



Manuales de Laboratorio de Bioquímica General
Facultad de Ciencias Agrícolas
Subdirección Académica
Departamento de Infraestructura Académica

Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias Agrícolas

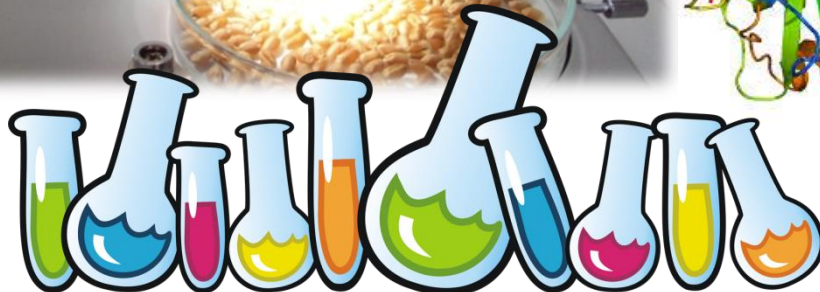
Campus “El Cerrillo”

Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

MANUAL DE LABORATORIO PARA

BIOQUÍMICA GENERAL DEL INGENIERO

AGRÓNOMO FITOTECNISTA



Elaborado por:

Dra. Dora Luz Pinzón Martínez
Dra. María Dolores Mariezcurrena Berasain
Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez



Directorio

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Dr. en D. Jorge Olvera García
RECTOR

Dr. Alfredo Barrera Baca
SRIO. DE DOCENCIA

Dra. Ángeles Ma. Del Rosario Pérez Bernal
SRIO. DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS

Mtro. José Benjamín Bernal Suárez
SRIO. DE RECTORÍA

Mtra. Ivett Tinoco García
SRIA. DE DIFUSIÓN CULTURAL

Mtro. Ricardo Joya Cepeda
SRIA. DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

Mtro. Javier González Martínez
SRIO. DE ADMINISTRACIÓN

Dr. Manuel Hernández Luna
SRIO. DE PLANEACIÓN Y DESARROLLO INSTITUCIONAL



Manuales de Laboratorio de Bioquímica General

Facultad de Ciencias Agrícolas

Subdirección Académica

Departamento de Infraestructura Académica

Mtra. Yolanda Ballesteros Senties
SRIA. DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL

Dr. en D. Hiram Raúl Piña Libien
ABOGADO GENERAL

Lic. Juan Portilla Estrada
DIRECTOR GENERAL DE COMUNICACIÓN UNIVERSITARIA

Lic. Jorge Bernáldez García
SRIO. TÉCNICO DE RECTORÍA

Mtro. Emilio Tovar Pérez
DIRECTOR GENERAL DE CENTROS UNIVERSITARIOS Y UNIDADES
ACADÉMICAS PROFESIONALES



DIRECTORIO

Dr. en C. Edgar Jesús Morales Rosales

DIRECTOR

M. Marco Antonio Bautista Rodríguez

SUBDIRECTOR ADMINISTRATIVO

Dr. en C. Omar Franco Mora

SUBDIRECTOR ACADÉMICO

Dra. Martha Lidya Salgado Siclán

COORDINADOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS EN FITOMEJORAMIENTO

Dra. Luz Raquel Bernal Martínez

COORDINADORA DE ESTUDIOS AVANZADOS

Ing. José Enrique Jaimes Arriaga

COORDINACIÓN DE PLANEACIÓN Y DESARROLLO
INSTITUCIONAL

M. en C. Gustavo Salgado Benítez

COORDINADOR DE DIFUSIÓN CULTURAL



Dr. Gaspar Estrada Campuzano

COORDINADOR DE APOYO ACADÉMICO Y PRODUCCIÓN

Ing. Francisco Javier Sandoval Figueroa

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE EXTENSIÓN

Dra. Amalia Pérez Hernández

COORDINADOR DE LA LICENCIATURA DE INGENIERO
AGRÓNOMO FITOTECNISTA

M. en A. Antonio Díaz López

COORDINADOR DE LA LICENCIATURA DE INGENIERO
AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

Dr. Aurelio Domínguez López

COORDINADOR DE LA LICENCIATURA DE INGENIERO
AGRÓNOMO INDUSTRIAL

M. en DAES. José Luis Martínez Benítez

JEFE DE CONTROL ESCOLAR

Dr. José Luis Piña Escutia

COORDINADOR DE TUTORÍA ACADÉMICA

Dr. Jesús Sánchez Pale

DEPTO. DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



ÍNDICE	PAG.
DIRECTORIO UAEM.....	2
DIRECTORIO FAC. DE CIENCIAS AGRÍCOLAS	4
<i>Sección 1. Introducción al Manual de Laboratorio para Bioquímica General del IAF</i>	
Estructura de la Unidad de Aprendizaje de Bioquímica General	7
Desarrollo de la Unidad de Aprendizaje.....	7
Introducción al laboratorio de Bioquímica General	10
Reglamento de Laboratorio de Bioquímica General	12
Medidas de seguridad en el Laboratorio de Bioquímica General.....	13
Reporte y Manual de Laboratorio	14
Utilización de reactivos	14
<i>Sección 2. Reporte y Manual de Laboratorio para Bioquímica General del IAF</i>	
Reporte de Laboratorio	16
Manual de Laboratorio.....	18
<i>Sección 3. Prácticas del Manual de Laboratorio para Bioquímica General del IAF</i>	
Práctica 1. Preparación de soluciones Buffer y medición de pH.....	20
Práctica 2. Reacciones características de los aminoácidos	24
Práctica 3. Cromatografía en papel para separación de aminoácidos.....	29
Práctica 4. Propiedades Ácido-Base de los aminoácidos	33
Práctica 5. Propiedades de las proteínas: solubilidad y desnaturalización ..	37
Práctica 6. Desnaturalización de enzimas por calor y pH.....	40
Práctica 7. Carbohidratos: Azúcares reductores	44
Práctica 8. Actividad de la amilasa sobre el almidón	47
Práctica 9. Identificación de Ácidos grasos Insaturados.....	51
Práctica 10. Metabolismo Vegetal: Fotosíntesis.....	54
Práctica 11. Determinación de los componentes celulares en Hojas de espinaca.....	62
Práctica 12. Extracción de DNA vegetal a partir de diversas plantas.....	67
<i>Anexo I.....</i>	<i>71</i>
<i>Referencias</i>	<i>73</i>



Sección 1

Introducción al Manual de Laboratorio para Bioquímica General del Ingeniero Agrónomo Fitotecnista



Introducción y Dinámicas de trabajo



ESTRUCTURA DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE

BIOQUÍMICA GENERAL DEL INGENIERO AGRÓNOMO

FITOTECNISTA

UNIDADES DE COMPETENCIA

Unidad de competencia I: Principios Básicos de Bioquímica y Agua.

Unidad de competencia II: Distingue, describe y comenta las propiedades y función de los carbohidratos, lípidos, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas y enzimas.

Unidad de competencia III: Estructura y función de los nucleótidos transmisores de la información genética.

Unidad de competencia IV: Rutas metabólicas de los procesos vitales de plantas y animales (Catabolismo y Anabolismo).

DESARROLLO DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE

UNIDADES DE COMPETENCIA

I. PRINCIPIOS BÁSICOS DE BIOQUÍMICA Y AGUA.

Se adquirirán los conocimientos de las propiedades del agua, Propiedades del agua, pH y la distribución del agua en los sistemas biológicos. Para ser realizar búsquedas, análisis y síntesis de la información, incluyendo la expresión oral. Para lo cual tendrá el dominio de tales conceptos básicos, sus aplicaciones e importancia en la agronomía, propiedades físicas y químicas del agua y la utilización de las soluciones amortiguadoras. Desarrollará el uso del material de laboratorio como potenciómetro y microscopio para el análisis y observación.



II. PROPIEDADES Y FUNCIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS, VITAMINAS, AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS, PROTEÍNAS Y ENZIMAS.

El alumno analizará la estructura, propiedades y función de las biomoléculas: Carbohidratos, lípidos, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas y enzimas. Mediante la descripción de sus características químicas y fisiológicas. Logrando así, distinguir, describir y comentar las propiedades y función de los carbohidratos, lípidos, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas y enzimas.

III. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS TRANSMISORES DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA.

El alumno logrará comprender la estructura y función de los nucleótidos transmisores de la información genética y describir los nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos (ADN y ARN).

IV. RUTAS METABÓLICAS DE LOS PROCESOS VITALES DE PLANTAS Y ANIMALES (CATABOLISMO Y ANABOLISMO).

El alumno conocerá las rutas metabólicas, tanto las catabólicas como las anabólicas de los organismos. Para lo cual relacionará las biomoléculas con las rutas metabólicas y su faceta estructural y energética, clasificará los alimentos por su nivel energético y su efecto en el organismo. Que le permitirá asumir una postura crítica en la aplicación de la importancia de las biomoléculas y participar consciente respecto de la nutrición.



INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA GENERAL DEL INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

El laboratorio de Bioquímica General tiene por objeto reforzar el aprendizaje en aula de dicha UA, mediante la realización de prácticas de laboratorio que permitan repasar los conceptos químicos que se llevan a cabo en y por los organismos vivos. Lo cual, participa en la formación medular del Ingeniero Agrónomo Industrial ya que proporciona las bases y se relaciona con Ciencias Agrícolas, Biológicas y Químicas. El estudiante de Ciencias Agrícolas conocerá las propiedades y estructuras de las principales macromoléculas como Glúcidos, Proteínas, Lípidos, Vitaminas y Enzimas, así como el poder diferenciarlas entre sí. Igualmente conocerá la importancia de tales Macromoléculas en los seres vivos, para proporcionar las bases que le permitirán el adecuado manejo y transformación de los Recursos Naturales, ya sean vegetales o animales. El presente manual contempla prácticas de laboratorio que aluden a los temas enlistados dentro de las unidades de aprendizaje de Bioquímica General (Tabla 1) con la finalidad de reforzar los conocimientos adquiridos en aula con demostraciones prácticas. Por lo tanto, cada práctica contiene información introductoria al tema a reforzar, metodologías y temas complementarios que ayudarán al estudiante a revisar los puntos teóricos.



