centrífugas existen?

## MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS, SOLO UNO DE ELLOS DE ACUERDO A LO INDICADOR POR SU ASESOR	
1 hígado de pollo	
1 trozo de cerebro de res	
1 trozo de músculo de res	
3 corazones de pollo	
3 hojas de espinaca	

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
500 mL de solución isotónica de NaCl	0.9 g de NaCl por cada 100 mL de solución (aforado)
50 mL de solución de NaCl al 0.2%	0.2 g de NaCl por cada 100 mL de solución (aforado)
50 mL de solución de NaCl al 1.5%	1.5 g de NaCl por cada 100 mL de solución (aforado)



## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

NOTA: TODO EL MATERIAL Y SOLUCIONES QUE SE UTILIZAN PARA REALIZAR LA HOMOGENEIZACIÓN DEBEN ESTAR PREVIAMENTE ENFRIADOS A 4°C

### TIPOS DE HOMOGENEIZADORES

#### 1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Cortar la muestra asignada en fragmentos pequeños, pesar 3 porciones de 1 g cada una
2. Colocar por separado, cada porción en el homogeneizador correspondiente: virtis(vaso especial solicitarlo a su asesor), potter y mortero

#### 2. HOMOGENEIZACIÓN EN VIRTIS

1. Agregar 5 mL de solución isotónica de cloruro de sodio (previamente enfriada a 4°C) al vaso del virtis
2. Homogeneizar durante 3 minutos (siguiendo las instrucciones de su asesor)
3. Dejar sobre hielo para centrifugar posteriormente

#### 3. HOMOGENEIZACIÓN EN POTTER

1. Agregar 5 mL de solución isotónica de cloruro de sodio (previamente enfriada a 4°C) al homogenizador potter.
2. Homogeneizar con 15 pasos (siguiendo las instrucciones de su asesor)
3. Dejar sobre hielo para centrifugar posteriormente

#### 4. HOMOGENEIZACIÓN EN MORTERO

1. Agregar 5 mL de solución isotónica de cloruro de sodio (previamente enfriada a 4°C) al mortero
2. Homogeneizar triturando el tejido con el pistilo durante 3 minutos
3. Dejar sobre hielo para centrifugar posteriormente

#### 5. CENTRIFUGACIÓN

1. Transferir por completo el contenido del mortero, potter y vaso del virtiz incluir los sólidos si existen. Formar parejas entre los tubos de los homogenados.,
2. En una balanza granataria de dos platos, equilibrar el peso de cada una de las parejas de acuerdo a las instrucciones de su asesor.Considerar los cuidados al realizar una centrifugación (se coloca en cada plato de la balanza un vaso de precipitados de plástico, una camisa metálica y un tubo con homogenado)
3. Colocar la pareja de tubos previamente equilibrados dentro de la centrifuga en posiciones opuestas



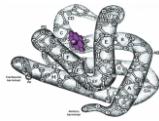
4. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos
5. Cuando se cumpla el tiempo de centrifugación, apagar la centrifuga y esperar a que se detenga totalmente. Sacar los tubos de la centrífuga
6. Colocar los tubos en una gradilla y comparar los tres tipos de homogenizadores para cada tejido. Comparar tamaño, forma, color y demás características de las pastillas y sobrenadantes
7. Con una pipeta de 10 mL, transferir cuidadosamente y por separado los sobrenadantes a tubos de ensaye y medir el volumen
8. Observar a contraluz los sobrenadantes de los tejidos y comparar
9. Describir en la tabla I, de cada uno de los juegos de homogenizados por tejido, las diferencias que observa, discuta y con base en ello proponer cuál es el mejor homogenizador para cada tejido

**Recopilar la información de los demás equipos para establecer cual se consideran el mejor homogeneizador para cada una de las diferentes muestras que se trabajaron en el grupo**

#### **EFFECTO DE LA RELACIÓN VOLUMEN DE SOLUCIÓN DE HOMOGENIZACIÓN : CANTIDAD DE TEJIDO**

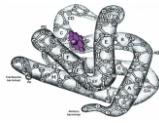
**Es muy importante respetar los volúmenes, evite juntar su muestra con la de otro equipo, independientemente del homogeneizador que haya elegido**

1. Cortar la muestra en fragmentos pequeños, pesar 3 porciones de 1 g cada una
2. Rotular de la siguiente manera 3 tubos de ensaye previamente enfriados: 1/3, 1/5, 1/10
3. En el homogeneizador seleccionado colocar la muestra y 3 mL de solución salina isotónica y homogeneizar.
4. Transferir el contenido al tubo rotulado como 1/3.
5. Centrifugar equilibrando con un tubo 1/3 de otro equipo.  
Repetir los pasos 3 a 5 con volúmenes de 5 y 10 mL
6. Comparar el efecto de la variación de volumen de solución de homogenización en la pastilla y sobrenadante
7. Describir en la tabla II, de cada uno de los homogenizados las diferencias que observa, discutir los resultados y con base en ello proponer cuál es la mejor relación volumen de solución de homogenización/cantidad de tejido



## EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HOMOGENIZACIÓN EN EL TEJIDO

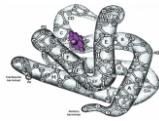
1. Cortar la muestra en fragmentos pequeños, pesar 3 porciones de 1 g cada una
2. Rotular 3 tubos de ensayo como: 0.2%, 0.9% y 1.5%
3. En el homogeneizador seleccionado colocar la muestra y 5 mL de solución de NaCl al 0.2%, y homogeneizar.
4. Transferir el contenido al tubo rotulado como 2%.
5. Centrifugar sin olvidar equilibrar los tubos.  
Repetir los pasos 3 a 5 con volúmenes de 5 mL de solución de NaCl al 0.9% y 5 mL de solución de NaCl al 1.5%
6. Comparar el efecto de la variación de concentración de la solución de homogenización en la pastilla y sobrenadante
7. Describir en la tabla III, de cada uno de los homogenizados las diferencias que observa, discutir los resultados y con base en ello proponer cuál es la mejor concentración de la solución para homogeneizar



## RESULTADOS Y OBSERVACIONES

TABLA I. TIPO DE HOMOGENEIZADOR

TIPO DE HOMOGENIZADOR	OBSERVACIONES PASTILLA POR TEJIDO	OBSERVACIONES SOBRENADANTE
VIRTIS		
POTTER		
MORTERO		



MEJOR HOMOGENEIZADOR POR TEJIDO:

Tejido	características	Mejor homogeneizador

TABLA II. RELACIÓN DE VOLUMEN DE SOLUCIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN:  
VOLUMEN DE TEJIDO

VOLUMEN DE SOLUCIÓN	OBSERVACIONES PASTILLA POR TEJIDO	OBSERVACIONES SOBRENADANTE
1/3		
1/5		
1/10		

MEJOR RELACIÓN DE VOLUMEN DE SOLUCIÓN: CANTIDAD DE TEJIDO: \_\_\_\_\_

---

---



TABLA III. CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN

CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN	OBSERVACIONES PASTILLA POR TEJIDO	OBSERVACIONES SOBRENADANTE
0.2%		
0.9%		
1.5%		

MEJOR CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN: \_\_\_\_\_

---

---

---



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

**INSTRUCCIONES:** En equipos de trabajo redacta en párrafos y de manera impersonal (es decir con tus palabras) las respuestas a lo que se te solicita. Utiliza el número de cuartillas que te permitan responder de manera adecuada. Recuerda que las indicaciones propuestas son una guía para elaborar el análisis de resultados por lo que NO DEBES ANOTARLAS.

**Centrifugación:** explica el fundamento de la técnica; para que te sirvió realizarla; qué partes se pueden identificar en cada tubo después de centrifugar y para que te sirve saber esa información. Recuerda considerar errores experimentales si se presentaron indicando de qué manera afectan los resultados.

**Homogeneización:**

De acuerdo con los resultados obtenidos indica cual fue el mejor homogeneizador para cada tipo de tejido utilizado por los diferentes equipos, justificando como se observaron los sobrenadantes y las pastillas. Indica si lo que obtuviste experimentalmente coincide con lo reportado en la literatura explicando si/no y porqué. Recuerda considerar errores experimentales si se presentaron indicando de qué manera afectan los resultados.

Explica si la cantidad de volumen de solución homogeneizadora utilizada afectó el proceso de homogeneización y como se vieron afectados los sobrenadantes y pastillas después de centrifugar. Recuerda considerar errores experimentales si se presentaron indicando de qué manera afectan los resultados.

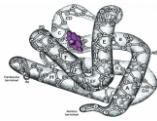
Explica si la concentración de la solución homogeneizadora afectó el proceso de homogeneización y como se vieron afectados los sobrenadantes y pastillas después de centrifugar. Recuerda considerar errores experimentales si se presentaron indicando de qué manera afectan los resultados.



DISPOSICIÓN DE RESÍDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Restos de muestras de hojas de espinaca, petalos de flores y muestras animales como: hígado de pollo, bisteck y cerebro de res	Aproximadamente 200 g	No aplica	Residuo biológico no tóxico ni infeccioso, depositar en la basura municipal
R2	Pastillas de los homogenados	Aproximadamente 100 g	No aplica	Residuo biológico no tóxico ni infeccioso, depositar en la basura municipal
R3	Sobrenadante de los homogenados	Aproximadamente 250 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr suficiente agua

## REFERENCIAS

- Tejera, S., Rodríguez, A., y Rodríguez, M. (2004). *Laboratorio de Química Orgánica. Técnicas Básicas*. SL.Tenerife: Arte Comunicación Visual.
- Coyne, G. (1997). *The Laboratory Companion. A Practical Guide to Materials, Equipment and Technique*. USA: John Wiley & Sons.
- Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell* (5<sup>a</sup> ed.). USA: Garland Science.
- Rendina, G. (1974). *Técnicas de bioquímica aplicada*. México, D.F: Interamericana.



## PRÁCTICA 3

# TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

### INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas con el que continuamente se encuentra el bioquímico es el de la separación y purificación de uno o más compuestos biológicos en una mezcla. Para conseguir tales separaciones, uno de los métodos más utilizados es la cromatografía. Las técnicas cromatográficas pueden utilizarse para la separación de grandes (varios gramos) o pequeñas cantidades (picogramos) de materiales. La selección de una forma particular de cromatografía para conseguir una separación depende de la estructura química, y por consecuencia de las propiedades físicas y químicas de los componentes de una mezcla, y es frecuente que se puedan utilizar varios métodos cromatográficos uno tras otro para lograr la separación y purificación de un compuesto.

La cromatografía es un método de separación y purificación, que se basa en las diferencias de migración de los componentes de una mezcla sobre una fase estacionaria por influencia de una fase móvil. Todos los sistemas cromatográficos constan fundamentalmente de dos fases; una de ellas es la fase estacionaria, que puede ser sólida, líquida o una mezcla sólido-líquida inmovilizada. La segunda fase, la fase móvil, puede ser líquida o gaseosa. La selección de las fases se hace de forma tal que los compuestos a separar tengan distintos coeficientes de distribución. El término coeficiente de distribución o reparto se usa generalmente para describir el modo en que un compuesto se distribuye entre dos fases inmiscibles.

Cromatografía en papel. Esta técnica se basa en el principio de que un compuesto se distribuye entre dos fases líquidas. La fase estacionaria la constituye el agua atrapada entre las fibras de celulosa y la fase móvil una mezcla de disolventes orgánicos que se moverán a través del papel por capilaridad arrastrando a los componentes de la mezcla que se distribuyen de acuerdo a sus coeficientes de reparto.

Cromatografía en capa fina. El principio general implica los fenómenos de adsorción y reparto. Para la cromatografía en capa fina se recubre una lámina de vidrio o aluminio con una capa delgada de un adsorbente (con espesor entre 0.25-0.5 mm, dependiendo del tipo de análisis), y se seca en estufa a 100-120 C; la muestra se aplica con micropipeta o jeringa, se introduce la placa en una cámara previamente saturada con la mezcla de disolventes y se permite que se efectúe la separación de los componentes a medida que la mezcla asciende por la placa.

Los pigmentos contenidos en diversos vegetales poseen propiedades que les permiten distribuirse de forma diferente en los materiales utilizados para separaciones cromatográficas, además de que por ser coloridos resulta muy sencillo visualizar la separación.



## OBJETIVO

Separar los pigmentos presentes en diversas muestras vegetales por cromatografía en papel, capa fina (TLC) y columna, para comparar los resultados obtenidos en las diferentes técnicas.

