



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA**

**DEPARTAMENTO DE FORMACIÓN  
BÁSICA DISCIPLINARIA**

**MANUAL DE LABORATORIO  
BIOQUÍMICA MÉDICA I**

**ELABORADO POR:**

**QFB MARÍA DEL SOCORRO AGUILAR ESPEJEL**

**IBQ HÉCTOR GUILLERMO GÓMEZ COVARRUBIAS**

**M en C THELMA GUADALUPE LEMUS FLORES**

**Junio del 2014**

## ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL DE LABORATORIO	4
REGLAMENTO DE LABORATORIO	7
<b>PRÁCTICA</b>	
1 ALGUNAS PROPIEDADES DEL AGUA	9
2 ÓSMOSIS	12
3 SOLUCIONES REGULADORAS	16
4 REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO	19
5 PROTEÍNAS	22
6 ANHIDRASA CARBÓNICA	26
7 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS	29
8 VITAMINA "C	33
9 OBTENCIÓN DE DNA	36
BIBLIOGRAFIA	39
ANEXO 1. RELACIÓN DE REACTIVOS	40
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	41

## INTRODUCCIÓN

La Bioquímica es la ciencia que estudia los procesos químicos de los seres vivos desde dos puntos de vista: estructural y funcional. Mediante el primero conocemos la distribución espacial de la materia viva; con el segundo, el papel que juega en el organismo.

Para comprender la influencia de la Bioquímica en la Medicina, es preciso conocer los elementos químicos que conforman la materia viva, la estructura de las biomoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, vitaminas, etc.), su comportamiento que bajo los principios básicos de la termodinámica llevan a cabo para que las células logren realizar sus funciones de crecimiento, reproducción, envejecimiento y muerte.

El objetivo del manual es familiarizar al estudiante con algunas propiedades de las biomoléculas y ponerlo en contacto con el método científico. Se trata de que con prácticas sencillas y representativas se logre explicar algunas propiedades de las biomoléculas. Cada una de las prácticas contiene la metodología necesaria para el desarrollo experimental de las mismas, así como los antecedentes teóricos necesarios para la comprensión de cada uno de los experimentos. Es importante que el alumno lea previamente las instrucciones de este manual y cuente con los conocimientos teóricos suficientes para lograr un análisis completo de cada experimento a realizar.

Por otro lado el trabajo en el laboratorio también tiene el objetivo de lograr el aprendizaje colaborativo en el alumno, al incrementar su responsabilidad y participación activa, proporcionando mayor autoestima y unas relaciones interpersonales más positivas.

Para lograr lo anteriormente descrito es necesario que el estudiante tenga presente siempre que:

- a. Debe de leer sus prácticas antes de realizarlas.
- b. Debe consultar los libros de texto, o las páginas web propuestas, para aclarar dudas y resolver los cuestionarios.
- c. Debe realizar los experimentos con cuidado, procurando entender el por qué de los resultados.
- d. Debe observar minuciosa y críticamente cada uno de los cambios ocurridos.
- e. Debe anotar sus observaciones y resultados para que con un análisis crítico buscar la explicación científica.

## MATERIAL DE LABORATORIO

A continuación como parte de la información previa con la que debes de contar, se describen algunos de los materiales de mayor uso en los experimentos.

### TUBOS DE ENSAYO

Descripción.- Son tubos de vidrios cerrados por uno de sus extremos. Hay diferentes capacidades con borde o sin él. El tamaño del tubo se puede expresar por las dimensiones de su diámetro o su altura, comúnmente en mm, por ejemplo: 13 mm x 100 mm.



Usos.- Los tubos de ensayos son utilizados generalmente para realizar ensayos químicos de carácter cualitativo con pequeñas cantidades de reactivo, los cuales al entrar en contacto originan algún cambio de color o aparición de precipitado. La mezcla de reactivos en un tubo de ensayos no debe hacerse nunca colocando un dedo en la boca del tubo para luego agitarlo, para ello se deben utilizar tapones o papel parafilm.

### VASOS DE PRECIPITADOS



Descripción.- Son vasos de vidrio de varios tamaños y capacidades; pueden estar graduados o no. Los vasos de precipitados más convenientes para uso corrientes tienen pico, porque facilita verter líquidos o soluciones.

Usos.- Se les emplean en diversas operaciones tales como calentamientos de líquidos para efectuar reacciones (generalmente para precipitaciones), para coleccionar, líquidos, etc. Se elegirá el tamaño del vaso según el volumen del líquido que debe manipularse.