Tabla 1. Relación de prácticas del Manual de laboratorio para Bioquímica General del Ingeniero Agrónomo Fitotecnista con las Unidades de aprendizaje

Unidades de Aprendizaje	Nombre de la práctica
Unidad de competencia I: Principios Básicos de Bioquímica y Agua.	<ul style="list-style-type: none">• Preparación de soluciones Buffer y medición de pH
Unidad de competencia II: Distingue, describe y comenta las propiedades y función de los carbohidratos, lípidos, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas y enzimas.	<ul style="list-style-type: none">• Reacciones características de los aminoácidos.• Cromatografía en papel para separación de aminoácidos.• Propiedades Ácido-Base de los aminoácidos• Propiedades de las proteínas: solubilidad y desnaturalización.• Desnaturalización de enzimas por calor y pH.• Carbohidratos: Azúcares reductores• Actividad de la Amilasa sobre el Almidón• Identificación de Ácidos grasos Insaturados
Unidad de competencia III: Estructura y función de los nucleótidos transmisores de la información genética.	<ul style="list-style-type: none">• Determinación de los Componentes Celulares en Hojas de espinaca• Extracción de DNA vegetal a partir de diversas plantas.
Unidad de competencia IV: Rutas metabólicas (Catabolismo y Anabolismo).	<ul style="list-style-type: none">• Metabolismo Vegetal: Fotosíntesis



Reglamento del Laboratorio de Bioquímica General

1. Uso de bata blanca de manga larga.
2. El laboratorio dará inicio puntualmente, con 10 min de tolerancia sin excepción de personas.
3. El catedrático proporcionará el presente manual con todas las posibles prácticas a realizarse al alumno previo a su visita al laboratorio, el cual contendrá:
 - a. Nombre de la práctica
 - b. Introducción
 - c. Objetivos
 - d. Material y Métodos
 - e. Cuestionario
4. Cada alumno debe asistir con su manual de prácticas impreso o copia de la práctica a realizar para poder iniciar su trabajo de laboratorio.
5. Los implementos (ejemplo material vegetativo) que se hayan solicitado al alumnado debe estar completo para el inicio de la práctica.
6. Los alumnos realizarán sus prácticas en equipos.
7. Equipo sin material completo y debidamente preparado para su práctica no puede permanecer en el laboratorio.
8. Es estrictamente prohibido jugar, correr o no mostrar una conducta adecuada durante su estancia en el laboratorio.
9. Cada práctica genera un reporte de laboratorio.
10. Alumno que muestre constantemente una conducta inadecuada o desorden para trabajar será retirado del área de trabajo.
11. Siempre que se trabaje dentro del Laboratorio de Bioquímica General se debe limpiar la mesa antes y después de la práctica.
12. Lavar el área de trabajo antes y después con jabonadura reciente.



Medidas de seguridad en el Laboratorio de Bioquímica General

1. Antes de iniciar la práctica haber leído totalmente la metodología a seguir.
2. Prohibido introducir y consumir alimentos y bebidas.
3. Estrictamente prohibido pipetear con la boca.
4. Los ácidos o alcalis fuertes a utilizar deben pipetearse dentro de la campana de extracción de gases.
5. No trabajar con calzado descubierto.
6. Para calentar tubos a la llama (si fuera necesario) deben tomarse con pinzas y dirigiendo la boca del tubo dónde no se encuentren personas.
7. Prohibido trabajar sentados en los bancos.
8. Antes de iniciar a trabajar rotular reactivos y equipo de cristal a utilizarse.
9. Si se preparan soluciones deben rotularse con: nombre, concentración, volumen y fecha de elaboración.
10. Antes de desechar reactivos, soluciones, ácidos o alcalis dirigirse al catedrático/encargado de laboratorio para su correcto desecho en los contenedores asignados.
11. Preparar los reactivos de acuerdo a las cantidades necesarias durante el desarrollo de la práctica evitando desperdiciar reactivos.
12. Si se trabaja con sustancias tóxicas o corrosivas comunicarlo a los compañeros a su alrededor.
13. Colocar las chamarras y mochilas o artículos semejantes, en los lugares indicados por el encargado de laboratorio y con la precaución de no dejarlas al paso de los usuarios.
14. Al término de la práctica regresar el material limpio y en buen estado al responsable de laboratorio.
15. El cabello debe ir levantado sin mechones en el rostro.
16. No trabajar con pulseras (estambre o similar), ni alhajas.



17. Verter los residuos líquidos en las pilas del fregadero y los sólidos se depositaran en los recipientes dispuestos para tal fin. Bajo la indicación del encargado de laboratorio en turno.
18. Si se produce algún accidente, avisar rápidamente al profesor.

REPORTES Y MANUAL DE LABORATORIO PARA BIOQUÍMICA GENERAL DEL IAF

La calificación del Laboratorio se genera a partir de los reportes de las prácticas realizadas. Los reportes deberán entregarse en tiempo y forma a los 8 días de realización de la práctica. El Cuerpo del reporte deberá contener los aspectos que se mencionan en la sección 2. Cada reporte será calificado por el catedrático y devuelto al equipo. El alumno o equipo de laboratorio deben conservar los archivos digitales, así como los impresos ya calificados, ya que se entregarán al final del curso. El total de prácticas de laboratorio reportadas generarán un Manual de Laboratorio, el cual debe ser entregado únicamente en la fecha y hora indicada por el catedrático al inicio de la UA. La calificación del laboratorio comprenderá el promedio de los reportes de las prácticas más la calificación del Manual. Las reglamentaciones para la redacción del manuscrito se describen igualmente en la sección 2.

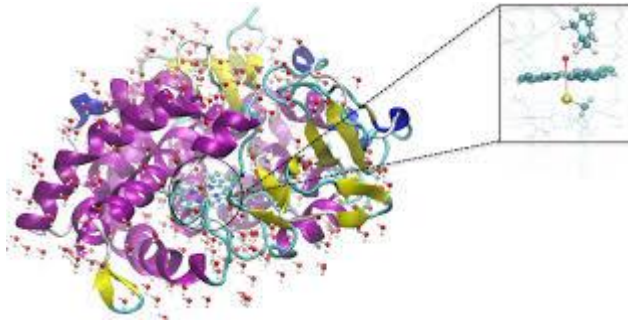
UTILIZACIÓN DE REACTIVOS

1. Rotular todo reactivo preparado con el nombre del reactivo, la persona que lo preparó, grupo y fecha de preparación.
2. No arrojar por los sumideros ácidos, bases o algún otro reactivo, por favor deposítelos en los recipientes de desecho.
3. Evitar derrames de sustancias en las mesas de trabajo, así se previene que algún compañero se queme la piel o se deteriore la ropa.
4. No arrojar al piso ningún reactivo.
5. No arrojar al piso papeles u otros elementos. Favor de utilizar el recipiente para la basura.



Sección 2

Reportes de Prácticas y Manual de laboratorio para Bioquímica General del Ingeniero Agrónomo Fitotecnista





REPORTE DE LABORATORIO

Se sugiere que el equipo de laboratorio no pierda los archivos digitales de sus reportes, así como conservar las prácticas revisadas por el Titular de la UA, ya que deben presentarlos nuevamente al final del curso. Los reportes de laboratorio deben contener:

1. **Hoja de presentación**, debe incluir: Entidad académica, Campus, Nombre de la UA, fecha de realización de la práctica, nombre de la práctica, nombres completos de los integrantes del equipo.
2. **Introducción.**
3. **Marco teórico.** Debe ser redactado con un mínimo de una cuartilla, máximo dos. Comprende un resumen de la investigación por parte del alumno de la parte teórica de la práctica en libros de la UA y en medios electrónicos. Se pondera en base a la capacidad de síntesis.
4. **Objetivos.**
5. **Material.**
6. **Metodología.** Revisar si hubo sufrido cambios durante el desarrollo de la práctica, tales como cambio de reactivos, tiempos de incubación, entre otros.
7. **Observaciones.** Comprende aquellos cambios ocurridos al seguir la metodología indicada, tales como desprendimiento de calor (reacciones exotérmicas), modificaciones de coloraciones, entre otras. *A partir de este apartado la redacción debe ser en tercera persona del singular en pasado.* Si se incluyen figuras o tablas, éstas deben contener:
 - a. Pie de figuras o tablas, descripción breve de la figura o de los datos de la tabla.
 - b. Deberán estar enumeradas, incluirán su número en los pies de figuras o tablas, siguiendo el siguiente formato: **Figura 1.** Siembra de coliformes....
 - c. Deberán estar citados en el texto para su oportuna alusión.
 - d. Deberán contener datos relevantes al resultado o desarrollo de la práctica.
8. **Resultados.** Enlista los productos obtenidos de seguir la metodología indicada.
9. **Conclusiones.** Redactadas en función de los objetivos de la práctica.



10. **Discusión.** Corresponde a la parte más importante del reporte, ya que pondera el 60 % de su calificación. Este apartado incluye la presunta explicación de los resultados, se genera al consultar la teoría (Marco Teórico) y comparar los resultados con la bibliografía. Puede incluir la relación de las complicaciones presentadas en la práctica sobre los resultados. Todo resultado (bueno o malo) debe ser discutido. No es un resumen de resultados.
11. **Cuestionario.** Correctamente contestado.
12. **Referencias.** Redactarlas alfabéticamente y considerar los formatos para:
- Artículos de revistas científicas.** Autores, año, nombre del artículo consultado, nombre de la revista y páginas. Ejemplo:
Phillips, J. M. (2003). Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. *Journal of Animal Science*, 81, 856–864.
 - Capítulos de Libro.** Ejemplo:
Lehninger, A. (1995). *Bioquímica*. 2da. Ed., Ediciones Omega, S:A., Barcelona: 475-476.
 - Sitios de internet o material de internet.** Año. Título de la página web o base de datos. Edición. URL. Fecha de consulta año mes día. Ejemplo:
Centers of disease Control. <http://www.cdc.gov/spanish/>. Acceso: 08 Septiembre 2013.



MANUAL DE LABORATORIO

El manuscrito del Manual de laboratorio deberá contener:

1. **Hoja de presentación.** Debe incluir: Entidad académica, Campus, Nombre de la UA, fecha de entrega, Manual de Laboratorio de Bioquímica General, Semestre (ej. 2014B), nombre completo de los integrantes del equipo.
2. **Índice.** Las prácticas se enlistarán en el orden cronológico de su realización.
3. **Cuerpo del Manual.** Las prácticas serán presentadas en el orden marcado en el índice y con las correcciones indicadas por el catedrático durante su revisión. La corrección de un apartado debe redactarse en una hoja aparte que deberá de ir detrás de su versión ya calificada y no en otra parte del Manual.

El Manual debe ir engargolado.

La calificación del presente corresponde a las debidas correcciones indicadas por el profesor al haber revisado previamente los reportes. Únicamente pueden ser reportadas las prácticas realizadas, de modo que si un alumno no asiste a la realización de una práctica no puede reportarla y la calificación asignada sería de cero. Si no se reportó una práctica ésta puede anexarse a la hora de entrega del Manual, considerando la correcta redacción de la misma.