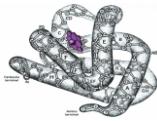
## INVESTIGACIÓN PREVIA

1. Investigar los pigmentos se encuentran en las muestras vegetales a trabajar.
2. Investigar las fórmulas químicas y propiedades físicas y químicas de los pigmentos del punto anterior.
3. Proporcionar el fundamento y tipos de cromatografía
4. Cuáles son las fases móviles y estacionarias de las cromatografías a realizar?
5. ¿Cómo se realizan la cromatografía en papel, en capa fina y en columna?
6. 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 o más 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 silice gel para columna	



## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### A) HOMOGENEIZACIÓN

Pesar 3 g de hojas de espinaca y cortarlas en trozos pequeños

Pesar 3 g de cada una de las otras muestras y cortar en trozos pequeños

Colocar cada muestra en morteros por separado

Adicionar 10 mL de etanol absoluto a cada muestra

Homogenizar fuertemente.

### B) CENTRIFUGACIÓN

Colocar en tubos para centrifuga cada uno de los homogenados obtenidos con todo y los restos sólidos que tenga, un tubo por cada homogenado.

Equilibrar los tubos en una balanza granataria de dos platos, junto con las camisas correspondientes

Colocar los tubos dentro de la centrifuga

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

Centrifugar durante 10 min a 2500 rpm

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.

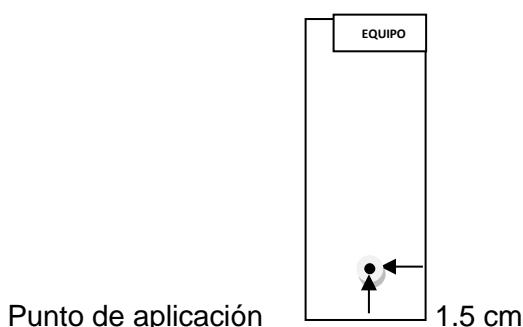


Fig. 1. Aplicación de la muestra en cromatografía en capa fina y papel



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 cinco aplicaciones en el mismo punto, dejar secar entre cada aplicación) (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 chromatograma, marcar inmediatamente con lápiz el frente del disolvente. Posteriormente marcar las manchas. Dejar secar y calcular los Rf 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)

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

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.

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.

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

Sacar la tira de la cámara cuando el solvente se encuentre aproximadamente a 1 cm del borde superior.

Dejar secar y calcular los Rf de cada componente, registrar los resultados en la tabla II de la sección resultados y observaciones

## 3a. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

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.**



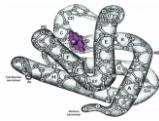
## Espinacas

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 1mL 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 de butanol-ácido acético concentrado-agua destilada (63:16:21) 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. Despues 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

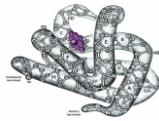


Tabla III. Cromatografía en columna de pigmentos de espinaca.

	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	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, justifique 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, justifique 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 las diferentes cromatografías, compárelas justificando:

¿Qué diferencias y semejanzas existen entre las cromatografías en papel, en capa fina y en columna? Centrarse en: fase estacionaria, móvil y el soporte de la cromatografía.

¿el orden de separación de los pigmentos es el mismo en todas?

¿se observaron los mismos pigmentos en ambos casos para las espinacas y para los pétalos de las flores?

¿cómo es la interacción entre los pigmentos y la fase móvil en cada caso?

Con base en sus resultados, ¿cuál cromatografía es mejor para cada una de las muestras?



DISPOSICIÓN DE RESÍDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Fragments de muestras vegetales: hojas de espinaca y petalos 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 petróleo	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 petalos 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<sup>a</sup> ed.). USA: CBS College Publishing.

Sikorski, Z. (2007). *Chemical and Functional Properties of Food Components* (3<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> ed.). USA: Thomson LeRNAing, Inc.

Mackenzie, C. (2004). *Experimental Organic Chemistry* (4<sup>a</sup> ed.). USA: Prentice-Hall.

Cela, R., Lorenzo, R. y Casais, M. (2002). *Técnicas de Separación en Química Analítica*. España: Síntesis, S.A.



## PRÁCTICA 4 ELECTROFORESIS Y DIÁLISIS

### INTRODUCCIÓN

#### DIÁLISIS

La diálisis es un método de separación y purificación de biomoléculas que consiste en el paso de moléculas de bajo peso molecular a través de una membrana dializadora (semipermeable) cuyos poros son ultramicroscópicos; por ejemplo el celofan o celulosa, pergamino y el colodión. El disolvente y las moléculas de bajo peso molecular como iones inorgánicos (ej. cloruro y sodio) y pequeñas moléculas orgánicas (glucosa) atraviesan la membrana desde la solución más concentrada a la más diluida, la difusión es el fenómeno por el cual las moléculas disueltas tienden a distribuirse uniformemente en el seno del líquido, siendo inversamente proporcional a su peso molecular.

#### ELECTROFORESIS

La electroforesis es una herramienta práctica para la separación y purificación de mezclas de compuestos biológicos que sirve tanto de método analítico, como preparativo para realizar posteriormente otras técnicas analíticas.

La electroforesis es el fenómeno por medio del cual una molécula con carga neta se desplaza en un campo eléctrico. Considerando esta definición, las moléculas biológicas que poseen grupos ionizables y puede existir en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como cationes (+) o como aniones (-), son aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además, las moléculas que tienen cargas similares poseerán distintas relaciones carga/masa, debido a diferencias de peso molecular. En conjunto estas diferencias constituyen la base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico.

Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas migrantes y el medio circundante, y que son principalmente de fricción y electrostáticas.

La velocidad con que las diferentes sustancias se desplazan durante el transcurso de la electroforesis se denomina velocidad de migración. El desplazamiento de los componentes de la muestra durante el transcurso de la misma depende de:

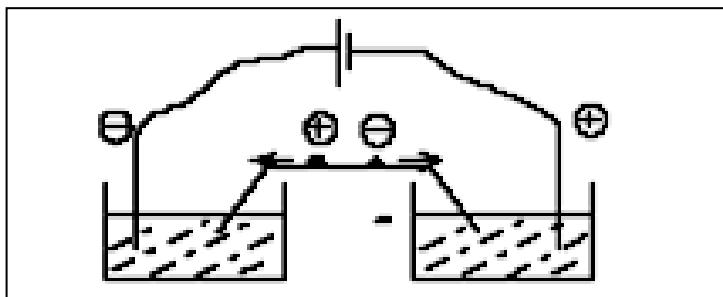
- La muestra
- El campo eléctrico
- La solución buffer
- El medio de soporte



Por todo lo anteriormente expuesto la electroforesis se emplea como un método analítico y preparativo efectivo en el área bioquímica.

### Cámara de Electroforesis

Permite separar moléculas cargadas eléctricamente, al aplicarse un campo eléctrico. Existen cámaras de electroforesis verticales y horizontales, en el laboratorio de Bioquímica Celular, utilizaremos la cámara horizontal.



### OBJETIVO

Demostrar la utilidad de la diálisis, aplicando este método a una muestra de saliva para comparar la actividad de la enzima amilasa salival dializada y no dializada, mediante un método cualitativo de colorimetría visual.

Aplicar el método electroforético al separar una mezcla de aminoácidos, mediante electroforesis en papel y para su identificación revelarlos con ninhidrina.

### INVESTIGACIÓN PREVIA

¿Qué es la diálisis y cuál es su fundamento?

¿Qué es la amilasa salival, que reacción cataliza y cuáles son sus condiciones óptimas de actividad? ¿Qué cofactores y/o activadores requiere?

¿Cuál es la composición de la saliva?

Investigar la reacción del lugol con el almidón, y con los demás productos de la reacción catalizada por la amilasa salival.

¿Qué es la electroforesis y cuál es su fundamento? ¿Qué influencia tiene el paso de la corriente (voltaje e intensidad), el amortiguador, la muestra y medio de soporte sobre el método de electroforesis?

¿Qué es el pl y cómo se calcula de un aminoácido con 2 y 3 valores de pka?



Investigar el comportamiento ácido básico de los aminoácidos

¿De qué elementos consta una cámara de electroforesis? ¿Qué carga tienen el ánodo y el cátodo?

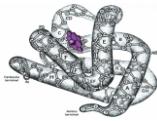
Investigar la estructura química y valores de pKa de los aminoácidos a utilizar.

¿Cuál es la fórmula de la ninhidrina? Cuál es la reacción química que se lleva a cabo con los distintos aminoácidos.

## MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS	
Hilo cañamo	
Una liga	
Masking tape	

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
100 mL de solución de lugol ( $I_2/KI$ ) al 0.01M (en gotero ambar)	0.253g de yodo metálico y 0.166 g de KI en 100 mL agua destilada
2 L de solución buffer de boratos a pH 8.6	2.48 g ác. Bórico + 3.33g borato de sodio aforar a 1 L con agua destilada. Ajustar pH = 8.6
30 mL de revelador de ninhidrina en butanol (en recipiente ámbar con rociador de vidrio)	Disolver 0.5g de ninhidrina en 100 mL de butanol
5 mL de mezcla de aminoácidos (prolina, ác. glutámico, lisina, de reciente preparación) en frasco gotero pequeño	Pesar 0.1g de cada aminoácido y agregar a 1 mL de solución salina (NaCl 0.9%)
4 galones de agua destilada	
50 mL de solución de almidón al 1%	Disolver 10 g de almidón en 200 mL de agua destilada fría. Calentar aproximadamente 750 mL de agua hasta ebullición. Adicionar lentamente y con agitación a la solución anteriormente preparada y dejar en ebullición 4-5min, enfriar a temperatura ambiente y completar el volumen de 1000 mL con $H_2O$



## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### A) DIÁLISIS

#### 1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Un alumno donará la muestra. Enjuagar perfectamente la boca y masticar una liga para estimular la producción de saliva

2. Colectar en un vaso de precipitados de 50 mL, una muestra de 10 mL de saliva

#### 2. DIÁLISIS DE UNA MUESTRA DE SALIVA

Un equipo designado por el asesor de laboratorio realizará lo siguiente:

- En un vaso de precipitados de 250 mL calentar a ebullición aproximadamente 100 mL de agua destilada. Colocar dentro del agua los tubos para diálisis, una vez que estos se suavicen un poco sacarlos del agua y repartirlos a los equipos.

**NO TOCAR EL TUBO CON LOS DEDOS, EMPLEAR GUANTES.**

1. Cerrar cuidadosamente el tubo para diálisis por un extremo empleando hilo cáñamo a manera de formar una pequeña bolsa

2. Colocar dentro de la bolsa 2 mL de saliva y cerrar el otro extremo con hilo dejando aproximadamente 10 cm de hilo para fijarlo, siga en todo momento las indicaciones de su asesor

3. Sumerger la bolsa en 1L de agua destilada fijándola al exterior del vaso con el hilo excedente. Una vez que todos los equipos coloquen sus bolsas de diálisis, poner en agitación durante 60 min

4. Cambiar el agua cada 20 min

5. Al terminar el tiempo establecido, sacar los tubos de diálisis y manejar con mucho cuidado su muestra de saliva dializada

### B. ACTIVIDAD DE AMILASA SALIVAL

Antes de iniciar esta parte:

Colocar en un tubo de ensayo 10 mL de almidón al 1% y poner en un baño a 37°

Colocar en un tubo de ensayo agua destilada y poner en un baño a 37°

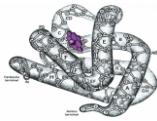


1. Preparar 1 mL de una dilución agua:saliva no dializada, por ejemplo, puede prepararla de la siguiente manera: 0.5 mL de saliva con 0.5 mL de agua o bien 0.3 mL de saliva con 0.7 mL de agua, etc . Elija usted con cual dilución iniciar (o solicite instrucciones a su asesor)
  2. Colocar en un tubo de ensayo 1mL de solución de almidón al 1% (a 37º en agua e incubar a 37°C por 2min
  4. Añadir al tubo el mL de saliva diluida y continuar la incubación a 37°C. Iniciar en ese instante la medición del tiempo de reacción.
  5. Tomar a los 30 seg una muestra de la mezcla de incubación SIN SACAR EL TUBO DEL BAÑO DE AGUA y colocar sobre una cavidad de una placa de porcelana a la cual previamente se le han depositado 2 gotas de solución de lugol, éste debe de colocarse sólo con segundos de anticipación.
  6. Repetir la reacción cada 30 segundos (60, 90, 120, 150, 180, etc.) hasta que la coloración obtenida sea amarilla (solución de lugol)
  7. Buscar la dilución adecuada para que el tiempo en que la enzima degrade el almidón sea de entre 2 y 3 min( 120 – 180 seg).  
Si el tiempo es mayor entonces deberá preparar una dilución con mayor cantidad de saliva y menor de agua, por ejemplo si se inicio con 0.5 de saliva y 0.5 mL de agua ahora puede emplearse 0.7 de saliva y 0.3 mL de agua.  
Si por el contrario la reacción termina antes de los 120 seg entonces se deberá preparar una dilución mayor, por ejemplo si partimos de la dilución de 0.5 mL de saliva y 0.5 mL de agua ahora puede realizarse con 0.3 mL de saliva y 0.7mL de agua.
- Nota: Se deben realizar tantas diluciones como sea necesario hasta encontrar la dilución indicada.
8. Una vez obtenida la dilución adecuada, esperar a que termine la dialización y repetir la metodología con una muestra de saliva dializada a la misma dilución (no pipetejar el precipitado obtenido en el tubo de dialización)