### MATRAZ DE ERLLENMEYER

Descripción.- Son recipientes de vidrio, de forma cónica graduados.

Usos.- Tienen numerosas aplicaciones, por ejemplo sirven para calentar líquidos que presentan una evaporación. El uso más común es en titulaciones de análisis de cuantitativos, por la facilidad de agitar la solución a titular sin peligro de que esta se derrame. También se usa para realizar filtraciones.



### PIPETAS

Descripción.- Es un instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir la alícuota de líquido con bastante precisión. Suelen ser de vidrio. Está formada



por un tubo transparente que termina en una de sus puntas de forma cónica, y tiene una graduación (una serie de marcas grabadas) con la que se indican distintos volúmenes. Hay dos clases de pipetas: las graduadas o de simple aforo, es decir, se enrasa una vez en los cero mililitros, y luego se deja vaciar hasta el volumen que se necesite; en otras, las denominadas de doble enrase o de doble aforo, se enrasa en la marca o aforo superior y se deja escurrir el líquido con precaución hasta enrasar en el

aforo inferior.

Usos.- Están destinadas a medir líquidos, ya sean operaciones rutinarias (pipetas graduadas) o en aquellas que se necesiten precisión científica (pipetas aforadas o volumétricas). Estas últimas poseen un bulbo y se usan para transferir un volumen definido de líquido.

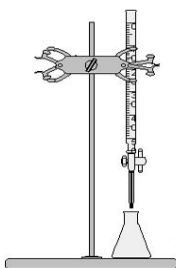
## PROBETAS

Descripción.- Son recipientes cilíndricos graduados de material de vidrio o de plástico de diferentes capacidades.



Usos.- Se emplean para medir determinados volúmenes de líquidos o soluciones en los casos que no se necesitan mucha exactitud.

## BURETAS



Descripción.- Son tubos largos, cilíndricos, de material de vidrio, con una llave de descarga en uno de sus extremos. Las buretas se fabrican de diferentes capacidades, comúnmente de 50 ml, graduadas al décimo de ml (0.1 ml).

Usos.- Las buretas se emplean para descargar distintas cantidades de soluciones. El mayor uso que se les da es en las llamadas titulaciones volumétricas. Una vez limpia y vacía la bureta se mantiene en posición vertical mediante un soporte apropiado.

## SOPORTES

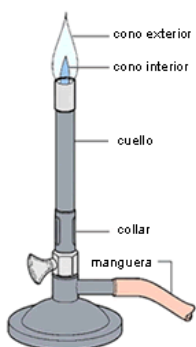
Descripción.- Son aparatos metálicos o de madera que tienen la finalidad de sostener en posiciones fijas los diferentes materiales de laboratorio especialmente cuando se arman aparatos complicados. Entre los soportes que se usan más comúnmente se pueden citar a los siguientes:



- a) El soporte universal o pie, están constituido de una varilla metálica enroscada a una base de hierro rectangular o triangular.
- b) Aros de soporte, que son anillos de hierro que llevan soldadas una varilla que pueden tener en su extremo libre una pinza para fijarla al pie y se usan para colocar rejillas de asbestos o embudos.
- c) Soportes trípodas, que son anillos sostenidos por 3 varillas que le sirvan de apoyo y se utilizan para sostener en los procesos de calentamiento con mechero de gas.

## MECHERO BUNSEN

Descripción.- Los mecheros sirven para quemar diferente tipo de gases, de acuerdo a su construcción, entre los que se pueden mencionar: gas de hulla, gas de gasolina, gas natural, acetileno, butano, propano, etc. Hay diferentes tipos de mecheros, entre ellos se pueden distinguir a aquellos que tienen regulación de gas y los que no lo tienen. Los que se emplean en el laboratorio son simples, pertenecen al segundo tipo y sirven para quemar gas propano.



El mechero tiene una base pesada en la que se introduce el suministro de gas. De allí parte un tubo vertical por el que el gas fluye atravesando un pequeño agujero en el fondo de tubo. Algunas perforaciones en los laterales del tubo permiten la entrada de aire en el flujo de gas proporcionando una mezcla inflamable a la salida de los gases en la parte superior del tubo donde se produce la combustión. El mechero Bunsen es una de las fuentes de calor más sencillas del laboratorio y es utilizado para obtener temperaturas no muy elevadas. Consta de una entrada de gas sin regulador, una entrada de aire y un tubo de combustión. El tubo de combustión está atornillado a una base por donde entra el gas combustible a través de un tubo de goma, con una llave de paso. Presenta dos orificios ajustables para regular la entrada de aire.