La calificación tanto de los reportes como del manual también considera:

- Capacidad de síntesis
- Ortografía
- Análisis (en la redacción de la discusión)
- Limpieza
- Presentación



Manuales de Laboratorio de Bioquímica General

Facultad de Ciencias Agrícolas

Subdirección Académica

Departamento de Infraestructura Académica

Sección 3

Prácticas del Manual de Laboratorio para Bioquímica General del Ingeniero Agrónomo Fitotecnista





PRÁCTICA No. 1

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES BUFFER Y MEDICIÓN DE PH

INTRODUCCIÓN

Las soluciones amortiguadoras, también conocidas como disoluciones buffer o tampón, son soluciones que están compuestas del ión común de ácido débil o una base débil. El mismo ión común en una sal conjugada, debe estar presente junto con el ión común del ácido o base débil. También se dice que una solución es amortiguadora, reguladora o tampón si la concentración de H^+ , es decir el pH de una solución no se ve afectada significativamente por la adición de pequeñas cantidades o volúmenes de ácidos y bases. Siendo que pH no significa otra cosa que el potencial de hidrogeniones, un buffer (o amortiguador) lo que hace es regular el pH. Cuando un buffer es añadido al agua, el primer cambio que se produce es que el pH de agua se vuelve constante. De esta manera, ácidos o bases (álcalis = bases) adicionales no podrán tener efecto alguno sobre el agua, ya que ésta siempre se estabilizará de inmediato.

OBJETIVOS

1. Comprobar la presencia de sistemas amortiguadores en líquidos biológicos.
2. Aprender a preparar soluciones amortiguadoras útiles en la biología y bioquímica. Calcular el pH y conocer los factores que influyen en él.

MATERIALES

- 100 ml Leche de vaca (lo trae el alumno)
- 100 ml Jugos diferentes (lo trae el alumno)
- 100 ml refresco diferentes (lo trae el alumno)
- 2 Perilla
- 5 Vasos de precipitado de 50 ml

REACTIVOS

- 8 ml 0.1 N Ácido clorhídrico
- 8 ml 0.1 N NaOH
- 80 ml agua destilada
- 1 Potenciómetro



METODOLOGÍA

Uso del potenciómetro

1. Para el uso del potenciómetro primero debe calibrarse con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10.
2. Antes de realizar la primera calibración retirar el electrodo de su contenedor, enjuagar el electrodo con abundante agua destilada y secarlo con papel higiénico con pequeños golpecitos sin maltratar o golpear el electrodo porque puede romperse o descalibrarse.
3. Después de cada lectura o muestra el electrodo debe enjuagarse y ser secado.
4. Al finalizar las lecturas el electrodo limpio y seco debe introducirse de nuevo al recipiente inicial.
5. El agua de enjuague debe ser recolectada en un vaso de precipitado.

Jugo

1. Determinar el pH de varias muestra de jugo con el potenciómetro-
2. Anotar en el cuadro el valor obtenido

Leche de vaca

1. Determinar el pH de una muestra de leche de vaca
2. Colocar en un vaso de precipitados 2 ml de leche y adicionar 30 ml de agua destilada
3. Determinar el pH de esta dilución
4. Anotar en el cuadro el valor obtenido

Refresco

1. Determinar el pH de diferentes refrescos con el potenciómetro
2. Anotar en el cuadro el valor obtenido



HCl

1. Determinar el pH de una solución de 0.1N HCl.
2. Colocar en un vaso de precipitados 2 ml 0.1N HCl y adicionar 38 ml de agua destilada.
3. Determinar el pH de esta dilución.
4. Anotar en el cuadro el valor obtenido

NaOH

1. Determinar el pH de una solución de 0.1N HCl
2. Colocar en un vaso de precipitados 2 ml 0.1 N NaOH y adicionar 38 ml de agua destilada
3. Determinar el pH de esta dilución
4. Anotar en el cuadro el valor obtenido

RESULTADOS

Registro de los resultados obtenidos

Muestra	pH determinado

OBSERVACIONES



DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

- Conn, E. E., Stumpf, P. K., George, B. and Doi, R. H. 2002. Bioquímica Fundamental, 4^a Edición. Wiley.
- Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W. 2007. Bioquímica ilustrada. 17^a Edición. Manual Moderno.
- Voet, D. and Voet, J. G. 2004. Biochemistry. 3^a Edición. Wiley.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Indicar los cálculos necesarios para la elaboración de las soluciones utilizadas y especifique el peso molecular, temperatura de ebullición, temperatura de fusión, solubilidad de los reactivos utilizados y precauciones en el manejo.
3. Indicar las propiedades fisicoquímicas del agua.
4. ¿Qué es un ácido-base?
5. ¿Qué es una solución buffer o amortiguadora?
6. ¿Cuál es la diferencia entre mol, molar, molal, normalidad, densidad y porcentaje en términos químicos?



PRÁCTICA No. 2

REACCIONES CARACTERÍSTICAS DE LOS AMINOÁCIDOS

INTRODUCCIÓN

Las proteínas, están construidas a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos, unidos de forma covalente en secuencias lineales características. Debido a que cada uno de estos aminoácidos tiene una cadena lateral propia que determina sus propiedades químicas, se puede considerar a este grupo de 20 moléculas precursoras como el alfabeto en el que está inscrito el lenguaje de la estructura proteica.

Los aminoácidos están constituidos por un grupo $-\text{COO}^-$, un grupo $-\text{NH}_3^+$, hidrógeno y una cadena lateral representada como R, todas unidas a su carbono α . Estos presentan las reacciones características de sus grupos carboxilo, alfa-amino y R; van a ser las reacciones típicas de los grupos R las que permitirán diferenciar entre los aminoácidos.

No todos los aminoácidos presentan reacciones típicas, algunas de estas son:

- Reacciones de la Ninhidrina: Positiva para todas las aminas primarias.
- Reacción de Millon: Coloración roja por presencia de tirosina.
- Reacción de Satin: Específica para Prolina e Hidroxiprolina.
- Reacción de Sakaguchi: Detecta la presencia de Arginina.
- Reacción de Pauli: Detecta la presencia de Histidina y Tirosina.
- Reacción de Xantoproteica: Color amarillo con la Fenilalanina, Tirosina y Triptófano.
- Reacción de Hopkins-Cole: Específica para Triptófano.
- Reacción de Vanilina: Para identificar Triptófano.

OBJETIVOS

1. Comprender las propiedades químicas de los aminoácidos como medio para su identificación.
2. Identificar los presuntos aminoácidos presentes en las muestras analizadas.



MATERIALES

- 20 Tubos de ensaye
- 5 Pipetas graduadas
- 1 Mechero
- 1 Pinzas para tubo
- 1 Gradilla

REACTIVOS

- 75 ml de aminoácidos al 5 %
- 50 ml de NaOH al 40 %
- 50 ml de HNO₃ concentrado
- 10 ml de NH₄OH concentrado
- 10 g de Acetato de plomo concentrado
- 5 g de Ácido glioxílico
- 50 ml de Ácido acético glacial
- 20 ml de Ninhidrina al 0.1 %
- 30 g de Óxido rojo de mercurio
- 25 ml de Nitrato de sodio al 30 %

METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE REACTIVOS ESPECIALES

1. Reactivo de Millon: cuidadosamente agregar 30 g de óxido rojo de mercurio a una mezcla de 22.5 ml de HNO₃ concentrado y 25 ml de agua. Ya que se haya disuelto el óxido, se le añaden 25 ml de una solución de nitrato de sodio al 30%.
2. Reactivo de Hopkins-Cole: disolver 5 g de ácido glioxílico en ácido acético glacial, aforando a 50 ml.

Reacción Xantoproteica:

1. Tomar 3 ml de cada solución problema.
2. Agregar 1 ml de HNO₃ concentrado y calentar cuidadosamente (en la campana de extracción).
3. Observar si hubo algún cambio en color.
4. Enfriar bien y esterificar cuidadosamente con unas gotas de NH₄OH concentrado. Observar si se forma un color anaranjado en la interfase.



Reacción de Millon:

1. Tomar 2 ml de cada una de las soluciones problema.
2. Agregar de 2 a 5 gotas del reactivo de Millon.
3. Calentar en baño de agua.
4. Observar la formación de un color rojo indica que es positiva la prueba.

Nota:

El reactivo de Millon es muy venenoso y corrosivo, extremar cuidados con este reactivo.

Prueba para el Azufre:

1. Tomar 3 ml de cada solución problema.
2. Agregar 2 ml de NaOH al 40% y caliente suavemente.
3. Añadir de 3 a 5 gotas de acetato de plomo saturado.
4. Calentar nuevamente.
5. Observar si hay formación de precipitado negro de PbS.

Reacción de Ninhidrina:

1. Tomar 3 ml de las soluciones problema.
2. Adicionar 0.5 ml de la solución de Ninhidrina al 0.1 %.
3. Calentar la mezcla en baño de agua por 10 min. La Ninhidrina reacciona con todos los aminoácidos alfa cuyo pH se encuentra entre 4 y 8, dando una coloración que varía de azul a violeta intenso.

Reacción de Hopkins-Cole:

1. Tomar 2 ml de cada solución problema.
2. Agregar 5 gotas de reactivo de Hopkins-Cole (solución de ácido glioxílico) y mezclar bien.
3. Esterificar cuidadosamente con ácido sulfúrico concentrado, procurando que se forme una interfase entre ambos líquidos. La formación de un anillo violeta o rojizo indica la presencia de Triptófano.



RESULTADOS

Completar el siguiente cuadro con la información deseada.

- En la casilla de No. Muestra, coloque el número de cada tubo de las muestras problemas que se le entregaron.
- Usar los signos (+) o (-), para reportar la positividad o negatividad de la reacción.
- Sobre la base de los resultados de sus pruebas, se debe identificar la muestra problema y escribir la composición más resaltante en las casillas correspondientes.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Xantoproteína								
Millon								
Azufre								
Ninhidrina								
Hopkins-Cole								
Nombre de la muestra problema								
Composición de la sustancia identificada								

OBSERVACIONES

DISCUSIÓN



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Ganong, W. F. (2006). Fisiología médica. 20 Ed. Manual Moderno.
2. Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2006). Tratado de fisiología médica. 11 Ed. Elsevier.
3. Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W. (2007). Bioquímica ilustrada. 17 Ed. Manual Moderno.
4. Voet, D. and Voet, J. G. (2004). Biochemistry. 3 Ed. Wiley.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Clasificar de acuerdo a la estructura química de la cadena lateral, a cada uno de los aminoácidos utilizados en la práctica.
3. Describir las propiedades químicas de la familia a la que pertenece cada uno de los aminoácidos utilizados.
4. Relacionar las propiedades químicas de la familia a la que pertenece cada uno de los aminoácidos con las reacciones de identificación.
5. Dar una posible explicación de cómo es que reacciona cada aminoácido con la prueba que lo identifica.
6. Utilizar libros de química orgánica y relacionados a la identificación de compuestos orgánicos.
7. Reacciones de identificación de aminoácidos.