Registrar sus resultados en la tabla correspondiente, comparar resultados y concluir

### C. ELECTROFORESIS EN PAPEL

1. Cortar una tira de papel filtro Whatman de 2 X 30 cm y realizar con lápiz una marca en el centro (zona de aplicación de la muestra), anotar en el extremo superior derecho de la tira el número de equipo, así como la dirección del ánodo y del cátodo como se muestra en el esquema:



+	No. equipo -
---	-----------------

2. Llenar la cámara de electroforesis con 1 L de buffer de boratos de pH 8.6
3. Tomar la tira de papel filtro con pinzas y humedecer suavemente sobre la superficie del buffer. Colocarla de manera horizontal sobre los soportes de la cámara y sujetar de los extremos con un par de imanes. Evita que la tira toque la parte central de la cámara.
4. Colocar con un micropipeta 10 µL de la mezcla de aminoácidos, en la zona marcada previamente
5. Colocar la tapa a la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de poder (negro con negro y rojo con rojo) para cerrar el circuito
6. Dejar correr la electroforesis a 200 volts durante 60 minutos ¡peligro!, el circuito es de alto voltaje, evite el contacto con éste
7. Después de transcurrido el tiempo indicado, desconectar, destapar la cámara, sacar con una pinza la tira de papel (electroforegrama), secar y revelar
8. Rocar la tira de papel de manera uniforme con ninhidrina y con ayuda de una parrilla muy calentar y secar hasta que aparezcan manchas de color amarillo y morado
9. Observar, registrar sus resultados y analizar

## RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Todos los resultados observados se registran en los siguientes cuadros:

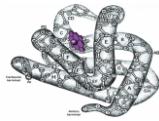
\* En el cuadro A, por cada una de las diluciones realizadas colorear un recuadro con el color obtenido en la reacción e indicar dependiendo del color, positivo (en caso de que exista aún presencia de almidón ) o negativo ( en caso de ausencia del mismo debido a su degradación)

\* En el cuadro B, anotar la carga neta de cada aminoácido (calculada previamente), así como la dirección de la migración electroforética tanto hipotética como experimental (ánodo, cátodo o no migró)



CUADRO A: Resultados de la actividad de la enzima amilasa salival dializada y no dializada

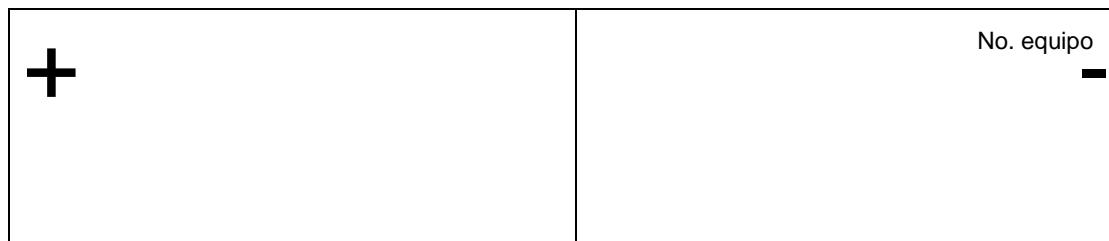
TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA	AMILASA SALIVAL NO DIALIZADA DILUCIONES REALIZADAS										AMILASA SALIVAL DIALIZADA
Colorea los recuadros con el color correspondientes a cada sistema											
30 seg											
60 seg											
90 seg											
120 seg											
150 seg											
180 seg											
210 seg											
240 seg											
270 seg											
300 seg											
330 seg											
360 seg											
390 seg											
420 seg											
450 seg											
480 seg											
510 seg											
540 seg											
570 seg											
600 seg											



CUADRO B: Resultados de la técnica de electroforesis en papel realizada a una mezcla de 3 aminoácidos empleando una solución buffer a pH 8.6

AMINOÁCIDO	CARGA NETA A pH 8.6	MIGRACIÓN HIPOTÉTICA	MIGRACIÓN EXPERIMENTAL	OBSERVACIONES
Ácido glutámico				
Prolina				
Lisina				

Dibujo del electroforegrama



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Recuerden redactar la discusión de sus resultados tomando en cuenta lo siguiente:

En la diálisis...

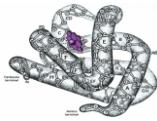
Anota la reacción de la hidrólisis del almidón catalizada por la amilasa incluyendo los cofactores y condiciones de reacción

Justifica los resultados obtenidos con el lugol con los diferentes productos de la reacción en las distintas diluciones realizadas

De las moléculas que se intercambiaron ¿Cuál influye directamente sobre la actividad de la amilasa? ¿cuál es su función?

Para qué se cambia el agua durante la diálisis cada 20 minutos

Con base en sus resultados explique la diferencia de actividad entre la saliva dializada y sin dializar



En la electroforesis

Importancia de establecer un pH de trabajo al realizar la electroforesis

Con base en 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

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Saliva		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de aguaVet
R2	Agua destilada de la dialisis			Verter a la tarja
R3	Tubos de reacción contienen: saliva diluida y almidón al 1%		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R4	Gotas de polisacáridos con lugol en la placa de porcelana			Limpiar placa de porcelana con servitoalla y tirar a la basura municipal. Lavar placa
R5	Buffer fosfatos pH 8.6	1000 mL		Reutilizar para otros grupos o disponer en un frasco debidamente etiquetado
R7	Revelador de ninhidrina			Reutilizar para otros grupos o disponer en un frasco debidamente etiquetado

y en el caso de la prolina se obtiene un color amarillo.

## REFERENCIAS

Cela, R., Lorenzo, R. Y Casais, M. (2002). *Técnicas de Separación en Química Analítica*. España: Síntesis.

Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell* (5<sup>a</sup> ed.). USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

San Andrés Tejera, L., Afonso, M. y Rodríguez, M. (2004). *Laboratorio de Química Orgánica. Técnicas Básicas*. Tenerife, España: Arte Comunicación Visual.

Higson, S. y Balderas, P. (2007). *Química Analítica*. México, DF: McGraw-Hill Interamericana.

Coyne, G. (1997). *The Laboratory Companion. A Practical Guide to Materials, Equipment and Technique*. USA: John Wiley & Sons.



## PRÁCTICA 5 EXTRACCIÓN DE DNA

### INTRODUCCIÓN

La capacidad de los organismos para reproducirse y transmitir su información genética se debe a los ácidos nucleicos porque éstos almacenan esa información. Los ácidos nucleicos son el DNA (ácido desoxirribonucleico) y el RNA (ácido ribonucleico), a excepción de algunos virus, todos los sistemas biológicos utilizan al DNA como molécula almacenadora de información. La estructura y función bioquímica de las células se debe a sus proteínas, el tipo de proteínas que están presentes en un organismo está determinado por la secuencia del DNA. La información no fluye directamente del DNA a la proteína, sino que pasa primero por la molécula de RNA a través de un proceso denominado transcripción. Posteriormente la secuencia de RNA se traduce en una secuencia de proteína en los ribosomas, lo que se conoce como traducción proteica (Jorde 2004).

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 DNA el azúcar es la desoxirribose y para el RNA la ribosa. Las bases nitrogenadas son la adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. En el DNA están presentes las cuatro primeras bases indicadas y en el RNA el uracilo está en lugar de la timina. El orden en el cual los nucleótidos aparecen en el ácido nucleico, codifica la información genética. En otras palabras, los nucleótidos sirven como un alfabeto genético donde está codificada la estructura de cada proteína presente en las células. La estructura principal del DNA es la doble hélice, en esta estructura, las bases nitrogenadas se encuentran en el centro de la molécula y los esqueletos de azúcar y fosfato se encuentran en la parte exterior de la hélice. Las zonas aniónicas están en contacto con el agua, éstas estructuras son ligeramente solubles en agua, esto es importante ya que interaccionan con el medio acuoso de las células vivas (Devlin, 2006).

El RNA es el principal material genético de los virus, y además es importante en la producción de proteínas en los organismos. Existen varios tipos de RNA, el transferencia, ribosomal y mensajero, pero también existen otros relacionados con otras funciones celulares.

### Propiedades del DNA

Insoluble en soluciones diluidas de NaCl

Soluble en soluciones concentradas de NaCl

Insoluble en etanol

Puede ser disociado de las proteínas por tratamiento con detergente o fenol



### Propiedades del RNA

Soluble en soluciones diluidas de NaCl

Insoluble en etanol

Puede ser disociado de las proteínas por tratamiento con detergente o fenol

### EXTRACCIÓN DEL DNA

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 a partir de tejidos vegetales y células animales, mediante materiales de uso común, para observar las fibras obtenidas y argumentar cada paso de la metodología

### INVESTIGACIÓN PREVIA

¿Químicamente qué son los ácidos nucleicos, como están constituidos y cuál es su función?

Haga una tabla en la que muestre por lo menos 5 diferencias entre DNA y RNA

¿Cuáles son las conformaciones estructurales más comunes del DNA?

Indique y justifique la función de cada uno de los reactivos utilizados en la práctica

¿De manera sencilla, cómo podría identificar químicamente si lo que se obtuvo es DNA?

Que reacciones químicas podría realizar.

### MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
1 kiwi o 10 fresas
1 cebolla
Detergente líquido lavavajillas sin cloro
NaCl
1 trozo de papaya con cáscara
1 navaja de un solo filo
500 mL de etanol 96°
1 tabla para cortar



## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

NOTA: Colocar desde el inicio de la sesión, el etanol a enfriar. Etiquetar con marcador indeleble su número de equipo y entregar al asesor

### A) EXTRACCIÓN DEL DNA DE CEBOLLA

Cortar 20 g de la zona central de la cebolla en cuadrados,

En un vaso precipitados de 600 mL agregar 10 mL de detergente líquido, 2 g NaCl y añadir 100 mL de agua

Agregar al vaso los trozos de cebolla.

Homogeneizar con homogeneizador de aspas, a velocidad máxima durante 30 segundos

Filtrar sobre gasa el líquido obtenido a un vaso de precipitado de 100 mL hasta la mitad aproximadamente y quitar la espuma.

Picar finamente un trozo de papaya sin cáscara, colocar sobre una gasa y exprimir cuidadosamente, recolectar el jugo

Añadir a la mezcla 10 mL de jugo de papaya y mezclar bien

Añadir un volumen de etanol muy frío equivalente al del filtrado, haciéndolo resbalar cuidadosamente, por las paredes del vaso para que forme una capa sobre el filtrado, utilice la varilla de vidrio para ayudarse

Dejar reposar durante 2 ó 3 minutos hasta que se forme una zona turbia entre las dos capas. A continuación introducir la varilla y extraer las fibras blancas de DNA

### B) EXTRACCIÓN DEL DNA DE KIWI

Preparar en un recipiente un baño de agua con hielo, de una profundidad entre 5 a 8 cm  
Preparar un baño de agua caliente a 80°C de una profundidad entre 5 a 8 cm

Preparar 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, agregar 10 mL de detergente líquido y agitar con varilla de vidrio ¡muy suavemente!

Pelar el kiwi y cortar en trozos pequeños

Pesar 30 g de kiwi o de fresas y homogeneizar en el mortero

Colocar el homogenizado de kiwi o fresas en un vaso de precipitado de 100 mL

Verter la disolución de extracción de DNA (paso 3) sobre el homogenizado, de forma que el volumen total sea aproximadamente el doble del homogenizado



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.

Después de los 15 minutos, transferir el vaso al baño de hielo y reposar allí por 5 minutos, agitarla ocasionalmente a medida que se enfria.

Filtrar sobre gasa y recibir el filtrado en un vaso de precipitado de 100 mL.

Agregar cuidadosamente con pipeta graduada de 10 mL, 30 mL de etanol frío, dejar resbalar por las paredes del vaso para formar una fase alcohólica sobre el filtrado.

Observar lo que ocurre en la interfase entre el alcohol y el filtrado. Anotar sus observaciones.

Permitir que la disolución repose por dos minutos, sin moverla. Si se desea, se puede recoger el DNA, enrollándolo en el palillo.

### C) EXTRACCIÓN DE DNA DE CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL

Un voluntario se enjuaga la boca vigorosamente con 25 mL de agua destilada moviendo el agua de una mejilla a otra durante 30 segundos para desprender células. Depositar el agua en un vaso de precipitados de 50mL

Añadir 5 mL de solución de extracción (preparada en el paso 3 de la extracción de DNA de kiwi).

Agitar la solución con varilla de vidrio, lentamente para que no se forme espuma.

Agregar cuidadosamente 20 mL de etanol frío al vaso de precipitados, resbalar por las paredes del vaso.