La cantidad de gas y por lo tanto de calor de la llama puede controlarse ajustando el tamaño del agujero en la base del tubo. Si se permite el paso de más aire para su mezcla con el gas la llama arde a mayor temperatura (apareciendo con un color azul). Si los agujeros laterales están cerrados el gas sólo se mezcla con el oxígeno atmosférico en el punto superior de la combustión ardiendo con menor eficacia y produciendo una llama de temperatura más fría y color rojizo o amarillento, la cual se llama "llama segura" o "llama luminosa". Esta llama es luminosa debido a pequeñas partículas de hollín incandescentes. La llama amarilla es considerada "sucias" porque deja una capa de carbón sobre la superficie que está calentando. Cuando el quemador se ajusta para producir llamas de alta temperatura, éstas (de color azulado) pueden llegar a ser invisibles contra un fondo uniforme.

## REGLAMENTO DE LABORATORIO

1. Solo tienen derecho a realizar prácticas de laboratorio, los alumnos inscritos oficialmente.
2. En cada práctica habrá una tolerancia de 10 minutos para la entrada; **no habrá retardos y se pondrá falta a quien no llegue a la hora.**
3. Para el trabajo del laboratorio es indispensable **traer bata**, una franela, marcador de tinta permanente, así como jabón de tocador para el aseo de sus manos una vez finalizada la práctica.
4. Dentro del laboratorio, el alumno deberá guardar la debida compostura, esto es no sentarse en las mesas de trabajo, ni dirigirse a su profesor (a) o compañeros del grupo en voz alta.
5. Durante el desarrollo de la práctica queda estrictamente prohibido la entrada de personas ajenas al grupo, así como **comer o beber.**
6. El material del laboratorio roto, deteriorado o extraviado por los alumnos deberá reponerse por el responsable directo, o por el equipo de personas que efectuaron la práctica.
7. La información referente a las prácticas que se desarrollarán en el curso, está contenida en el Manual del Laboratorio de Bioquímica Médica I, por lo que el alumno **deberá traer su manual impreso** en cada sesión de trabajo.
8. El uso de reactivos peligrosos estará restringido únicamente al profesor.
9. Evite el contacto de productos químicos con la piel; si esto ocurre lavar rápidamente con abundante agua.
10. Manipular el material de vidrio con especial atención, para evitar lesiones por cristalería rota.
11. Al término de la sesión, el alumno deberá dejar limpio su área de trabajo y el material de desecho será colocado correctamente en los recipientes específicos destinados para ello. **Desde la primera sesión y en todas ellas, deberá el alumno verificar la colocación y existencia de dichos recipientes. De no**

**encontrarlos preguntar al profesor donde se desechará el material.**

**12.** El Informe de las prácticas realizadas, deberá hacerse según instrucciones del profesor (a) y en la fecha señalada por éste(a).

**13.** El alumno que falte a alguna práctica, tendrá calificación de cero en la misma.



**PRÁCTICA 1****ALGUNAS PROPIEDADES DEL AGUA**

**Objetivo.** El alumno identificará algunas propiedades del agua mediante experimentos sencillos

**INTRODUCCIÓN**

El agua funciona como disolvente universal en los medios intracelular y extracelular gracias principalmente a dos de sus propiedades: su tendencia a formar enlaces de hidrógeno y su carácter dipolar.

La solubilidad depende de la capacidad de un solvente de interactuar con un soluto con más fuerza que lo que las partículas de soluto interactúan entre sí, el agua disuelve más tipos diferentes de solutos que cualquier otro solvente. El carácter polar del agua la hace un disolvente excelente para moléculas polares y iónicas (hidrofílicas), las sustancias no polares (hidrofóbicas) son prácticamente insolubles en agua, pero solubles en disolventes no polares.

Las atracciones electrostáticas entre los dipolos de las moléculas de agua son fundamentales para las propiedades del agua en sí y para su papel como disolvente. Las moléculas de agua vecinas tienden a orientarse de manera que el hidrógeno de una molécula (el extremo positivo) apunte hacia uno de los pares de electrones del oxígeno de otra molécula de agua (el extremo negativo). La asociación intermolecular direccional resultante se conoce como puente (enlace) de hidrógeno.