PRACTICA No. 3

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL PARA SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS

INTRODUCCION

En 1903 el botánico ruso M. T. Sweet elaboró la primera técnica para separar distintos componentes coloreados de un extracto vegetal. A esta técnica se la ha dado el nombre de cromatografía debido a que la separación de las sustancias dan diferentes colores. Existen diferentes tipos de cromatografía. La cromatografía en papel es una forma sencilla que ha llegado a ser un instrumento analítico extraordinariamente valioso para el químico orgánico y para el bioquímico. En esta técnica se emplea papel filtro, una gota de solución que contiene la muestra y que se coloca en cierto punto sobre el papel de donde hay una migración como resultado de flujo por una fase móvil. El movimiento de la fase móvil es causado por fuerzas capilares. La gravedad también contribuye al movimiento. La cromatografía en papel es un tipo de cromatografía por partición en el que la fase estacionaria es agua absorbida sobre la superficie hidrofílica del papel. Un disolvente orgánico actúa como fase móvil. Por tratamiento apropiado del papel, el agua puede ser sustituida por una fase líquida estacionaria no polar; pueden usarse soluciones acuosas como reveladores. En otra variación, el papel es impregnado con sílice anhidra o una resina de intercambio de iones. La trayectoria de una muestra se puede describir en función de su factor de retardo o relación al frente que se define como:

Factor de retardo = $R_f = (a) \text{ distancia del movimiento del compuesto} / (b) \text{ distancia del movimiento del solvente}$

Para compensar las variables intercontroladas, la distancia recorrida por un soluto se compara frecuentemente con la de una sustancia estándar en idénticas condiciones. La cromatografía presta valiosa ayuda en el análisis de sustancias complejas como proteínas, tierras raras, etc.



OBJETIVO:

1. Separar una mezcla de compuestos químicamente semejantes para su identificación.

MATERIAL

- 2 Tiras de papel filtro
- 2 Frascos con disolvente y tapa
- 1 Parrilla de calentamiento

REACTIVOS

- Ninhidrina
- Solución disolvente (butano:ácido acético:
- Agua, 4:1:1)
- Aminoácidos: leucina y ácido aspártico

PROCEDIMIENTO

1. En un extremo del papel filtro, hacer dos pequeñas marcas con lápiz a un extremo del borde y separarlas entre sí una distancia de un centímetro.
2. Poner una gota en una de las marcas señaladas del aminoácido No. 1.
3. Repetir la operación con una gota del aminoácido No. 2.
4. En otro papel colocar una gota de una mezcla de los aminoácidos.
5. Introducir las tiras de papel filtro en un frasco o vaso que contenga la mezcla del solvente (utilice un frasco para cada tira).
6. Dejar avanzar el frente del solvente hasta aproximadamente 1 cm antes de que llegue al borde superior.
7. Una vez seco el papel, rociar con solución de ninhidrina (revelador específico) para aminoácido.
8. Dejar secar nuevamente.
9. Calentar las hojas de papel filtro en una parrilla eléctrica (tener cuidado de no quemarlas) hasta la aparición de manchas coloreadas. Ellas representan el sitio donde se encuentran los aminoácidos que reaccionaron con la ninhidrina.



RESULTADOS

OBSERVACIONES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Lehninger, A. (1995). Bioquímica. 2da. Ed., Ediciones Omega, S:A., Barcelona:428,453-456, 475-476.
2. Wilson, K., and Walker, J. (2000). Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.



3. Robert, JF., and White B.J. (1990). Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Analizar los temas: Cromatografía.
2. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
3. Medir la distancia desde el punto de colocación de la solución de los aminoácidos al centro de las manchas (a).
4. Medir la distancia del sitio de colocación de los aminoácidos al sitio donde llegó el solvente (b) (Figura 1).
5. Calcular el Rf para cada aminoácido, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$R_f = a / b.$$

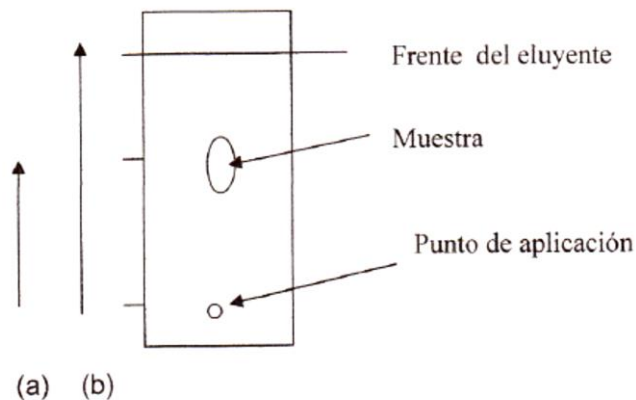


Figura 1. Esquema para identificar la distancia del sitio de colocación de la muestra al sitio donde llega el disolvente.

6. El Rf se calculará para cada uno de los aminoácidos individuales y para la mezcla.
7. Identificar cada aminoácido.
8. ¿Cuál corrió más y por qué?, Hacer una discusión tipo artículo científico sobre ello.



PRACTICA No. 4

PROPIEDADES ÁCIDO-BASE DE LOS AMINOÁCIDOS

INTRODUCCIÓN

Todos los aminoácidos son anfóteros los cuales contienen al menos un grupo funcional ácido (carboxilo) y uno básico (α -amino). Algunos aminoácidos contienen otros grupos que se ionizan fácilmente: grupos amino, carboxilo, hidroxifenilo, sulfhidrilo, guanidino e imidazol. El carácter iónico de los polipéptidos y las proteínas es en gran parte debido a estos grupos adicionales ionizables debido a que los grupo α -amino y carboxilo de los aminoácidos participan en los enlaces peptídicos. En esta práctica se estudia la reacción de aminoácidos cuando se adiciona un ácido o una base y se observa el cambio de pH. Además, después de cada adición de ácido o base durante una titulación, los resultados se pueden predecir por el uso de la ecuación general de Henderson-Hasselbalch.

OBJETIVOS

1. Utilizar los métodos volumétricos y potenciométricos para demostrar las propiedades ácido-base de los aminoácidos.
2. Deducirá la importancia de dichas propiedades.

MATERIAL

- 1 Potenciómetro con electrodo de vidrio
- 2 Buretas de 50 ml
- 1 Soporte universal
- 1 Pinza para bureta

- 1 Agitador magnético
- 2 Barras magnéticas
- 8 Vasos de precipitado de 100 ml

REACTIVOS

- 400 g de diferentes aminoácidos
- 500 ml HCl 1 N
- 500 ml NaOH 1 N
- 10 ml Fenolftaleína 0.5 % (p/v)
- 1 Embudo



- 3 Pipetas volumétricas 20 ml y 10 ml

METODOLOGÍA

Titulación de aminoácidos desconocidos

1. Pesar cerca de 400 mg de muestra.
2. Disolver en 20 ml de H₂O en un vaso de precipitado.
3. Introducir una barra magnética y colocarlo en una placa de agitación, así como el electrodo para medir pH.
4. Titular la muestra disuelta desconocida con HCl 1N, registrando las lecturas de la bureta y el pH a intervalos frecuentes hasta que la solución alcance un pH de 1.0.
Observe y registre la solubilidad de la muestra durante la titulación.
5. Titular otros 20 ml de agua (blanco) con HCl 1N, gota a gota en las primeras 10 gotas y de dos en dos gotas las siguientes 10 gotas.
6. Finalmente, agregar de cuatro en cuatro gotas hasta que la solución alcance pH de 1.0
7. Registrar el pH y el volumen del ácido después de cada adición.
8. Disolver otra muestra (otra vez aproximadamente 400 mg en 20 ml de agua) y titular la muestra con NaOH 1N de la misma manera que para la titulación con ácido hasta que el pH de la solución llegue a 12. *Observe y registre la solubilidad de la muestra durante la titulación.*
9. Titular a 20 ml de agua (blanco) con NaOH 1N hasta pH 12.0 de manera similar que el primer blanco.

RESULTADOS



OBSERVACIONES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Clark, J.M and R. L. Switzer. (1977). Experimental Biochemistry. W.H. Freeman and Company.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Hacer una tabla de resultados para cada titulación: Muestra con NaOH, Agua con NaOH, Muestra con HCl, Agua con HCl.
3. Dibujar la curva de titulación verdadera siguiendo el siguiente procedimiento: Para determinar la curva de titulación verdadera de cualquier sustancia, se debe medir cuánto ácido o base se consume al titular el solvente (agua) en cada pH y entonces restar esta cantidad de la cantidad total de ácido o base consumida para alcanzar ese pH.
4. Revisar Anexo I.



5. Usando la ecuación de Henderson –Hasselbalch, calcular el pKa de cada grupo ionizable titulado.
6. ¿Coincide con el pKa reportado en los libros?
7. ¿Cómo se podría confirmar la identidad del aminoácido?
8. Dibujar la curva que se esperaría en la titulación del ácido aspártico y la que se esperaría en la titulación de la lisina, señalando las especies predominantes en cada región.



PRÁCTICA No. 5

PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS: SOLUBILIDAD Y DESNATURALIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

La Solubilidad de la mayoría de las proteínas disminuye frente a elevadas concentraciones de sales. Este efecto, llamado desalado (“salting out”), resulta solubilidad respecto a la concentración salina difiere de una proteínas. Por ejemplo, a una concentración de sulfato 0.8 M, el fibrinógeno precipita, mientras que se requiere una concentración 2.4 M para precipitar la albúmina sérica. El precipitado por salado también resulta útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas. Por otro lado, la desnaturalización es la pérdida de la estructura de una proteína, con o sin pérdida de la actividad biológica, dependiendo a que nivel de estructura fue la desnaturalización. Para desnaturalizar una proteína existen varios métodos, tanto físicos como químicos. En los primeros encontramos el calor, el pH, bajas temperaturas. En los segundos podemos mencionar a los ácidos fuertes, urea, detergentes como el SDS (dodecil sulfato de sodio), β -mercaptoetanol, dithiothreitol, etc.

OBJETIVO

Observar la solubilidad y desnaturalización de las proteínas con varios agentes físicos y químicos.

MATERIAL

- 9 Tubos de ensayo
- 1 Mechero
- 1 Pinzas para tubo de ensayo
- 6 Vasos de precipitado
- 1 Rejilla de asbesto
- 1 Gradilla

REACTIVOS

- 5 ml H_2SO_4
- 5 ml HNO_3
- 5 ml NaOH
- 5 ml Cloruro de Mercurio
- Nitrato de Plata
- 5 ml Ácido Pírico
- 5 ml Ácido Tricloroacético



- 5 ml HCl

- 10 ml Albúmina

METODOLOGÍA

Desnaturalización de albumina con ácidos y bases fuertes

1. Preparar 3 ml de H_2SO_4 con un 1ml de Albúmina, igualmente hacerlo con los reactivos HNO_3 y el NaOH. (Ácidos fuertes y alcalinos).
2. Agitar los tubos.
3. Observar si se presenta solubilidad.

Desnaturalización de albumina con metales pesados

1. Preparar 1ml de Cloruro de Mercurio con 2 ml de Albúmina.
2. Repetir con Nitrato de Plata.
3. Agitar los tubos de Ensaye con los reactivos y ver si se solubilizan.

Desnaturalización de albumina con Ácido Pítrico y Tricloroacético

1. En tubos de Ensaye agregar 1 ml de ácido Pítrico con 2 ml de Albúmina.
2. Hacer lo mismo con el Ácido Tricloroacético.
3. Calentar a baño maría por 5 min.
4. Dejarlos enfriar por 5 min más.
5. Hacer observaciones.