Observar en la interfase entre las dos capas, la formación de hilos de DNA



## OBSERVACIONES Y RESULTADOS.

Representar en un dibujo como se observa el DNA extraído de cada una de las muestras

--	--	--

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Explicar químicamente lo siguiente:

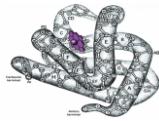
La función de los componentes de la solución de extracción: Agua, NaCl, detergente

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 homogenizado 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.



DISPOSICIÓN DE RESIDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Trozos de cebolla		No aplica	Depositar en la basura municipal
R2	Cáscara y pulpa de papaya		No aplica	Depositar en la basura municipal
R3	Gasa con trozos de cebolla		No aplica	Depositar en la basura municipal
R4	Mezcla de extracción de cebolla (detergente líquido, NaCl, agua) y etanol	Aprox 1 L	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R5	Cáscara y trozos de kiwi		No aplica	Depositar en la basura municipal
R6	Mezcla de extracción de kiwi (detergente líquido, NaCl, agua) y etanol	Aprox 600 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R7	Mezcla de extracción(detergente líquido, NaCl, agua) con saliva y etanol	Aprox 500 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua

## REFERENCIAS

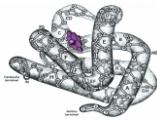
Clark, D. (2005). *Molecular Biology*. USA: Elsevier.

Watson, J. (2003). *El Secreto de la Vida*. España: Santillana Ediciones Generales.

Flores A., Sánchez, S. y Uribe, S. (año) *Bioquímica. Manual de Prácticas*. México DF: McGraw-Hill Interamericana.

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

Jorde, B., Carey, C., Bamshad, J. y White, R. (2004) *Genética Médica* (3<sup>a</sup> ed.). España: Elsevier



## PRÁCTICA 6

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES QUE ALTERAN SU SOLUBILIDAD

#### INTRODUCCIÓN

Las proteínas son biomoléculas formadas por aminoácidos, unidos por enlace peptídico que desempeñan una gran variedad de funciones celulares, entre ellas; estructural, transporte, enzimas, hormonas, anticuerpos, toxinas, almacén, reguladoras, transmisión de información, etc. Para realizar estudios químicos y biológicos de una proteína es necesario separarla y purificarla y para lograr esto se toman en cuenta características tales como el tamaño molecular, la solubilidad, la carga eléctrica, diferencias en sus características de absorción y afinidad biológica con otras moléculas, etc.

La solubilidad permite diferenciar entre albúminas y globulinas, en tanto las albúminas son solubles en agua destilada, las globulinas no lo son. Tanto albúminas como globulinas son solubles en soluciones isotónicas pero si se incrementa la concentración del soluto iónico se precipitan, primero las globulinas y después las albúminas. El conocer la solubilidad de las diferentes clases de proteínas es muy útil para el trabajo experimental, ya que permite diseñar métodos para el aislamiento o la purificación de una proteína específica.

La solubilidad de una proteína depende de la polaridad de los aminoácidos que la conforman, de la temperatura, del pH del medio, de la presencia de iones disueltos, de la presencia de otros solutos que compitan por el agua disponible (por ejemplo, los iones y el alcohol). Existen cuatro factores principales que alteran la solubilidad de una proteína: [sales], pH, temperatura y polaridad del solvente. Generalmente, un aumento en la temperatura provoca una disminución en la solubilidad de las proteínas por ruptura de los puentes de hidrógeno. Los solventes orgánicos, al disminuir la constante dieléctrica del medio, incrementan las interacciones proteína-proteína promoviendo su precipitación. La precipitación consiste en la conversión de proteínas solubles a un estado insoluble.

Cualquier proceso capaz de modificar la estructura tridimensional de las proteínas sin ruptura de enlaces covalentes se llama desnaturación, la mayoría de las veces la desnaturación es irreversible y conduce a la pérdida de la estructura y función de la molécula proteínica. Una proteína desnaturizada exhibe su mínima solubilidad.

Existen diversos métodos para cuantificar proteínas en solución acuosa como: el método de Biuret, de Folin y Ciocalteu, de Lowry, entre otros. Biuret es uno de los métodos más utilizado para medir la concentración de proteínas en una muestra, porque existen muy pocas interferencias con otros compuestos para el desarrollo del color. Sin embargo, la cantidad de proteína necesaria (20-40 mg) limita el uso del reactivo, así como el que algunos pigmentos absorben a la misma longitud de onda y que existe interferencia del  $\text{NH}_4^+$ , lípidos y algunos carbohidratos en la reacción.



## OBJETIVO

Cuantificar proteínas de leche y huevo y comprobar los factores que alteran la solubilidad de las proteínas en soluciones acuosas, a través de la precipitación de la caseína por cambio de pH para cuantificarla por gravimetría y aplicar un método espectrofotométrico para calcular la cantidad de proteínas del suero y de la clara de huevo.

## INVESTIGACIÓN PREVIA

Investigar la composición completa de la leche y el huevo.

Explicar el comportamiento de las proteínas al ser sometidas a cada uno de los factores que alteran la solubilidad proteica.

Explicar la diferencia entre desnaturalizar e hidrolizar. ¿Qué efecto tiene sobre la caseína de la leche un cambio de pH?

Investigar el fundamento de la reacción de Biuret. Incluir interferencias.

¿Qué es una curva patrón? ¿Cómo se construye y para qué sirve?

Investigar la ley de Lambert Beer

Explique que el efecto salting-in y salting-out

¿Cómo influye la constante dieléctrica sobre la solubilidad de las proteínas?

¿Cómo influye la temperatura sobre la solubilidad de las proteínas?

## MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
20 mL de leche descremada
1 huevo
1 limón
1 navaja de un solo filo

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACION
400 mL de NaCl al 0.9%	2.25g de NaCl en 250mL de agua destilada
30 mL de HCl al 2%	4.54mL de HCl y aforar a 100mL con agua destilada
30 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado	100g de sulfato de amonio en 250mL
50 mL albúmina (5mg de albúmina sérica/mL)	250mg de albúmina en 50mL 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.
40 mL acetona Q.P.	
30 mL etanol al 96°	
agua destilada	

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### A) SEPARACIÓN DE CASEÍNA DE LA LECHE

Diluir 10 mL de leche descremada con 25 mL de agua destilada, en un vaso de 100 mL. Añadir lenta y cuidadosamente gotas de jugo de limón hasta llegar al punto isoeléctrico de la proteína (pH de 4.8) momento en el cual se observará precipitación.

Agitar suavemente durante 2 min y dejar reposar por 3 min

Transferir todo volumen equitativamente a 4 tubos de centrifuga .

Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.

Unir todo el sobrenadante y rotularlo como L

Dejar los tubos boca abajo en la gradilla mientras realizan e resto de la práctica, hasta 45 minutos antes de la salida.

Con una espátula pequeña sacar toda la caseína de los tubos y colocar en un papel filtro previamente pesado. Lavar el precipitado consecutivamente con 1 mL de etanol y con 1 mL de acetona

Dejar secar sobre el papel filtro (24 hrs mínimo)

Obtener por diferencia el peso del precipitado

### B) DILUCIÓN DE LA CLARA DE HUEVO

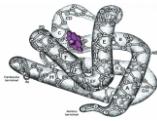
Pesar con cuidado un huevo

Romper la cáscara, separar la clara de huevo y medir su volumen en una probeta

Diluir 5 mL de clara de huevo con 15 mL de solución salina 0.9%. Mezclar con varilla de vidrio.

Filtrar la solución sobre gasa

Rotular el filtrado como H



## COMPROBACIÓN DE LOS FACTORES QUE ALTERAN LA SOLUBILIDAD PROTEICA

**Proceda a realizar esta parte cuando tenga listas las muestras L Y H**

Medir en tubos de ensaye y por separado, 4 alícuotas de 1 mL cada una de sobrenadante de leche (L) y de filtrado de huevo (H), rotular cada tubo como L1, L2, L3, L4; H1, H2, H3, H4, según corresponda

Adicionar a los tubos 1 , 1 mL de HCl al 2%

Adicionar a los tubos 2 , 1 mL de acetona

Adicionar a los tubos 3 , 1 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado

Calentar en un baño a ebullición los tubos 4

Realizar cuidadosamente sus observaciones y registrarlas en la tabla I

## D) CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

1. Disponer de una solución patrón de albúmina en NaCl al 0.9% de concentración 5 mg de albúmina sérica por mililitro para preparar la curva patrón:

2. Preparar 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)

**Debe respetarse el orden de adición de los reactivos**

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



3. Preparar simultáneamente los tubos 7, 8 y 9, son los tubos problema de suero de leche, filtrado de clara de huevo y caseína.
4. Mezclar cuidadosamente cada uno de los tubos, incubar en un baño de agua a 50°C durante 10 min, para desarrollar el color. Los colores que aparecen son estables durante 1 hora.
5. Después de que los tubos se han enfriado y desarrollado el color, se efectúan las lecturas a 540 nm en el espectrofotómetro y se registran en la tabla II
6. Trazar un gráfico Absorbancia vs Concentración (en el eje de las abscisas (x) C en mg/mL de proteína y en el eje de las ordenadas (y) la absorbancia).
7. Interpolan la absorbancia del tubo problema para conocer la cantidad de proteína en la muestra
8. Calcular la concentración de proteína en la muestra original, tomar en cuenta las diluciones realizadas (en caso de dudas solicite asesoría) y comparar con los datos reportados en la literatura o las etiquetas de los productos utilizados.

## RESULTADOS Y OBSERVACIONES

TABLA I. FACTORES QUE ALTERAN LA SOLUBILIDAD PROTÉICA

MUESTRA	OBSERVACIONES
L1	
L2	
L3	
L4	
H1	
H2	
H3	
H4	

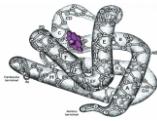


TABLA II. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

No. TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C ( mg/mL )									
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, qué proteínas son las que se estarían afectando.

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

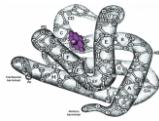
Comparar los valores de proteínas obtenidas con lo reportado por los fabricantes.

## REFERENCIAS

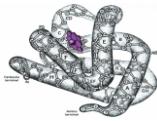
Hernández, L. y González, C. (2002). *Introducción al Análisis Instrumental*. Barcelona, España: Ariel.

Landgrebe, J. (2005). *Theory and Practice in the Organic Laboratory* (5<sup>a</sup> ed.). USA: Thomson LeRNAing.

Llamas, J., García, E. y Canoira, L. (1986). *Quimiometría y Métodos Instrumentales de Análisis*. España: Universidad Politécnica de Madrid.



DISPOSICIÓN DE RESIDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Sobrenadante de suero de leche		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R2	Etanol/acetona. Sobrenadante de suero de leche y filtrado de clara de huevo con acetona			Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R3	Papel filtro con caseína	10 cuadritos de papel	No aplica	Depositar en la basura municipal
R4	Cascarón de huevo	10	No aplica	Depositar en la basura municipal
R5	Clara de huevo	Aprox 300 mL	No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R6	Sobrenadante de suero de leche y filtrado de clara de huevo con HCl diluido		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R7	Sobrenadante de suero de leche y filtrado de clara de huevo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R8	Sobrenadante de suero de leche y filtrado de clara de huevo		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R9	Soluciones de reacción de biuret, contiene cobre II	Aprox 450 mL	T	Disponer en un frasco debidamente etiquetado



## PRÁCTICA 7

# REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

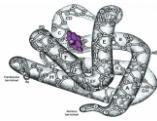
### INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son compuestos orgánicos formados en su mayoría de carbono, hidrógeno y oxígeno, algunos contienen azufre y nitrógeno, son productos primarios de la fotosíntesis. Químicamente son polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas o compuestos que por hidrólisis los producen. Muchos de ellos tienen la fórmula empírica  $C_n(H_2O)_n$  por lo que originalmente se les dio el nombre de hidratos de carbono. Reciben también 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, estructurales, antibióticos y coenzimas, forman parte de los ácidos nucleicos, así como 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 hormonales.

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 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: 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, heparina, etc.

Se comportan como ácidos muy débiles y la presencia del grupo carbonilo en los carbohidratos, permite que estas moléculas presenten gran variedad de reacciones, Las pruebas de laboratorio para identificar a los carbohidratos son sumamente sencillas y se basan en las características químicas antes mencionadas. Entre las reacciones más frecuentemente usadas para la identificación de carbohidratos se encuentran: Benedict, Tollens, Fehling, Bial, Molisch-Udransky, Seliwanoff, Dishe, formación de osazonas, y para polisacáridos la reacción con lugol. Varias de las pruebas coloridas presentan mayor o menor sensibilidad en unos carbohidratos que en otros, dependiendo de sus características químicas particulares, es decir, si se trata de cetosas, aldosas, pentosas, ácidos urónicos, etc.