Adición de limón y ácido clorhídrico a la leche.

1. Colocar en dos vasos de precipitado un poco de leche.
2. A uno adicionar unas gotas de limón y al otro unas cuantas gotas de HCl concentrado. Anota tus observaciones.

RESULTADOS



OBSERVACIONES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. Robert, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Mencionar tres métodos para precipitar proteínas.
3. ¿Cuándo una proteína se desnaturalizada, puede seguir actividad biológica?
4. ¿Por qué se forman grumos en la leche cuando adicionas el limón o el HCl?



PRÁCTICA No. 6

DESNATURALIZACIÓN DE ENZIMAS POR CALOR Y PH

INTRODUCCIÓN

Cada célula y cada tejido tienen su actividad propia, lo que provoca continuos cambios en su estado bioquímico, en la base de la cual están las enzimas, que tienen el poder de catalizar, facilitar y agilizar terminados procesos sintéticos y analíticos. La temperatura influye en la actividad de las enzimas. El punto óptimo es aquel que representa el máximo de actividad, a temperaturas bajas las enzimas se hallan “muy rígidas” y cuando se supera un valor considerable (mayor a 50°C) la actividad cae bruscamente porque, como proteína, la enzima se desnatura.

El pH puede afectar de varias maneras:

- El centro activo puede contener aminoácidos con grupos ionizados que pueden variar con el pH.
- La ionización de aminoácidos que no están en el centro activo pueden provocar modificaciones en la conformación de la enzima.
- El sustrato puede verse afectado por las variaciones del pH.

OBJETIVO

1. Demostrar como el calor y/o pH pueden influir en la estructura terciaria de una enzima.
2. Demostrar como el calor y/o pH pueden influir en la funcionalidad de una enzima.

MATERIAL

- 1 Trozo de hígado fresco (lo trae el estudiante)
- 2 Tubos de ensayo de 15 ml
- 1 Pinza para tubo de ensayo
- 1 Mechero

REACTIVO

- 15 ml Agua oxigenada al 5% (H₂O₂)
- 5 ml HCl 1M
- 5 ml NaOH 1M
- Agua destilada



- 1 Gradilla
- 2 Pipetas de 5 ml
- 1 Bisturí o navaja

METODOLOGÍA

Normal

1. Colocar en un tubo de ensaye unos trocitos de hígado.
2. Añadir 5 ml de agua oxigenada.
3. Anotar las observaciones.

Temperatura

1. Colocar en un tubo de ensayo unos trocitos de hígado.
2. Añadir 5 ml de agua destilada.
3. Hervir a muestra durante 5 min. Retirar el agua sobrante.
4. Añadir 5 ml de agua oxigenada.
5. Anotar observaciones.

pH

1. Colocar en un tubo de ensayo unos trocitos de hígado.
2. Añadir 5 ml de HCl 1M e incubar a temperatura ambiente la muestra durante 5 min (mezclándola).
3. Retirar el ácido sobrante (neutralizándolo con unos 5 ml de NaOH 1M).
4. Añadir 5 ml de agua oxigenada y anotar observaciones.



RESULTADOS

Normal	Temperatura	pH

OBSERVACIONES

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFÍA

1. Conn, E. E., Stumpf, P. K., George, B. and Doi, R. H. (2002). Bioquímica Fundamental, 4 Ed. Wiley.
2. Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W. (2007). Bioquímica ilustrada, 17 Ed. Manual Moderno.
3. Voet, D. and Voet, J. G. (2004). Biochemistry, 3 Ed. Wiley.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Identificar los cálculos necesarios para la elaboración de las soluciones utilizadas y especifique el peso molecular, temperatura de ebullición y solubilidad de los reactivos a utilizar.
3. Diferenciar entre la estructura 1^a, 2^a, 3^a y 4^a de las proteínas.
4. ¿Qué otros factores favorecen a la desnaturalización de proteínas?



PRÁCTICA No. 7

CARBOHIDRATOS: AZÚCARES REDUCTORES S

INTRODUCCIÓN

Los azúcares reductores son aquellos que presentan un carbono libre en su estructura y pueden educir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas. El ensayo de Fehling se funda en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), que forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor. Al reaccionar con monosacáridos, se torna verdoso; si lo hace con disacáridos, toma el color del ladrillo.

OBJETIVO

Familiarizarse con las propiedades químicas de los azúcares determinando los azúcares reductores por la reacción de Fehling.

MATERIAL

- Pipetas
- 1 Perilla de hule
- 10 Tubos de ensayo de 15 ml
- 1 Baño maría

REACTIVOS

10 ml Fehling I (0.93 g CuSO_4 en 100 ml de agua destilada)

10 ml Fehling II (36.4 g Na-K-tartrato + 12 g en 100 ml de agua destilada)

0.5 ml solución de glucosa (1 g/ 10 ml)

0.5 ml solución de fructosa (1 g/ 10 ml)

0.5 ml solución de sacarosa (1 g/ 10 ml)

0.5 ml solución de almidón (1 g/ 10 ml)



PROCEDIMIENTO

1. Poner en cada uno de 5 tubos 2 ml de reactivo de Fehling I
2. Añadir en cada tubo 2 ml de reactivo de Fehling II y mezclarlo
3. Añadir 3 gotas de agua destilada en tubo No. 1, solución de glucosa en tubo No. 2, de fructosa en tubo No. 3, de sacarosa en tubo No. 4 y de almidón en tubo No. 5.
4. Calentar por 3 min en baño maría a 100°C.
5. Enfriarlo lentamente.

RESULTADOS

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5

OBSERVACIONES

RESULTADOS



DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Ganong, W. F. (2006). Fisiología médica. 20 Ed. Manual Moderno.
2. Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2006). Tratado de fisiología médica. 11 Ed. Elsevier.
3. Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W. (2007). Bioquímica ilustrada. 17 Ed. Manual Moderno.
4. Voet, D. and Voet, J. G. (2004). Biochemistry. 3 Ed. Wiley.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Indicar los cálculos necesarios para la elaboración de las soluciones utilizadas.
3. Describir carbohidratos, aldosas, cetosas, triosas, tetrasas, pentosas, hexosas.
4. ¿Cuáles son las estructuras de carbohidratos relevantes en la biología?
5. Explicar el enlace glucosídico (N y O) y disacáridos relevantes en la biología.



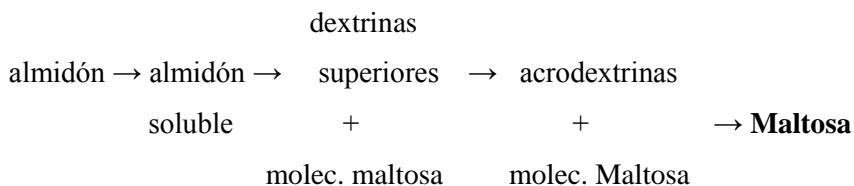
PRÁCTICA No. 8

ACTIVIDAD DE LA AMILASA SOBRE EL ALMIDÓN

INTRODUCCIÓN

El almidón es un polisacárido muy abundante en los vegetales en los cuales se encuentra generalmente en forma de pequeños gránulos microscópicos de estructura cristalina. El grano de almidón está formado por amilosa y amilopectina. La amilopectina se encuentra en la parte exterior del grano, es insoluble en agua y no da coloración con la solución de lugol. La amilosa se encuentra en la parte interna y da coloración violeta en presencia de lugol. Por otro lado, la amilasa cataliza la hidrólisis del almidón, glucógeno y dextrinas superiores en moléculas cada vez más pequeñas, en un proceso progresivo dando como producto final el disacárido maltosa. La amilasa es una mezcla de enzimas. En el hombre la encontramos en la boca (amilasa salival) y en el intestino (amilasa pancreática). La amilasa pancreática se considera idéntica en su acción a la amilasa salival. El pH óptimo para la amilasa salival es de 6.6. Cuando se encuentra en medios con pH más ácidos o más alcalinos, la actividad de la enzima disminuye o se inhibe por completo. La presencia de sales también modifica la actividad de esta enzima.

En esta práctica, el avance de la hidrólisis del almidón se demostrará siguiendo la formación del complejo con yodo el cual da una coloración violeta con los almidones. A medida que se va efectuando la hidrólisis, el color azul va desapareciendo y aparece un color rojizo (eritrodextrinas) y posteriormente se observa una coloración amarilla, debida únicamente a la solución de yodo, lo que demuestra que el almidón ha sido hidrolizado hasta maltosa.



OBJETIVO

Verificar la actividad de la amilasa sobre el almidón a través de su producto de hidrólisis.



MATERIALES

- 7 Tubos de ensayo
- 1 Baño maría
- 1 Placa de porcelana excavada
- 1 Gradilla
- Pipetas de 1 ml
- 1 Pinzas para tubo
- 2 Pipetas de 10 ml
- 3 Pipetas Pasteur

REACTIVO

- Almidón 1% en regulador de fosfatos 0.02M
- Glucógeno 1% en regulador de fosfatos 0.02M
- Regulados de fosfatos 0.02M
- Solución de NaCl 0.5N
- Solución de amilasa pancreática al 1% o amilasa salival
- Solución de lugol

METODOLOGÍA

Preparar una serie de 7 tubos de ensayo debidamente etiquetados de acuerdo a la tabla 1, utilizando 5 diluciones diferentes de enzima comercial o saliva:

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7
Almidón al 1% (ml)	1	1	1	1	0	0	0
Agua destilada	0	0	0	0	1	1	1
PREINCUBACIÓN*	Dejar a 37°C por 5 minutos						
Enzima al 1% o saliva concentrada(ml)	Sin diluir	Dil 1:5 0.5	Dil 1:10 0.5	Dil 1:20 0.5	Dil 1:5 0.5	Dil 1:10 0.5	Dil 1:20 0.
NaCl al 5%	Adicionar a cada tubo una gota						
INCUBACIÓN	Incubar a 37°C adiferentes intervalos de tiempo						
Lectura (color)							
2 min							
4 min							
6 min							
8 min							
10 min							
12 min							
Mas tiempo							

Tabla 1. Diluciones del ensayo hidrólisis enzimática de almidón.



Antes de agregar la enzima y a intervalos de 1 minuto después de adicionada, hacer la prueba de gota del contenido de cada tubo con solución diluida de yodo (lugol).

1. Transcurridos 10 minutos, hacer las determinaciones cada dos minutos hasta que la prueba sea negativa.
2. Hacer las lecturas comparando con el tubo testigo.
3. ANOTAR EL TIEMPO INICIAL Y FINAL DE LA DIGESTIÓN EN CADA TUBO.
4. Indicar en el reporte (Resultados) el tiempo necesario para que la reacción sea completa en cada tubo y calcule las Unidades de Amilasa en cada tubo, definiendo una Unidad de amilasa como: “número de mililitros de solución de almidón al 1% que pueden ser hidrolizados en 30 min, por 1 ml de extracto puro, en condiciones de pH y temperatura trabajada.

RESULTADOS

OBSERVACIONES

DISCUSIÓN



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. Robert, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.
3. Voet, D., and J.G. Voet. 1995. Biochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A
4. Mathews, C.K., van Holde K.E. and Ahern K.G. 2000. Biochemistry. Third edition. Addison Wesley Longman Inc. USA.
5. Stryer, L. 1995. Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Reverte. Barcelona, España.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Indicar los cálculos necesarios para la elaboración de las soluciones utilizadas.
3. Hacer los cálculos para determinar las unidades de amilasa.
4. Explicar ¿cómo demostraste que el almidón fue totalmente transformado en sus subproductos al reaccionar con la amilasa?
5. ¿Qué son las Unidades (enzimáticas). Todas son iguales o varían con el tipo de sustrato que usas?
6. ¿Cómo afecta el NaCl en la actividad de la amilasa?
7. ¿En el reino vegetal, donde podemos encontrar amilasa?
8. ¿Cuál es el pH en el cual la actividad de la amilasa es óptima?
9. Haga un esquema de la estructura de amilosa y de amilopectina
10. Describir un método para determinar azúcares reductores.



PRÁCTICA No. 9

IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son biomoléculas muy diversas; unos están formados por cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, en general lineales, pero algunos tienen anillos (aromáticos). Algunos son flexibles, mientras que otros son rígidos o semiflexibles hasta alcanzar casi una total flexibilidad molecular, algunos comparten carbonos libres y otros forman puentes de hidrógeno. En el uso coloquial, a los lípidos se les llama incorrectamente grasas, aunque las grasas son sólo un tipo de lípidos procedentes de animales. Los lípidos cumplen funciones diversas entre ellas la de reserva energética (triacilglicéridos), la estructural (fosfolípidos de las bicapas) y la reguladora (esteroides). Los ácidos grasos son las unidades básicas de los lípidos saponificables y consisten en moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada con 12 a 22 átomos de carbono y un grupo terminal. La presencia de dobles enlaces en el ácido graso reduce el punto de fusión. Los ácidos grasos se dividen en saturados (sin presencia de dobles enlaces) e insaturados (uno o más dobles enlaces).

OBJETIVO

Conocer las características fisicoquímicas de diferentes lípidos.

MATERIAL

- 4 Lípidos de diferentes fuentes
- (aceites, mantequilla, manteca, margarina)
- 1 Espátula chica
- 1 Mechero Bunsen
- 4 Tubos de ensayo de 15 ml
- 4 Pipetas de 2 y 10 ml

REACTIVOS

- ml NaOH al 20%
- 3 gotas de lugol
- 8 ml Ácido acético al 5%
- 1 g Almidón



METODOLOGÍA

Saponificación

1. Colocar 2 ml o 2 g de aceite y 2 ml de NaOH al 20%.
2. Hervir suavemente de forma controlada y agitar durante algunos minutos (aprox. 2 min).
3. Dejar reposar y aparecerán dos o tres capas:
 - Superior (puede no aparecer): aceite que no ha reaccionado
 - Intermedia semisólida: jabón
 - Inferior: glicerol disuelto en el agua

Ácidos grasos insaturados

1. Poner 2 ml de un lípido en un tubo de ensayo. Añadir 7.5 ml de ácido acético.
2. Añadir unas 3 gotas de lugol y mezclar bien.
3. Incubarlo unos 7 min a 70°C.
4. Añadir media espátula de polvo de almidón y mezclar bien.

RESULTADOS



OBSERVACIONES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Ganong, W. F. (2006). Fisiología médica. 20 Ed. Manual Moderno.
2. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipkursky, S. L. and Darnell, J. (2005). Biología celular y molecular. 5 Ed. Médica Panamericana.
3. Mathews, C. K., van Holde, K. E. and Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. 3 Ed. Pearson Addison Wesley.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Indique cálculos necesarios para la elaboración de las soluciones utilizadas.
3. Explique dos ejemplos de estructura y funciones de las diferentes clases de lípidos.
4. Describa la estructura de la membrana y sistemas de transporte.
5. ¿Cuáles son los ácidos grasos esenciales, por qué y para qué se necesitan?

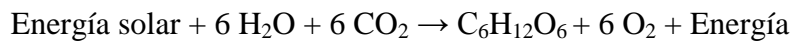


PRÁCTICA No. 10

METABOLISMO VEGETAL: FOTOSÍNTESIS

INTRODUCCION

La fotosíntesis es un proceso metabólico que realizan las plantas, las cianobacterias y algunos protistas. En los organismos eucariotes se realiza en los cloroplastos. La reacción general de la fotosíntesis es la siguiente:



Consta de múltiples etapas. Las primeras se conocen como reacciones lumínicas y se encargan de convertir la energía solar en energía química produciendo oxígeno como producto de desecho, se dan en las membranas de los tilacoides. Las segundas se conocen como Ciclo de Calvin (o reacciones de oscuridad) y producen moléculas de azúcar utilizando el CO₂ y los productos de alto contenido energético de las reacciones luminosas, estas se llevan a cabo en el estroma. Con esta práctica se pretende un acercamiento al complejo e importante proceso de la fotosíntesis, para ello se realizará la identificación de los cloroplastos mediante el uso del microscopio, la identificación de pigmentos fotosintéticos y la medición de la tasa fotosintética mediante un ensayo de discos flotantes cuyo principio es basado en que los discos de hoja normalmente flotan. Cuando los espacios de aire se infiltran con una solución, la densidad de la hoja se incrementa y los discos se precipitan. La solución de infiltración incluye una pequeña cantidad de bicarbonato de sodio. Los iones del bicarbonato sirven como fuente de carbono para la fotosíntesis (Figura 2). Durante el proceso de la fotosíntesis se libera oxígeno del interior de la hoja, cambiando así, que el disco flote. La respiración celular por su parte consume oxígeno y se da al mismo tiempo que la fotosíntesis, la velocidad que se demoran los discos precipitados en flotar es una medida indirecta de la tasa neta de fotosíntesis.

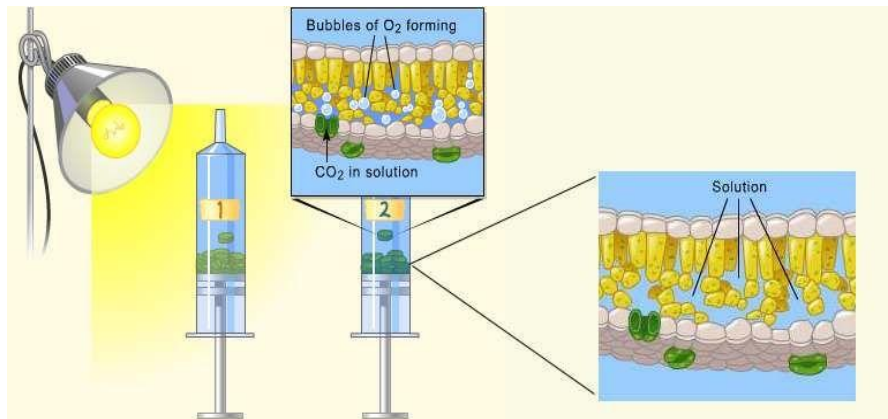


Figura 2. Esquema general del experimento de discos flotantes

OBJETIVOS

1. Identificar los cloroplastos en la célula.
2. Comprobar la presencia de clorofila mediante cromatografía en papel.
3. Reconocer el fenómeno de la fotosíntesis.
4. Medir la tasa fotosintética.

MATERIALES

- Hojas de Elodea y espinacas
- Microscopio
- Porta objetos y cubre objetos
- Vasos de precipitados de 250 ml
- Mortero con pistilo
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml
- Gotero
- Papel filtro
- Plancha de calentamiento
- Tubo capilar
- Regla
- Elodea

REACTIVOS

- Solución de bicarbonato de sodio 2%
- Etanol 95%
- Acetona
- Cloroformo
- Jabón líquido



- Cronómetro
- Fuente de luz
- Jeringa plástica nueva desechable de 10 ml (sin aguja)
- Perforadora de hoyos

METODOLOGÍA

Identificación de cloroplastos

1. Cortar una hoja de elodea póngala en el portaobjetos.
2. Agregar una gota de agua y cubrir con el cubre objetos.
3. Observar en microscopio con los objetivos de 10 y 40X y dibujar lo observado.
4. Exponga la hoja a una fuente de luz artificial o natural y observar la ciclosis de los cloroplastos al interior de la célula.

Identificación de clorofila por cromatografía

1. En un vaso de precipitado de 250ml poner etanol hasta alcanzar un centímetro de profundidad y cubrirlo con un vidrio de reloj para crear una atmosfera alcohólica en el interior.
2. Cortar hojas de espinaca y ponerlas en el mortero adicione 5 ml de acetona.
3. Macerar hasta tener una mezcla homogénea.
4. Filtrar la mezcla anterior usando una gasa o muselina para obtener el líquido.
5. Recortar un pedazo de papel filtro de 2 cm de ancho por 10 cm de largo, marcarr con un lápiz dos líneas paralelas a cada borde
6. Con un tubo capilar poner la muestra en una de las líneas marcadas (Figura 3)
7. Introducir el papel filtro con la muestra hacia abajo dentro del vaso de precipitado con alcohol, evitando tocar las paredes del vaso y procurando que la muestra no entre en contacto con el solvente.
8. Hacer que el papel quede en forma vertical
9. Dejar correr por absorción el solvente sobre el papel filtro hasta que alcance la línea superior
10. Retirar el papel y dejar secar a temperatura ambiente.



11. Calcular el R_f para cada pigmento separado.

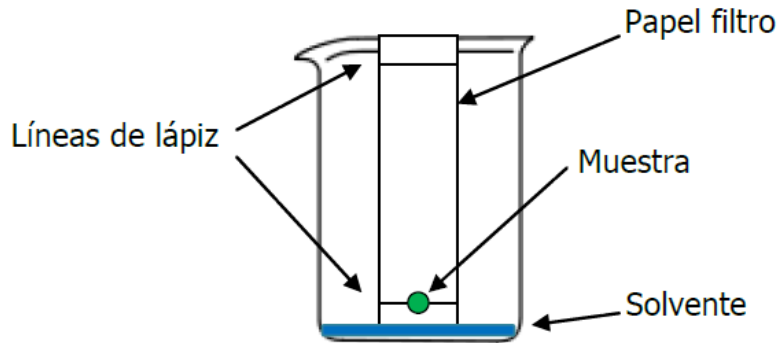


Figura 3. Montaje para cromatografía en papel.