## OBJETIVO

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

## INVESTIGACIÓN PREVIA

Concepto y clasificación de carbohidratos

Que funciones desempeñan los carbohidratos en un sistema biológico

Lista de propiedades físicas y químicas de carbohidratos

Explicar el fundamento químico, anotando las estructuras en cada una de las reacciones que se van a realizar, justificando el uso de cada reactivo.

Investigar en que consiste la hidrólisis ácida, cuales son los productos obtenidos de cada muestra a hidrolizar.

Investigar los carbohidratos presentes en cada una de las muestras a trabajar.

## MATERIALES Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
10 mL de miel de abeja
10 mL de leche
10 mL de miel de maíz
1 limón
1 papa pequeña

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
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	
35 mL de solución al 0.1% de c/u de los siguientes carbohidratos: xirosa, glucosa, ribosa, manosa y 50 mL de sacarosa	0.1 g del carbohidrato en 100 mL de agua destilada
Soluciones A y B de Fehling (75 mL de cada una)	Sol. A: 6.93 g de sulfato de cobre aforado a 100 mL con agua



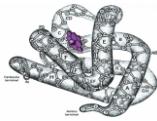
	Sol. B: 25 g de KOH + 34.6 g de tartrato doble de sodio y potasio aforado a 100mL con agua mezclar 1:1
Lugol (dos frascos gotero con 25 mL c/u)	0.7g de yodo metálico + 1.8g de KI + 1mL de HCl al 2% aforado a 50mL con agua
250 mL de HCl concentrado	
250 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	
75 mL de solución de almidón al 1%	1 g de almidón en 100 mL de agua
100 mL reactivo de Molish (en frasco gotero)	5 g de alfa naftol en 100 mL de etanol 96°
100 mL de reactivo de Bial (en frasco gotero)	3 g de orcinol aforado a 100mL con etanol + 20 gotas de FeCl <sub>3</sub> al 10% en agua
1 sobre con 0.1 g de cada uno de los siguientes carbohidratos: glucosa, ribosa, galactosa, manosa, fructosa	
10 L agua destilada	
50 mL de NaOH 1 N	

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### DILUCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Diluir 2 gotas de miel de maíz con 10 mL de agua destilada.
2. Diluir 2 gotas de miel natural con 10 mL de agua destilada.
3. En un vaso diluir 2 mL de leche con 10 mL de agua destilada. Adicionar gotas de limón hasta desnaturalizar las proteínas. Transferir a un tubo de ensaye y dejar reposar para que la caseína沉淀e. El suero de leche se utilizará para la reacción de Fehling.
4. Raspar un trozo pequeño de papa y colocarlo en un tubo de ensaye. Agregar 5 mL de agua destilada y disgregue con ayuda de una varilla de vidrio toda la muestra, la solución debe verse turbia. Agite cada vez que vaya a utilizarla para asegurar que el almidón no esté sedimentado,

NOTA: ESTAS MUESTRAS PREPARADAS O DILUIDAS SON LAS QUE SE VAN A UTILIZAR PARA LAS SIGUIENTES REACCIONES



## B) HIDRÓLISIS ÁCIDA DE CARBOHIDRATOS

Etiquetar 3 tubos de ensayo como: papa, almidón y sacarosa. Se colocan en cada tubo 2 mL de la muestra correspondiente

Añadir a cada tubo 0.5 mL de HCl concentrado y mezclar suavemente

Los tubos se colocan en un baño María en ebullición durante 10 minutos

Retirar los tubos del baño y enfriarlos al chorro del agua. Cuidar de no contaminar el contenido de los mismos

Neutralizar el contenido de todos los tubos con 0.5 mL de NaOH

## C) REACCIÓN DE MOLISH

Preparar una serie de 8 tubos de ensayo y se etiquetarlos como: almidón, glucosa, ribosa, manosa, galactosa, sacarosa, miel de maíz y miel natural

Colocar en cada tubo 0.5 mL de las muestras correspondientes

Agregar 2 gotas de reactivo de Molish y se mezclar perfectamente.

Dejar resbalar por las paredes del tubo cuidadosa y lentamente 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, y sin agitar permita que se estratifique

Observar en la interfase el anillo de color rojo violeta que se indica prueba positiva.

## D) REACCIÓN DE BIAL

Disponer una serie de 4 tubos de ensayo y se etiquetan como: glucosa, ribosa, miel de maíz y miel natural

Colocar en cada tubo 1 mL de cada uno de las muestras correspondientes

Añadir a cada tubo 8 gotas del reactivo de Bial y mezclar

Agregar cuidadosamente a cada tubo 1.5 mL de HCl concentrado, agitar suavemente y tapar

Colocar los tubos en un baño María en ebullición durante 10 min

Observar la coloración verde-azulada que indica prueba positiva

## E) REACCIÓN DE FEHLING

Preparar 16 mL del reactivo de Fehling (mezcle 8 mL de la solución A y 8 mL de la solución B de Fehling)

Disponer una serie de 12 tubos de ensayo y etiquetar como: agua, glucosa, ribosa, sacarosa, miel Karo y miel natural, suero de leche, hidrolizado de papa, hidrolizado de almidón, hidrolizado de sacarosa, almidón y solución de raspado de papa.

Colocar en cada tubo 2 mL de agua

Añadir a cada tubo 1 mL de la mezcla del reactivo de Fehling y mezclar

Agregar a cada tubo 0.5 mL de la muestra correspondiente, mezclar y tapar

Colocar los tubos en un baño María en ebullición

Observar la aparición de un precipitado rojo ladrillo que indica prueba positiva



## F) REACCIÓN DE LA FENILHIDRACINA (FORMACIÓN DE OSAZONAS)

Preparar la osazona del carbohidrato proporcionado por su asesor.

Colocar en un tubo de ensaye 0.1g del carbohidrato correspondiente, 0.2 g de fenilhidrazina y 0.3 g de acetato de sodio

Añadir a cada tubo 2 mL de agua y mezclar hasta disolución

Tapar los tubos con tapones metálicos

Colocar el tubo en un baño María en ebullición hasta la aparición de cristales

Sacar los tubos y dejar enfriar

Decantar la mayor parte del líquido (debe quedar un poco)

Tomar cuidadosamente una pequeña cantidad de los cristales y colocarlos sobre un portaobjetos, sin presionar colocar un cubreobjetos

Examinar los cristales bajo el microscopio

Dibujar los cristales de todas las osazonas preparadas

## G) PRUEBA DE LUGOL

Colocar en una placa de porcelana en diferentes pozos 2 gotas de las siguientes muestras: almidón, almidón hidrolizado, solución de papa, solución de papa hidrolizada.

A cada muestra agregar 2 gotas del reactivo de lugol

Observar el color que se desarrolla

## RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Todos los resultados observados se registran en los siguientes cuadros:

En el cuadro A, únicamente escribir positivo o negativo, dependiendo del color o precipitado observado.

En el cuadro B se deben de dibujar los cristales de las osazonas de los carbohidratos y sus fórmulas.



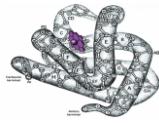
**MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO  
DE BIOQUÍMICA GENERAL**



**2025-II**

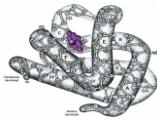
**CUADRO A: Resultados de las reacciones generales para carbohidratos.**

CARBOHIDRATO	PRUEBA DE MOLISH	PRUEBA DE BIAL	PRUEBA DE FEHLING	PRUEBA DE LUGOL
ALMIDÓN				
SACAROSA				
GLUCOSA				
MANOSA				
GALACTOSA				
RIBOSA				
SUERO DE LECHE				
PAPA				
MIEL KARO				
MIEL NATURAL				
HIDROLIZADO DE PAPA				
HIDROLIZADO DE SACAROSA				
HIDROLIZADO DE ALMIDÓN				
MUESTRA PROBLEMA				Nombre del carbohidrato identificado en la muestra problema:



CUADRO B: Resultados de la formación de osazonas.

CARBOHIDRATO	CRISTALES DE OSAZONAS	FÓRMULA DE LAS OSAZONAS
GLUCOSA		
MANOSA		
XILOSA		
RIBOSA		
FRUCTOSA		



## 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. Que proteína se separa y cual es el fundamento de ello.

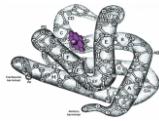
Función del etanol y acetona con el precipitado obtenido.

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. que compuesto interfiere y porqué.

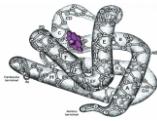
Comparar los valores de proteínas obtenidas con lo reportado en los productos comerciales.

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Muestras de miel, leche y para diluidas		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R2	Soluciones neutralizadas de hidrólisis de carbohidratos		No aplica	Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R3	Molish			Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R4	Bial			Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R5	Fehling			Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R6	Cristales de ozasonas con acetato de sodio		No aplica	Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R7	Cristales de ozasonas con acetato de sodio		No aplica	Tirar a la basura municipal
R8	Gotas de polisacáridos con lugol en la placa de porcelana			Limpiar placa de porcelana con servitoalla y tirar a la basura municipal. Lavar placa



## REFERENCIAS

- Mackenzie, C. (2004). *Experimental Organic Chemistry* (4<sup>a</sup> ed.). USA: Prentice-Hall.
- Sanmartín, C. (2005). *Experimentación en Química Orgánica*. México: Ulzama.
- Wingrove, A. y Caret, R. (1981). *Química Orgánica*. México: Oxford University Press.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell* (5<sup>a</sup> ed.) País: Garland Science.
- San Andrés Tejera, L., Afonso, M. y Rodríguez, M. (2004). *Laboratorio de Química Orgánica. Técnicas Básicas*. Tenerife, España: Arte Comunicación Visual.
- Higson, S. y Balderas, P. (2007). *Química Analítica*. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana.
- 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* (5<sup>a</sup> ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Frasman, G. (1989). *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. USA: CRC Press.



## PRÁCTICA 8

# EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

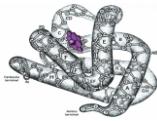
### INTRODUCCIÓN

Los lípidos son una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos que se encuentran en los seres vivos y que pueden extraerse de las células por medio de solventes no polares como éter, benceno, cloroformo, tetracloruro de carbono, etc. Desde un punto de vista bioquímico los lípidos son esteres reales o potenciales de ácidos grasos. Debido a su valor energético son constituyentes muy importantes en la dieta, ya que las grasas y los aceites proporcionan de dos veces más calorías que los carbohidratos y las proteínas.

Se les clasifica atendiendo a alguna propiedad física o química, por ejemplo con base en la estructura química se les divide en dos grandes grupos: lípidos saponificables y lípidos no saponificables. Los lípidos saponificables son ésteres de ácidos grasos con un alcohol, que con frecuencia es la glicerina y al hacerlos reaccionar con una base fuerte, como el hidróxido de sodio o de potasio, forman jabones. Los aceites, las grasas, las ceras, los esfingolípidos y los fosfoglicéridos son ejemplos de este tipo de lípidos. Los lípidos no saponificables no contienen grupos éster, su estructura puede ser cíclica o lineal, pertenecen a esta categoría los ácidos grasos, los esteroides, las prostaglandinas y los terpenos. Otra clasificación los agrupa de acuerdo a sus productos de hidrólisis. Se les divide en tres categorías: Lípidos simples, lípidos complejos y lípidos derivados.

En el reino animal, los lípidos son los compuestos de reserva de energía de largo plazo más importantes. Los lípidos protegen a los órganos vitales, evitando daños traumáticos y manteniendo la temperatura óptima del cuerpo. Son además parte integral de la estructura de la membrana celular y, como tal, están relacionados con el transporte de iones y moléculas a través de dichas membranas. Otras funciones que desempeñan son: reserva energética, mensajeros químicos, pigmentos y aromas, componentes esenciales del reconocimiento celular, etc.

Los lípidos se encuentran en los tejidos vivos en forma de mezclas complejas y muy heterogéneas, el aislamiento, purificación e identificación son etapas a la vez difíciles y muy interesantes. La metodología moderna es sumamente rica y versátil, incluye marcaje con isótopos, cromatografía de gases y HPLC. Sin embargo los métodos clásicos de extracción con solventes y la separación e identificación por cromatografía en capa fina siguen rindiendo buenos resultados y son importantes en el aprendizaje ya que marcan la base histórica y metodológica del estudio de los lípidos. Los fosfolípidos, los glicerofosfolípidos son muy abundantes, su presencia en animales depende del tejido y de la dieta. Un modelo muy utilizado para el estudio de la química de lípidos es la yema de huevo, puesto que presenta una gran cantidad y una amplia variación de los mismos.



## OBJETIVO

Aplicar técnicas de extracción, separación, identificación de lípidos, así como comprobar la solubilidad que presentan muestras puras y comerciales en solventes apolares, mediante el aislamiento con solventes orgánicos, el separación cromatográfica en capa fina bidimensional, la identificación con diferentes reactivos reveladores, con la finalidad de confirmar algunas características fisicoquímicas de los fosfolípidos de la yema de huevo y de diversos lípidos.