Ensayo del disco flotante para comprobar la fotosíntesis

1. Disponer en un vaso de precipitado 20 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 0.2 %.
2. En otro vaso de precipitado disponer 20 ml de agua destilada, este vaso será utilizado como CONTROL del experimento.
3. Adicionar 5 ml de jabón líquido al vaso con la solución de bicarbonato. El jabón líquido humedecerá la superficie hidrofóbica de la hoja de espinaca, permitiendo que las soluciones penetren el interior de los tejidos.
4. Cortar con un sacabocados 10 o más discos uniformes de hoja de espinaca fresca para cada ensayo (10 para el vaso con bicarbonato) 10 o más para el Vaso CONTROL (Evite discos con venas centrales) (Figura 3A).
5. Seleccionar los discos de hojas remueva el pistón de la jeringa.
6. Colocar los discos de hoja dentro de la jeringa, incorporando nuevamente el pistón cuidando de no dañar los discos de hoja.
7. Empujar suavemente el pistón hasta dejar solo un pequeño volumen de aire para los discos de hoja (< 10%) entre el extremo de la jeringa y la barrera de goma del pistón (Figura 3B).



8. Succionar un pequeño volumen de bicarbonato de sodio y suspender ahí los discos de hoja (Figura 3C).
9. Poner su dedo índice en la abertura de la jeringa y halar el pistón, de esta forma creará vacío el cual deberá conservar por 10 segundos. Así, el bicarbonato de sodio se infiltrará en los espacios de aire de la hoja.
10. Repetir este procedimiento unas 2 ó 3 veces. (Figura 4)
11. Colocar los discos y la solución dentro de un vaso precipitado, y adicionar 10 ml en el fondo del vaso de una solución de bicarbonato de sodio.
12. Para el tratamiento control infiltrar los discos solo con agua y jabón líquido. NO adicionar bicarbonato.
13. Colocar ambos tratamientos, previamente marcados, con una fuente de luz y empiece a contabilizar el tiempo. Después de cada minuto contar el número de discos que flotan. Continuar el conteo hasta que todos los discos floten.
14. Analice la tabla 1.



Figura 4. Procedimiento de discos flotantes.



RESULTADOS

Tabla 1. Colección de datos y análisis.

Mínutos	Discos que flotan	Observaciones

Nota:

Con estos datos es muy importante identificar, el punto donde el 50% de los discos flotan, este término se denomina ET50 (Steucek, *et. al.*, 1985) realizar una gráfica, donde en el eje de X disponga tiempo en minutos y en el eje de la Y número de discos que flotan (Ver figura 5).

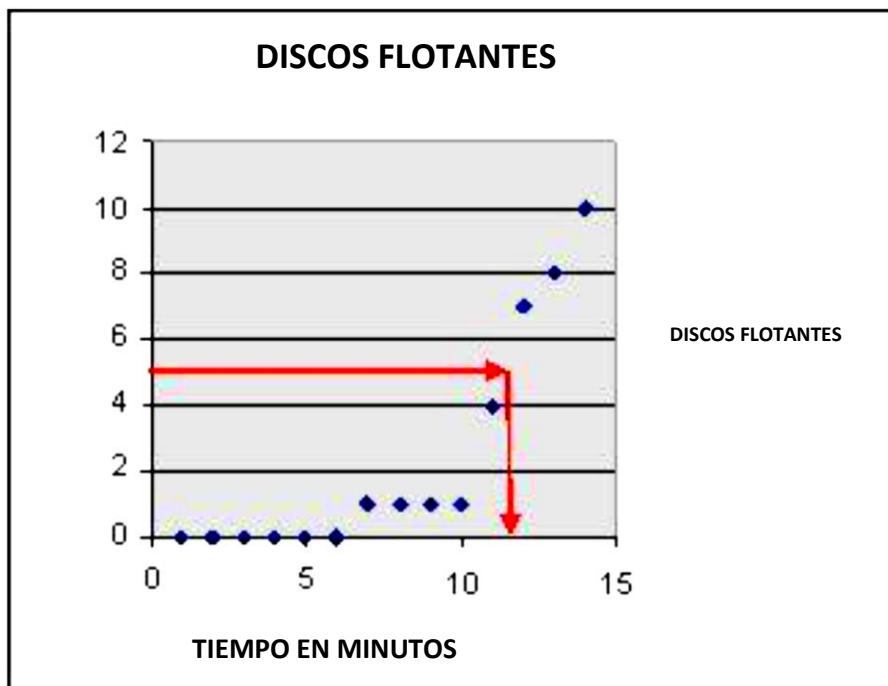


Figura 5. Gráfica del tiempo para los discos flotantes.



OBSERVACIONES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Steucek, Guy L. Robert J. Hill and Class/Summer 1982. 1985. Photosynthesis I: An Assay Utilizing Leaf Disks. *The American Biology Teacher*, 47(2):96-99.
2. Rukes, Kari L. and Timothy J. Mulkey. 1994. Measurement on the Effects of Light Quality and Other Factors on the Rate of Photosynthesis. *Bioscene*, 20(3): 7-11. http://www.acube.org/volume_20/v20-3p7-11.pdf.
3. Greenler, John. 1990. Exploring Photosynthesis with Fast Plants. *Wisconsin Fast Plant Notes*, 4(1): 4-5. http://www.fastplants.org/pdf/activities/exploring_photosynthesis.pdf
4. Richard, David S. Measure of Photosynthetic Rate In Spinach Leaf Disks <http://www.susqu.edu/FacStaff/r/richard/photosynthlab.html>



ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Dibujar un cloroplasto con sus partes.
3. ¿Cuál es el principio de la cromatografía?
4. ¿Qué es el R_f y como se calcula?
5. ¿Qué tipo de pigmentos fotosintéticos se encuentran en los tejidos vegetales y que colores los representan en la cromatografía en papel?
6. ¿Qué relación existe entre el ET50 y el tiempo?
7. ¿Qué factores podrían influir en la tasa fotosintética? Explique.
8. ¿Por qué es importante establecer un experimento control?
9. ¿Por qué es importante estudiar la tasa fotosintética en vegetales?



PRACTICA No. 11

DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES CELULARES EN HOJAS DE ESPINACA

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es el proceso por el que las plantas transforman, con ayuda de la luz solar, el gas carbónico y el agua en oxígeno (O₂) y en elementos orgánicos como glucosa. La clorofila es un pigmento, que hace que los vegetales sean capaces de realizarla. La cual, actúa como un captor solar, atrayendo y capturando las partículas de luz, ricas en energía. En la Chlorella, la clorofila se encuentra en los cloroplastos y absorbe, únicamente, el rojo y el azul del espectro solar, que llegan a la tierra incluso con tiempo cubierto, y refleja el verde. Al mismo tiempo, protege las células de las plantas, enfriándolas y preservándolas de la radiación ultravioleta. De esta manera, impide que las plantas se sequen y estimula la producción de nutrientes. El ser humano, que se encuentra al final de la cadena alimentaria, se beneficia de todos estos componentes concentrados.

OBJETIVOS

1. Familiarizar al alumno con algunas determinaciones cuantitativas de moléculas biológicas mediante técnicas colorimétricas.
2. Aprender a usar un espectrofotómetro UV/Vis.

MATERIAL

- 10 g Espinacas
- Arena de mar
- 1 Balanza Analítica
- 3 Trozos de papel aluminio
- 1 Estufa
- 1 Mortero con pistilo

REACTIVOS

- 30 ml Acetona
- Agua destilada



- 3 Gasas
- 1 Probeta 50 ml
- 2 Tubos para centrifuga
- 1 Centrifuga
- 10 Tubos de ensayo
- 2 Celdillas para espectrofotómetro
- 1 Espectrofotómetro

METODOLOGÍA

Determinación del contenido en agua de la hoja de espinaca

1. El contenido en agua se determina por diferencia entre el peso de la hoja de espinaca antes y después de un tratamiento con calor. El procedimiento es el siguiente:
2. Pulsar el 0/T de la balanza, con lo que se hace el cero.
3. Colocar sobre el platillo de la balanza analítica un trozo de papel de aluminio limpio y seco y anotar el peso con cuatro cifras decimales.
4. Volver a tarar pulsando nuevamente 0/T, con lo que se vuelve a hacer el cero.
5. Añadir los trocitos de hoja de espinaca o de acelga hasta alcanzar aproximadamente 1 gramo y anotar el peso exacto conseguido con cuatro cifras decimales.
6. Cerrar el trozo de papel de aluminio y colocarlo en la estufa durante 24 horas.
7. Transcurrido ese tiempo, y sin abrirlo, pesar de nuevo el papel conteniendo la materia seca. El contenido en agua se calcula, en porcentaje, respecto al peso inicial:

Peso del papel de aluminio = **Pp**

Peso de hoja húmeda = **Hh**

Transcurridas 24 horas en la estufa:

Peso final = Peso del papel + Peso de hoja seca = **PHs**



Con estos datos se calcula el peso de hoja seca (Hs) restándole al peso final el peso del papel de aluminio:

$$\text{Peso de hoja seca} = \mathbf{PHs - Pp = Hs}$$

De la diferencia entre el peso de hoja húmeda y el peso de hoja seca obtenemos el contenido en agua en el gramo inicial de hoja que se pesó aproximadamente:

$$\text{Contenido en agua} = \mathbf{Hh - Hs = C_A}$$

Como se pide el contenido en agua, en porcentaje, respecto al peso inicial:

$$\% H_2O = \frac{C}{H_h} \times 100$$

Determinación del contenido en clorofila

Extracción de pigmentos en hoja de espinaca

1. Pesar aproximadamente 1 gramo (anotar el peso) de hojas en la balanza y machacarlas en un mortero con arena de mar hasta obtener una pasta homogénea.
2. Añadir 10 ml de acetona y filtrar a través de dos capas de gasa (humedecidas con agua destilada y escurridas).
3. Recuperar la arena y repetir la extracción en dos ocasiones más con 5 ml de acetona en cada caso. La arena debe quedar blanca.
4. Centrifugar el filtrado, en 2 tubos de centrífuga, durante 5 min para separar los restos de arena y partículas en suspensión.
5. Trasvasar los sobrenadantes a una probeta para determinar el volumen final del extracto. **Anotar dicho valor.**

Determinación de clorofila

1. Tomar 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo y añadir 4 ml de agua (dilución 1:4).
2. Medir la absorbancia a 652 nm.
3. Para la determinación de clorofila, utilizar el valor de $34.5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción (ϵ), y referir el resultado a peso húmedo de hojas:



$$\text{Clorofila (mg / ml extracto)} = \frac{A_{652}}{34.5} \times 5\text{ml}$$

$$\text{Clorofila (mg / gr hoja)} = \text{Clorofila (mg / ml extracto)} \times \frac{\text{Vextracto (ml)}}{\text{peso de hojas (gr)}}$$

Determinación del Espectro de Absorción de Clorofila.

1. Tomar la solución 1:4 del apartado anterior y realizarle un espectro de absorción entre 350-700 nm, en un espectrofotómetro frente a un blanco de acetona.
2. Tomar nota de las longitudes de onda en las que se presentan los máximos de absorción.
3. Comparar el dato de Abs a los máximos con el valor obtenido del apartado anterior.

RESULTADOS

OBSERVACIONES

DISCUSIÓN



BIBLIOGRAFÍA

1. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipkursky, S. L. and Darnell, J. (2005). Biología celular y molecular. 5 Ed. Médica Panamericana.
2. Mathews, C. K., van Holde, K. E. and Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. 3 Ed. Pearson Addison Wesley.

ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. Realizar los cálculos necesarios para cada una de las determinaciones.
3. Realizar una curva de absorbancia vs longitud de onda del último punto de la práctica.
4. Describir el fundamento de cada una de las técnicas usadas en esta práctica
5. Realizar discusión de los resultados obtenidos.



PRÁCTICA No. 12

EXTRACCIÓN DE ADN VEGETAL A PARTIR DE DIVERSAS PLANTAS

INTRODUCCIÓN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la sustancia química donde se almacenan las instrucciones que dirigen el desarrollo de un huevo hasta formar un organismo adulto, mantienen su funcionamiento y permite la herencia. Los organismos vivos formados por células que tienen núcleos por una membrana donde bien diferenciada, se denomina eucariotas. El ADN es una molécula formada por agregaciones de tres tipos de sustancias: desoxirribosas, el ácido fosfórico y las bases nitrogenadas, adenina, guanina, la timina y citosina. Su extracción se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. Se empieza por lisar (romper) las células mediante un detergente, vaciándose su contenido molecular en una disolución tampón en la que se disuelve el ADN. Las proteínas asociadas al ADN, se habrán fraccionado en cadenas más pequeñas y separadas de él por acción del detergente. Sólo queda extraer el ADN de esa mezcla con alcohol isoamílico.

OBJETIVO

Lograr la extracción de ADN de algún organismo vegetal con base a las propiedades físicas y químicas del ADN.

MATERIAL

- 1 Muestra vegetal la que el alumno elija (Aprox. 1 tza)
- 1 Licuadora
- 1 Centrifuga o colador
- 2 Vasos de precipitado
- 1 Gradilla

REACTIVOS

- 250 ml Agua destilada fría
- 10 g Sal de mesa
- 30 ml Jabón líquido
- 5 g Bicarbonato de sodio



- 4 Tubos de ensayo de vidrio
- 1 Agitador
- Ablandador de carne
- Alcohol etílico 96 %

PROCEDIMIENTO

1. Colocar los siguientes ingredientes en una licuadora:
 - a. 250 ml de agua destilada fría, NO usar agua del grifo.
 - b. 1.5 g de sal de mesa, preferiblemente pura.
 - c. 5 g de bicarbonato sódico.
2. Elegir la muestra que va a proporcionar el ADN entre los vegetales que el alumno elija (cebolla, ajo, tomates, etc.) y cortarla en cuadraditos.
3. Colocar la muestra vegetal en la licuadora y producir su trituración accionando las cuchillas a impulsos de 10 segundos, realizar durante 30 s. Así se romperán muchas células y otras quedarán expuestas a la acción del detergente.
4. Separar después los restos vegetales más grandes del caldo molecular haciéndolo pasar por un colador lo más fino posible. Lo ideal es centrifugar a baja velocidad 3000 rpm por 5 minutos y después retirar el sobrenadante para usarlo.
5. Agregar de 5 a 10 ml de jabón líquido a la mezcla y revolver bien. Dejar reposar 10 min.
6. Pasar la mezcla a tubos de ensayo de vidrio y llenar hasta aprox. 1/3 del tubo.
7. Colocar los tubos en una gradilla para poder adicionar una pizca de ablandador de carne a cada tubo de ensayo y agitar suavemente para no romper el ADN.
8. Añadir con pipeta 10 ml de alcohol etílico 96% enfriado a 0°C. Se debe dejar escurrir lentamente el alcohol por la cara interna del recipiente, teniendo éste inclinado. El alcohol quedará flotando sobre la mezcla.
9. Introducir la punta de una varilla estrecha hasta justo debajo de la separación entre el alcohol y el tampón.
10. Remover la varilla hacia delante y hacia atrás y poco a poco se irán enrollando los fragmentos de mayor tamaño de ADN.
11. Pasado un minuto retirar la varilla atravesando la capa de alcohol con lo cual el ADN quedará adherido a su extremo con el aspecto de un copo de algodón mojado.



RESULTADOS

OBSERVACIONES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipkursky, S. L. and Darnell, J. (2005). *Biología celular y molecular*. 5 Ed. Médica Panamericana.
2. Mathews, C. K., van Holde, K. E. and Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. 3 Ed. Pearson Addison Wesley.



ORIENTACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Elaborar un diagrama de flujo en el que describa el o los procedimientos utilizados en esta práctica.
2. ¿Qué es el ADN?
3. ¿Qué importancia tiene en un organismo vivo?
4. Explicar porque se requieren varias etapas para la extracción del ADN (detalladamente cual es la acción de los reactivos que se usaron).
5. Representar estructuralmente la unión de las bases G C y A T.



ANEXO I

Titulación del lado ácido. Construcción de la gráfica

El siguiente ejemplo con el lado ácido de la titulación de un aminoácido ilustra uno de varios de los métodos disponibles para corregir por dilución. Para la muestra y el blanco de agua, graficar el volumen del ácido adicionado contra el pH alcanzado (Fig. 1). De la gráfica o de los datos originales, preparar una tabla como la Tabla 1. Restar el volumen del ácido requerido para llevar el blanco de agua a cualquier pH del volumen del ácido requerido para llevar la muestra al mismo pH. La diferencia representa la cantidad de ácido consumida en la titulación de la muestra solamente. Usando los datos de su tabla, graficar el pH contra el número de equivalentes de ácido necesario para titular la muestra del aminoácido a cualquier pH (ver Fig. 6).

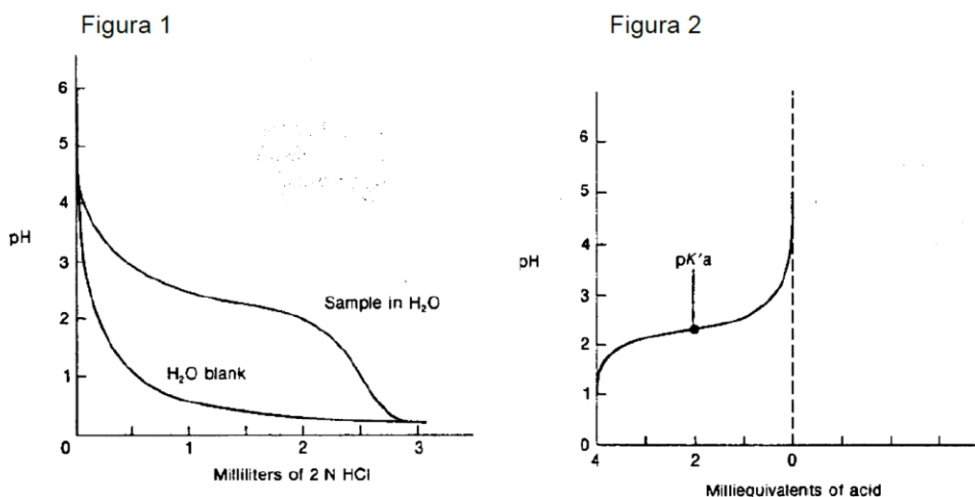


Tabla 1. Ácido requerido para titular la muestra y el blanco*

pH	Volumen (ml) de ácido (2 N HCl)		
	Muestra + agua	agua	Diferencia
3.5	0.103	0.003	0.100
3.0	0.335	0.020	0.315
2.5	0.667	0.032	0.635
2.2	1.063	0.063	1.000
2.0	1.425	0.200	1.225

*Clarck, J.M. Jr. y Switzer R. L. Experimental Biochemistry. WH: Freeman and Company N.Y. 1977.

Figura 6. Gráfica del pH contra el número de equivalentes del ácido.



El número de equivalentes de ácido o base consumidos al pasar a través de la inflexión de una curva, como en la Fig. 2, representa la cantidad de ácido requerida para titular un grupo ionizable en la cantidad del aminoácido que se ha ensayado. El punto final de la titulación se debe reconocer como el punto en que se eleva (o cae) drásticamente el pH con la adición del titulante. Este punto generalmente se determina con más precisión de la curva de titulación del aminoácido con la base.

Titulación del lado básico.

Para corregir por dilución el lado básico de la curva se puede aplicar un método similar.

Preparar una curva de titulación completa y corregida para el aminoácido titulado

El número de equivalentes de ácido o base consumidos al pasar a través de la inflexión de una curva, como en la Fig. 2, representa la cantidad de ácido requerida para titular un grupo ionizable en la cantidad del aminoácido que se ha ensayado. El punto final de la titulación se debe reconocer como el punto en que se eleva (o cae) drásticamente el pH con la adición del titulante. Este punto generalmente se determina con más precisión de la curva de titulación del aminoácido con la base.



REFERENCIAS

- Clark, J.M and R. L. Switzer. (1977). Experimental Biochemistry. W.H. Freeman and Company.
- Conn, E. E., Stumpf, P. K., George, B. and Doi, R. H. 2002. Bioquímica Fundamental, 4ª Edición. Wiley.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. and Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. 3 Ed. Pearson Addison Wesley.
- Ganong, W. F. (2006). Fisiología médica. 20 Ed. Manual Moderno.
- Greenler, John. 1990. Exploring Photosynthesis with Fast Plants. Wisconsin Fast Plant Notes, 4(1): 4-5.
http://www.fastplants.org/pdf/activities/exploring_photosynthesis.pdf
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2006). Tratado de fisiología médica. 11 Ed. Elsevier.
- Lehninger, A. (1995). Bioquímica. 2da. Ed., Ediciones Omega, S:A., Barcelona:428,453-456, 475-476.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipkursky, S. L. and Darnell, J. (2005). Biología celular y molecular. 5 Ed. Médica Panamericana.
- Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W. (2007). Bioquímica ilustrada. 17 Ed. Manual Moderno.
- Robert, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.
- Richard, David S. Measure of Photosynthetic Rate In Spinach Leaf Disks
<http://www.susqu.edu/FacStaff/r/richard/photosynthlab.html>



- Rukes, Kari L. and Timothy J. Mulkey. 1994. Measurement on the Effects of Light Quality and Other Factors on the Rate of Photosynthesis. *Bioscene*, 20(3): 7-11. http://www.acube.org/volume_20/v20-3p7-11.pdf.
- Steucek, Guy L. Robert J. Hill and Class/Summer 1982. 1985. Photosynthesis I: An Assay Utilizing Leaf Disks. *The American Biology Teacher*, 47(2):96-99.
- Stryer, L. 1995. *Bioquímica*. Cuarta edición. Editorial Reverte. Barcelona, España.
- Voet, D. and Voet, J. G. 2004. *Biochemistry*. 3era Ed. Wiley.
- Voet, D., and J.G. Voet. 1995. *Biochemistry*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A
- Wilson, K., and Walker, J. 2000. *Principles and Techniques of practical Biochemistry*. Fifth edition. Cambridge University Press.