## INVESTIGACIÓN PREVIA

Investigar las propiedades fisicoquímicas y estructura de los lípidos estudiados en la práctica.

Presentar en una tabla las estructuras químicas de los fosfolípidos

Explicar el fundamento de la extracción por solventes

Investigar el fundamento de la cromatografía en capa fina y explicar el uso de mezclas de solventes como fase móvil

Investigar la composición química de la yema de huevo

Investigar el fundamento, estructura y reacción química de cada uno de los reveladores a utilizar en la práctica.

## MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS
Aceite de oliva 5 mL
Aceite comestible 5 mL
Leche entera 20 mL
Dos huevos

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
450 mL de metanol	
850 mL cloroformo	
10 mL de ácido acético	
30 mL de revelador de ninhidrina al 0.5 % (frasco ámbar 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 100mL con agua y se le



	agregan 100 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 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
250 mL de solución de KCl al 0.1 M	1.86 g de KCl aforado a 250 mL con agua destilada
15 mL de glicerina gotero	
15 mL de ácido oléico en gotero	
1g de ácido palmítico	
50 ml etanol 96°	
50 mL acetona QP	
50 mL benceno QP	

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### A) EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE YEMA DE HUEVO

1. Separar la yema de la clara de huevo, teniendo cuidado de que no se rompa. Desechar la clara
2. Colocar la yema en un vaso de precipitados de 250 mL
3. Preparar 60 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1)
4. Añadir 40 mL aproximadamente de la mezcla a la yema de huevo y agitar fuertemente con el agitador de vidrio
5. Filtrar la mezcla sobre gasa, recibir el filtrado en un vaso de 100 mL
6. Transferir el filtrado al embudo de separación y añadir los 20 mL restantes de la mezcla de cloroformo-metanol
7. Agitar fuertemente y dejar reposar para que se separen las fases (en caso de que no se separen agregar 15 mL de KCl 0.1M, se vuelve a agitar y se deja reposar)
8. Colectar la fase orgánica en matraz Erlenmeyer y desechar la fase polar
9. Evaporar la fase orgánica en un baño de agua en las parrillas y dentro de la campana, hasta más o menos un 20% del volumen original

### PREPARACIÓN DE LAS CÁMARAS PARA CROMATOGRAFÍA. LO REALIZA EL EQUIPO DESIGNADO POR EL ASESOR

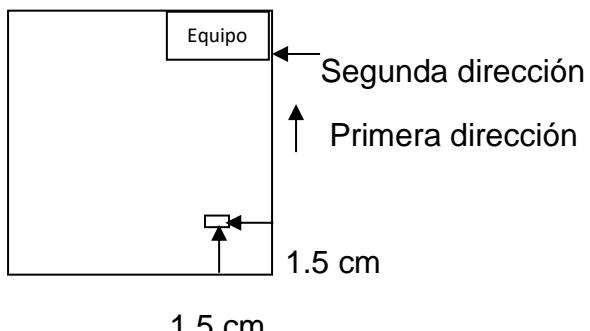
Lavar y secar cuidadosamente dos cámaras para cromatografía y engrasar las tapas  
En una cámara agregar 100 mL de una mezcla cloroformo-metanol 1:1, tapar y dejar saturar durante 15 min. Etiquetar como 1, se usará para el primer corrimiento  
En la otra cámara adicionar 100 mL de una mezcla cloroformo-metanol-ácido acético-agua en una relación 64:24:8:4, tapar y dejar saturar durante 15 min. Etiquetar como 2, se usará para el segundo corrimiento



Etiquetar ambas cámaras con el nombre de los solventes, así como las cantidades utilizadas.

### PREPARACIÓN DE LA PLACA PARA CROMATOGRAFIA

Cortar de una placa para cromatografía un cuadrado de 10 x 10 cm (usar guantes)  
Realizar con lápiz las marcadas indicadas en el siguiente dibujo:



### SEPARACIÓN DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Aplicar cuidadosamente con un capilar la muestra del extracto orgánico, en el recuadro marcado en la placa para cromatografía (ver dibujo anterior)

Dejar secar y volver a aplicar, repetir 4 o 5 veces

Colocar las placas de todo el grupo, al mismo tiempo en la cámara para cromatografía marcada con el número 1

Dejar correr la cromatografía hasta que el solvente recorra hasta 2 cm antes del borde superior

Sacar las placas y dejar secar unos 10 minutos, agite para acelerar el secado

Girar las placas 90º respecto al primer corrimiento y colocarlas en la cámara marcada con el número 2

Dejar que el solvente ascienda hasta recorra hasta 2 cm antes del borde superior

Sacar los cromatogramas. Dejar secar (agite para acelerar el secado)

### IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

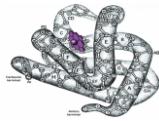
Observar los cromatogramas bajo luz ultravioleta

Marcar cuidadosamente con lápiz, las manchas que se observan

Revelar las placas con los reveladores de nihidrina, bismuto y molibdeno. Sus asesores indicarán que revelador le toca a cada equipo de trabajo

Rociar los cromatogramas con el revelador correspondiente en la campana

El cromatograma rociado con nihidrina, se coloca cuidadosamente sobre una placa de calentamiento durante unos minutos, sin que toque directamente la superficie, hasta que se observen manchas de color púrpura



## PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

### TRABAJAR UNA SOLA MUESTRA CON TODOS LOS SOLVENTES

Etiquetar 5 tubos de ensayo chicos con el nombre del solvente indicado en la tabla A  
Colocar 5 gotas del lípido indicado o una pizca en el caso de sólidos más 10 gotas del solvente respectivo.

Mezclar suavemente, observar y anotar el resultado en la tabla indicada anteriormente  
Lave muy bien los tubos con jabón y séquelos entre una muestra y la siguiente para evitar resultados incorrectos

## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

TABLA A. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.

LIPIDO	REACTIVO				
	Agua	Acetona	Etanol	Benceno	Cloroformo
Glicerina					
Ácido oleico					
Ácido palmítico					
Aceite comestible					
Aceite de oliva					
Leche entera					

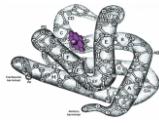
(-) INSOLUBLE

(+/-) PARCIALMENTE SOLUBLE

(++) SOLUBLE

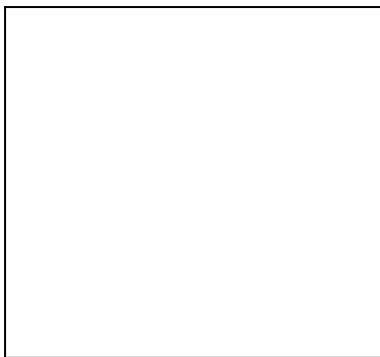
(+++) MUY SOLUBLE

### E. IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS



Cada equipo dibuja de su cromatograma respetando los colores que se observan e intercambian sus dibujos con todo el grupo, de tal manera que cada equipo debe tener 4 dibujos que corresponden a la observación con luz ultravioleta y a cada uno de los reveladores ninhidrina, bismutato y molibdato.,.

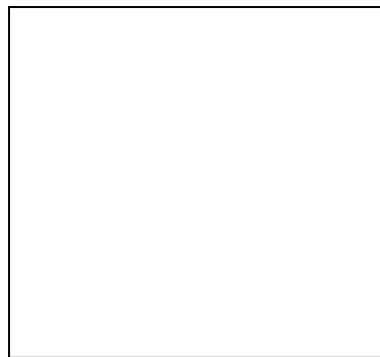
Para su reporte, Investigue qué tipo de lípido identifica cada revelador y con luz ultravioleta, además de expresar su fórmula.



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 chromatograma?.

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

PRÁCTICA 8: EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS				
DISPOSICIÓN DE RESIDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Extracto de yema de huevo con cloroformo		No aplica	Disponer en frasco debidamente etiquetado
R2	Placas de silica y aluminio con reveladores		No aplica	Envolver en papel y depositar en la basura municipal
R3	Mezcla cloroformo:metanol 1:1	100 mL	Explosiva	Reutilizar para otros grupos o disponer en un frasco debidamente etiquetado
R4	Mezcla cloroformo:metanol:ácido acético:agua 65:25:8:4	100 mL	Corrosiva	Reutilizar para otros grupos o disponer en un frasco debidamente etiquetado
R5	Muestras biológicas de lípidos con solventes orgánicos	Aprox 30 mL		Verter a la tarja y dejar correr agua. La cantidad generada por equipo no permite disponer en frasco de residuos.

## REFERENCIAS

Wingrove, A. y Caret, R. (1981). *Química Orgánica*. México: Oxford University Press.

Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell* (5<sup>a</sup> ed.). USA: Garland Science.

San Andrés Tejera, L., Afonso, M. y Rodríguez, M. (2004). *Laboratorio de Química Orgánica. Técnicas Básicas*. Tenerife: Arte Comunicación Visual.

Higson, S. y Balderas, P. (2007). *Química Analítica*. México, DF: McGraw-Hill Interamericana.

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* (5<sup>a</sup> ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.

Frasman, G. (1989). *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. USA: CRC Press.



## **PRÁCTICA 9**

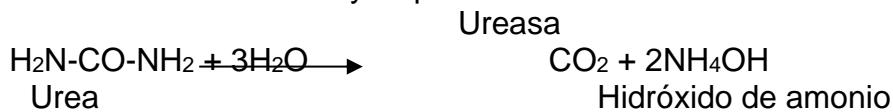
# **CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA UREASA**

## **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.

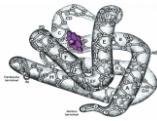


La ureasa está presente en muchas plantas, hongos, algas y bacterias, tiene un papel importante en el metabolismo del nitrógeno en la naturaleza. Tanto las plantas como los microorganismos descomponen una gran variedad de fuentes de urea en su medio ambiente.

El sitio activo de la ureasa se encuentra en la subunidad alfa de la enzima conteniendo 2  $\text{Ni}^{2+}$ . 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  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  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 (°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 Km y la Vmax, ¿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 neutro al 1% (2 frascos gotero con 10 mL c/u)	1g de rojo neutro 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 150 frijoles de soya con 200 mL de etanol al 30% y los homogeneizará 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 250 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.**



### EFFECTO 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 (mL)	5	6	7.2	8.5	10
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4
Incubar a 50º C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50º 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 (mL)	5	6	7.2	8.5	10
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4
Incubar a 50º C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50ºC durante 30 min.					

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 neutro.

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



## 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 50º C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50º C durante _____ min.	10	20	30	40	50

Preparar los tubos problema de la siguiente forma:

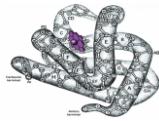
Tubo	1	2	3	4	5
Urea 0.25M (mL)	5	5	5	5	5
Sol. Buffer pH 7.2 (mL)	3	3	3	3	3
Incubar a 50º C durante 5 min.					
Ureasa (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50º C durante _____ min.	10	20	30	40	50
Sulfato de cobre al 1% (GOTAS)	4	4	4	4	4

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 neutro.

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



## EFECTO 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)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
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)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
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 neutro.

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.

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 (serán los 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)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar 30 minutos a	0 ° C	T°ambiente	50 ° C	70 ° C	90 ° C

2. Prepare la siguiente serie de tubos (serán los 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)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
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 neutro

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

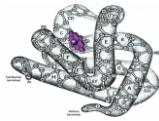
Para cada factor hay dos tablas, la de arriba es para los resultados de su mesa, la de abajo sus profesores le indicarán que resultados anotar.

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	μmoles 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	μmoles de urea hidrolizadas/ 30 min
1					
2					
3					
4					
5					

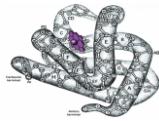


Efecto del tiempo en la velocidad de reacción. Equipo:

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

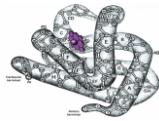


Efecto de la temperatura en la velocidad de la reacción

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

$$\text{Micromoles de urea hidrolizada} = \text{VTC} \times 25$$

$$\text{VTC} = \text{VTP} - \text{VTB}$$

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.

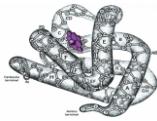
Construir las gráficas correspondiente V.R. (velocidad de reacción) contra cada uno de los factores trabajados : pH, T°C, t(min) y concentración de sustrato

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.

## REFERENCIAS

- Flores, L., Sánchez, S. y Uribe, S. (año). *Bioquímica. Manual de Prácticas*. México, DF: McGraw-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* (5<sup>a</sup> ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Frasman, G. (1989). *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. USA: CRC Press



## PRÁCTICA 10

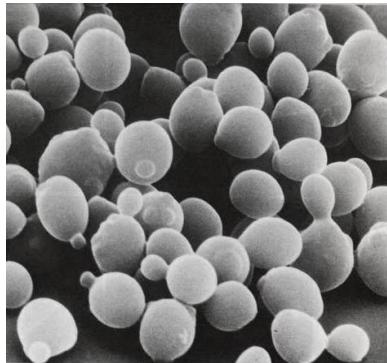
# METABOLISMO: FERMENTACIÓN

### INTRODUCCIÓN

Los organismos heterótrofos obtienen energía oxidando moléculas orgánicas y acoplando las reacciones de oxidación a la síntesis de ATP. El ATP se usa para realizar todas las actividades necesarias para el mantenimiento del organismo.

Algunos organismos son capaces de existir en ausencia de oxígeno molecular, incluso pueden ser perjudicados por la presencia de este elemento. La respiración anaeróbica, -en ausencia de oxígeno- se llama fermentación. Inicia con una sustancia rica en energía como la glucosa, utiliza las enzimas de la glicólisis y finalmente produce etanol y anhídrido carbónico o una mezcla de ácidos orgánicos y otros compuestos. Hay una ganancia neta de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada en la fermentación.

Los productos de fermentación varían de un tipo de célula o microorganismo a otro. La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias. Los seres humanos han aprovechado este proceso para la fabricación de pan, cerveza, y vino. El bióxido de carbono crea la efervescencia en la cerveza y hace que el pan "suba" dentro del horno. El etanol que se produce es el alcohol presente en la cerveza y en los vinos. Para la elaboración de estos tres productos se emplea el mismo microorganismo: la levadura común o *Saccharomyces cerevisiae*.



*Saccharomyces cerevisiae*

### OBJETIVO

Realizar la fermentación alcohólica con levadura, bajo diferentes condiciones para relacionar este tipo de metabolismo con la producción de energía que se realiza en estos organismos.



## INVESTIGACIÓN PREVIA

1. Investigar la definición de Respiración aeróbica y respiración anaeróbica.
2. ¿Qué tipo de fermentación realiza la levadura *Saccharomyces cerevisiae*? Puede metabolizar todos los carbohidratos que se van a trabajar en la práctica?
3. Explique con detalle en un esquema la glucólisis. Incluya fórmulas y enzimas que participan. Justifique el número de moléculas de ATP que se forman
4. ¿La tasa de fermentación se afecta con la temperatura? explicar
5. ¿Qué efecto provoca el NaF sobre la glucólisis? ¿Afecta a alguna enzima en especial? ¿Cuál y cómo?

## MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL ADICIONAL
1 Paquete cerrado de levadura en polvo para hornear

REACTIVOS	FORMA DE PREPARACIÓN
500 mL de solución de glucosa al 10 % p/v	10 g de glucosa se disuelven con 100 mL de agua destilada
200 mL de solución de glucosa al 2 % p/v	2 g de glucosa se disuelven en 100 mL de agua destilada
50 mL de solución de galactosa al 2 % p/v	2 g de galactosa se disuelven en 100 mL de agua destilada
50 mL de solución de fructosa al 2 % p/v	2 g de fructosa se disuelven en 100 mL de agua destilada
50 mL de solución de sacarosa al 2 % p/v	2 g de sacarosa se disuelven en 100 mL de agua destilada
100 mL de NaF al 0.01M	0.042 g de NaF se disuelven en 50 mL de agua destilada y se aforan a 100 mL
100 mL de reactivo de Benedict	Pesar 100 g de NaCO <sub>3</sub> y disolver en 200 mL de agua destilada hervida Pesar 173 g de citrato de sodio y disolver en 200 mL de agua destilada hervida Pesar 17.3 g de CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O y disolver en 300 mL de agua destilada hervida Mezclar las 3 soluciones cuando estén frías y aforar a 1 L



## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

NOTA: Es importante revisar la temperatura a la cual deben estar las soluciones que se van a utilizar.

Preparar un baño de agua con hielo (0 °C) y un baño a 37 °C, solicite instrucciones al asesor para saber cuáles soluciones y que volumen de cada una se deben colocar en cada uno.

### PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE LEVADURA AL 10% P/V

Pesar 7g de levadura y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 150 mL

Agregar 70 mL de agua destilada

Agitar la mezcla hasta que se disuelva la levadura

Colocar 10 mL de suspensión de levadura en un baño de hielo, los otros 60 mL en un baño a 37°C y taparlos.

### DEMOSTRACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSA CON LA PRUEBA DE BENEDICT

Prueba de Benedict:

Fermentación de glucosa.

En un tubo de ensaye 16 x 150 cm, agregue 10 mL de una solución de glucosa al 2%.

Agregar 3 mL de suspensión de levadura al 10% a 37°C

Mezclar perfectamente hasta que la mezcla este homogénea

Incubar a 37°C

A los 30 minutos cuando prepare la primera prueba de Benedict prepare los siguientes tubos:

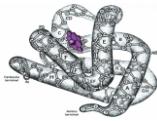
Tubo muestra	Blanco levadura	Blanco glucosa
Del tubo de fermentación tome 0.5 mL	Mezclar 3 mL de levadura al 10% con 10 mL de agua destilada. De aquí tomar únicamente 0.5 mL	0.5 mL solución de glucosa al 2%,.
Agregar 1 mL del reactivo de Benedict	Agregar 1 mL del reactivo de Benedict	Agregar 1 mL del reactivo de Benedict

Calentar en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos

Prueba positiva : color rojo ladrillo

Prueba negativa: color azul

Realizar una prueba de Benedict con 0.5 mL de la mezcla a los 60, 90 y 120 minutos de incubación. Registrar sus resultados en la tabla 1



### C) FERMENTACIÓN CON DIFERENTES CARBOHIDRATOS

Rotular cinco tubos de ensaye como: agua, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa es muy importante respetar el orden de adición de los reactivos.

Adicionar 2 mL de suspensión de levadura

Tener listas las pipetas de 2 mL rotuladas para los siguiente carbohidratos, un trozo de Servitoalla y papel Parafilm

Para cada uno de los tubos por separado y uno por uno: en el momento en el que la **levadura entra en contacto con el carbohidrato inicia su metabolismo** por lo que es muy importante hacerlo **rápidamente**.

Adicionar a cada uno lo siguiente:

Agua: 2 mL de agua destilada

Glucosa: 2 mL de glucosa al 2%

Fructosa: 2 mL de fructosa al 2 %

Sacarosa: 2 mL de sacarosa al 2%

Galactosa: 2 mL de galactosa al 2 %

Llenar completamente una pipeta graduada de 2mL con la solución del tubo que corresponda y tapar el extremo con un dedo, mientras sella el lado opuesto con un trocito de “parafilm”. Utilizar una pipeta pasteur, continuar el llenado de la pipeta graduada hasta que la solución llegue hasta antes de que se desborde.

Invertir la pipeta y colocar dentro del tubo de ensaye.

Iniciar la toma del tiempo.

Observar cada 5 minutos, durante media hora y con ayuda de una regla anote el volumen desplazado del líquido.

Registrar sus datos en la tabla 2.



#### D) FERMENTACIÓN A DIFERENTES TEMPERATURAS

Preparar un baño de agua con hielo ( $0^{\circ}\text{C}$ ) y un baño a  $37^{\circ}\text{C}$

Rotular dos tubos de ensaye de 16 x 150 cm como: A ( $0^{\circ}\text{C}$ ) y B ( $37^{\circ}\text{C}$ )

Adicionar a cada uno lo siguiente:

A: 7.5 mL de suspensión de levadura incubada  $0^{\circ}\text{C}$  + 7.5 mL de glucosa al 10% + agua destilada fría el volumen necesario para llenarlo al borde.

B: 7.5 mL de suspensión de levadura a  $37^{\circ}\text{C}$  + 7.5 mL de glucosa al 10% + de agua destilada a  $37^{\circ}\text{C}$ . el volumen necesario para llenarlo al borde.

Colocar sobre cada tubo un tubo de ensaye de 25 x 150 cm, inviértalos rápidamente y ponga el tubo A en el baño de agua con hielo ( $0^{\circ}\text{C}$ ) y el B en el baño a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Iniciar la toma del tiempo.

Observar cada 5 minutos, durante media hora y con ayuda de una regla anote el volumen desplazado del líquido.

Registrar sus datos en la tabla 3.

#### E) EFECTO DEL NaF SOBRE LA FERMENTACIÓN

Rotular dos tubos de ensaye de 16 x 150 cm como: C (sin NaF) y D (con NaF)

Adicionar a cada uno lo siguiente:

C: 7.5 mL de suspensión de levadura a  $37^{\circ}\text{C}$  + 7.5 mL de glucosa al 10% + de agua destilada a  $37^{\circ}\text{C}$ . la necesaria para llenarlo hasta el borde.

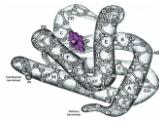
D: 7.5 mL de suspensión de levadura a  $37^{\circ}\text{C}$  + 7.5 mL de glucosa al 10% + solución de NaF 0.01M a  $37^{\circ}\text{C}$  el volumen suficiente para llenarlo hasta el borde.

Colocar sobre cada tubo un tubo de ensaye de 25 x 150 cm, inviértalos rápidamente y ponga los dos tubos en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Iniciar la toma del tiempo.

Observar cada 5 minutos, durante media hora y con ayuda de una regla anote el volumen desplazado del líquido.

Registrar sus datos en la tabla 4.



## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Tabla 1. Demostración de la fermentación de glucosa con la prueba de Benedict

Muestra	Prueba de Benedict
Glucosa	
Levadura	
30 min	
60 min	
90 min	
120 min	

Tabla 2. Fermentación con diferentes carbohidratos

Tiempo (min)	Agua	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Galactosa
5					
10					
15					
20					
25					
30					

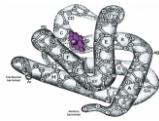


Tabla 3. Fermentación a diferentes temperaturas

Tiempo (min)	A (0°C) Volumen desplazado	A (37°C) Volumen desplazado
5		
10		
15		
20		
25		
30		

Tabla 4. Efecto del NaF sobre la fermentación

Tiempo (min)	TUBO C Volumen desplazado (sin NaF)	TUBO D Volumen desplazado (con NaF)
5		
10		
15		
20		
25		
30		



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

¿Cómo fueron los resultados de la reacción de Benedict para la glucosa y levadura?.

Muestra	Resultado esperado (+ o -)	Justificación bioquímica
Glucosa		
Levadura		

Explique los resultados de la reacción de Benedict a diferentes tiempos:

¿Hasta los cuantos minutos la reacción resulto positiva? ¿En que tiempo la reacción resulto negativa? ¿Cuál es la explicación bioquímica de esto?

Respecto a los diferentes carbohidratos

Durante la metodología, ¿cómo se generaron las condiciones anaeróbicas requeridas?

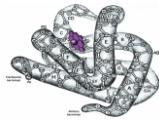
¿Qué tipo de carbohidrato sostuvo la tasa de fermentación más rápida? ¿Puede la levadura metabolizar todos los carbohidratos que se utilizaron? Escriba con fórmulas las reacciones de la glucólisis, incluya enzimas e indique la regulación de la ruta. Y con color amarillo resalte donde puede ingresar cada uno de los carbohidratos utilizados.

Respecto a la temperatura

¿Qué diferencia observó en la fermentación al trabajar en 0°C o en 37°C? como afecta la temperatura la actividad de la levadura? ¿Cuál es la temperatura a la que se realiza la tasa más rápida de fermentación?

Respecto al inhibidor

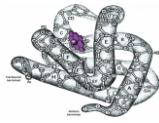
¿Qué efecto provoca sobre la tasa de fermentación el NaF? ¿Qué enzima inhibe? Márquela de color rojo en la ruta de la glucolisis. ¿Cuál es la consecuencia bioquímica de esta inhibición?



PRÁCTICA 10: FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA				
DISPOSICIÓN DE RESÍDUOS				
RESIDUO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD GENERADA POR GRUPO (10 equipos)	CÓDIGO CRETIB	ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN
R1	Levadura en suspensión	Aproximadamente 30 g	No aplica	Residuo biológico no tóxico ni infeccioso, verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R2	Glucosa con reactivo de Benedict	Aproximadamente 70 mL		Disponer en un frasco debidamente etiquetado
R3	Carbohidratos con levadura	100 mL		Verter a la tarja y dejar correr un poco de agua
R4	Carbohidratos, levadura y NaF (pequeña cantidad)	Aprox 200 mL	No aplica	Depositar en la basura municipal

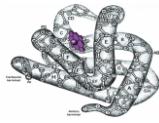
## REFERENCIAS

- Alberts, B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2000). *Biología Molecular de la Célula* (4<sup>a</sup> ed.). Barcelona, España: Omega.
- Cox, N. (2000). *Principios de Bioquímica de Lehninger* (3<sup>a</sup> ed.). Barcelona, España: Omega.
- Stryer, L. (1996). *Bioquímica* (4<sup>a</sup> ed.) Barcelona, España: Reverté.
- Yáñez, A. (1996). *Manual de Prácticas de Bioquímica*. México: IPN.
- Clark, D. (2005). *Molecular Biology*. USA: Elsevier.
- Watson, J. (2003). *El Secreto de la Vida*. España: Santillana Ediciones Generales.



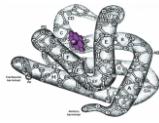
Práctica 1. pH en sistemas biológicos

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



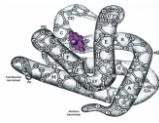
**Práctica 2. Homogenización y centrifugación**

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



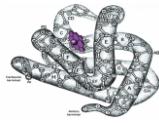
### Práctica 3. Técnicas cromatográficas

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



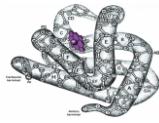
Práctica 4. Diálisis y electroforesis

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



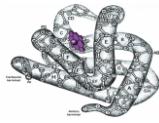
Práctica 5. Extracción de DNA

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



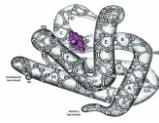
**Práctica 6. Cuantificación de proteínas y factores que alteran su solubilidad**

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



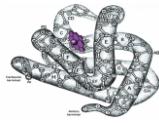
**Práctica 7. Reacciones de identificación de carbohidratos**

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



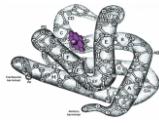
**Práctica 8. Extracción, Separación e identificación de lípidos**

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



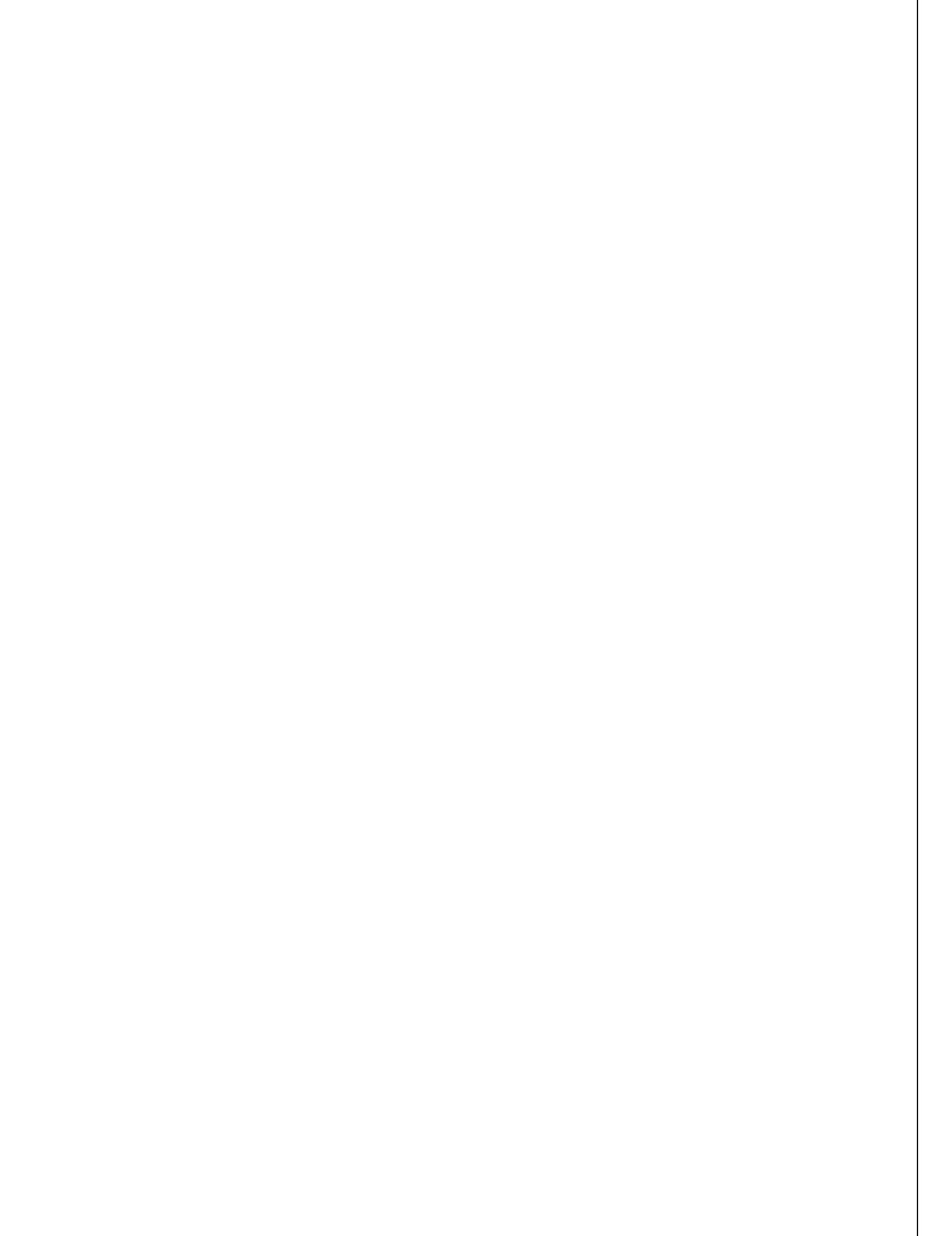
Práctica 9. Cinética enzimática

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



Práctica 10. Metabolismo: fermentación

Grupo		BQD		F		Fecha		equipo	
nombre							firma		



 <p>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO FES CUATITLÁN UNAM</p>	<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b>  <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b>  <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b>  <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b></p>
<p><b>VALE DE MATERIAL</b></p>	<p>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09  Nº Revisión: 00</p>

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II

**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	
Tripié	1	
Tela de asbesto	1	

**FIRMA DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

<p><b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b></p>	<p><b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b></p>
<p>Nombre y firma</p>	<p>Nombre y firma</p>

<p><b>ADEUDO</b></p>
<p><b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b></p>

 <p><b>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO FES CUAUTITLÁN</b></p>	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b> <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b> <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b>	
<b>VALE DE MATERIAL</b>	<b>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09</b>	
		<b>Nº Revisión: 00</b>

**ASIGNATURA** Bioquímica General      **SEMESTRE** 2025-II  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_  
**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** \_\_\_\_\_ Práctica 2: Homogeneización y  
 Centrifugación  
**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Mortero con pistilo mediano	1	
Tubos para centrífuga 15 x 100 mm	10	
Tubos de ensaye 16 x 150 mm	10	
Gradilla	1	
Vidrio de reloj mediano	2	
Pipeta graduada 5mL	3	
Pipeta graduada 10mL	3	
Vaso de precipitados 50mL	3	
Homogenizador Potter	1	
Propipeta	1	

**FIRMA DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
<b>Nombre y firma</b>	<b>Nombre y firma</b>

<b>ADEUDO</b>
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>



**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** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE**

**NOMBRE DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_

NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Práctica 3: Técnicas cromatográficas

NUMERO Y NOMBRE DE LA PRACTICA O EXPERIMENTO Práctica 3. Técnicas cromatográficas

**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Mortero con pistilo mediano	2	
Columna para cromatografía 25 mL.	1	
Soporte universal	1	
Pinzas de presión para bureta	1	
Tubo de ensaye 16 x 150 mm	10	
Tubos de ensaye para centrífuga 15 x 100 mm	10	
Gradilla	1	
Pipeta graduada 2 mL	2	
Pipeta graduada 10 mL	1	
Vaso de precipitados 100 mL	3	
Vidrio de reloj mediano	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

Nº Revisión: 00

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE**

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

**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO**

NUMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO \_\_\_\_\_ Práctica 4: Dialisis y electroforesis

**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

**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**

 <p><b>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO FES CUAUTITLÁN</b></p>	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b> <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b> <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b>	
<b>VALE DE MATERIAL</b>	<b>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09</b>	
		<b>Nº Revisión: 00</b>

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II

**NOMBRE DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** \_\_\_\_\_ Práctica 5: Extracción de DNA

**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado 100mL	5	
Vaso de precipitado 250mL	2	
Vaso de precipitado 600mL	1	
Probeta graduada 50mL	1	
Probeta graduada 100mL	1	
Pipeta graduada 10mL	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** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
<b>Nombre y firma</b>	<b>Nombre y firma</b>

<b>ADEUDO</b>

<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>
----------------------------------

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

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II

**NOMBRE DEL SOLICITANTE**

**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** Práctica 6: Cuantificación de proteínas y factores que alteran su solubilidad

**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
Tubos de ensaye 16 x 150mm	20	
Vaso de precipitado 100mL	1	
Vaso de precipitado 50mL	2	
Pipeta graduada 10mL	1	
Pipeta graduada 1mL	2	
Pipeta graduada 5mL	1	
Probeta graduada 50mL	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** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
---	--

**Nombre y firma**

**Nombre y firma**

<b>ADEUDO</b>
---------------

<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>
----------------------------------

 <p><b>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO</b> UNAM CUAUTITLÁN FES C</p>	<p align="center"><b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b>  <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b>  <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b>  <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b></p>	
<b>VALE DE MATERIAL</b>		<b>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09</b>
		<b>Nº Revisión: 00</b>

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II

**NOMBRE DEL SOLICITANTE**

**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** \_\_\_\_\_ Práctica 7: Reacciones de

Identificación de carbohidratos

**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitados 600mL	1	
Vaso de precipitados 50mL	3	
Probeta 50 mL	1	
Tubos de ensaye 16 x 150mm	20	
Pipeta graduada 1mL	2	
Pipeta graduada 2mL	2	
Pipeta graduada 10mL	1	
Mechero Bunsen	1	
Placa de porcelana	1	
Gradilla p/tubo de 16 x150mm	2	
Tripie	1	
Tela de asbestos	1	
Pinzas p/tubo de ensaye	3	
Piseta	1	
Varilla de vidrio	1	
Propipeta	2	

**FIRMA DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	
<b>Nombre y firma</b>	
<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>	
<b>Nombre y firma</b>	

<b>ADEUDO</b>
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>

 <p><b>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO FES CUAUTITLÁN</b></p>	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b> <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b> <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b>
<b>VALE DE MATERIAL</b>	<b>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09</b>
	<b>Nº Revisión: 00</b>

**ASIGNATURA** Bioquímica General      **SEMESTRE** 2025-II  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_  
**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** \_\_\_\_\_ Práctica 8: Extracción  
Separación e Identificación de Lípidos  
**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado 100mL	2	
Vaso de precipitado 250mL	2	
Embudo de vidrio	1	
Embudo de separación con tapón 250 mL	1	
Varilla de vidrio	1	
Soporte universal	1	
Matraz Erlenmeyer 250mL	1	
Triangulo de porcelana	1	
Probeta 100mL	1	
Tubo de ensaye 15 x 100mm	5	
Gradilla p/tubo 15 x 100mm	1	
Aro metálico	1	
piseta	1	

**FIRMA DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
<b>Nombre y firma</b>	<b>Nombre y firma</b>

<b>ADEUDO</b>
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>

 <p>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO UNAM CUAUTITLÁN FES C</p>	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b> <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b> <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b>
<b>VALE DE MATERIAL</b>	<b>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09</b>
	<b>Nº Revisión: 00</b>

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_  
**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** \_\_\_\_\_ Práctica 9: Cinética Enzimática  
de la 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** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
<b>Nombre y firma</b>	<b>Nombre y firma</b>

<b>ADEUDO</b>
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>

 <p><b>SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD CORPORATIVO FES CUATITLÁN UNAM</b></p>	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b> <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b> <b>SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA</b>	
<b>VALE DE MATERIAL</b>	<b>CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09</b>  <b>Nº Revisión: 00</b>	

**ASIGNATURA** Bioquímica General **SEMESTRE** 2025-II  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_  
**No. DE CUENTA** \_\_\_\_\_ **GRUPO** \_\_\_\_\_ **No. DE EQUIPO** \_\_\_\_\_  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** Práctica 10: Metabolismo: Fermentación  
**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitados 250mL	3	
Vaso de precipitados 100mL	2	
Probeta 100mL	1	
Pipeta graduada 10mL	3	
Piseta 250mL	1	
Pipeta graduada 2mL	6	
Pipeta graduada 1 mL	2	
Pipetas Pasteur	2	
Tubo de ensaye 25 x 150mm	6	
Tubo de ensaye 16 x 150mm	18	
Gradilla p/tubo de ensaye 25 x 150mm	1	
Varilla de vidrio	1	
Espátula chica	1	
Propipeta	1	
Matraz Erlenmeyer 125mL	1	
Matraz Erlenmeyer 50mL	1	
Pinza p/tubo de ensaye	1	

**FIRMA DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>  <b>Nombre y firma</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>  <b>Nombre y firma</b>
<b>ADEUDO</b>	
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>	