Una sustancia con el peso molecular del agua debería existir en forma gaseosa a temperatura ambiente, y tener un punto de fusión de  $-100^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo es líquida a temperatura ambiente y funde a  $0^{\circ}\text{C}$ . La formación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua, resulta en propiedades térmicas poco comunes como alto calor específico y alto calor de vaporización. El agua absorbe grandes cantidades de calor que utiliza en romper los puentes de hidrógeno. Su temperatura desciende más lentamente que la de otros líquidos a medida que va liberando energía al enfriarse. Esta propiedad permite que el citoplasma acuoso sirva de protección para las moléculas orgánicas en los cambios bruscos de temperatura. El agua tiene el calor específico más alto de todas las sustancias excepto el amoníaco líquido. Cuando se eleva la temperatura del agua, las moléculas deben vibrar más rápido, así, para romper los puentes de hidrógeno

entre las moléculas de agua debe suministrarse gran cantidad de energía al sistema.

La evaporación del agua requiere una cantidad de energía excepcional para una molécula de su tamaño, por consiguiente, tanto el calor de evaporación como el punto de ebullición del agua son excepcionalmente elevados. Debido al alto calor de vaporización, la evaporación que ocurre durante la transpiración, tiene un notable efecto enfriador y la condensación tiene efecto de calentamiento.

## **MATERIAL POR EQUIPO**

- 1 Plato desechable
- 2 Aplicadores de madera
- 1 Globo mediano
- Un cuarto de hoja de papel tamaño carta
- 1 Soporte universal
- 1 Anillo
- 1 Rejilla de asbesto
- 1 Mechero

## **MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO**

- 1 Frasco de pimienta negra molida
- 1 Jabón en pasta

### **EXPERIMENTO No. 1 EL AGUA Y LA PIMIENTA**

#### **PROCEDIMIENTO:**

1. Agregar al plato un poco de agua de la llave.
2. Agregar al agua del plato un poco de pimienta negra molida, hasta que se cubra ligeramente la superficie del líquido.
3. Tocar con un aplicador de madera la superficie del líquido, hacer observaciones.
4. Ahora tocar la superficie del líquido, con un aplicador de madera que tiene un poco de jabón en pasta en el extremo, hacer observaciones.

### **EXPERIMENTO No. 2 EL AGUA Y EL GLOBO**

#### **PROCEDIMIENTO:**

1. Inflar el globo.
2. Abrir la llave del agua, hasta que se forme un fino chorrillo.

3. Acercar el globo al chorrillo de agua (sin mojarlo), hacer observaciones.
4. Frotar el globo sobre el cabello de algún compañero de equipo y acercarlo nuevamente al chorrillo de agua (sin mojarlo), hacer observaciones.

### **EXPERIMENTO No. 3 EL AGUA Y LA CHAROLA DE PAPEL**

#### **PROCEDIMIENTO:**

1. Con la hoja de papel, elaborar una charola **pequeña**, asegúrate de que no se deshaga.
2. Colocar la charola sobre la rejilla de asbesto y agregarle un poco de agua de la llave hasta tener aproximadamente 0.5 cm de profundidad.
3. Colocar la rejilla de asbesto con la charola en el anillo del soporte universal y calentar con flama baja.
4. Hacer observaciones conforme transcurre el tiempo.

#### **CUESTIONARIO:**

1. Explique con sus propias palabras el término “Tensión Superficial”.
2. ¿Qué tipo de compuesto es el jabón?
3. ¿Qué es un tenso activo?
4. ¿Por qué compuestos está formada la pimienta y cuáles son sus características químicas? ¿Cuál es el papel que desempeña en la práctica?
5. Explica por qué la molécula de agua presenta cargas parciales positivas y negativas.
6. Diga cuál es el porcentaje de agua intracelular y extracelular y como está distribuida.
7. Diga que significa el término “Calor Específico del agua”.
8. Explique en base a cuales de sus propiedades el agua funciona como un termorregulador y cómo actúan estas en dicha función.
9. Explique por qué un paciente con fiebre presenta sed.

**PRÁCTICA 2****ÓSMOSIS**

**Objetivo.** El alumno demostrará el transporte de sustancias a través de membranas y comprenderá el concepto de la ósmosis.

**INTRODUCCIÓN**

Células, tejidos y órganos, están separados entre sí y del medio externo por membranas. Cada célula tiene una membrana, y cada organelo tiene su propia membrana.

Los alimentos, productos de desecho, sales, agua y gases están en movimiento continuo entrando y saliendo de las células a través de las membranas. Todos estos movimientos de transporte que suceden continuamente en las células, tienen diferentes mecanismos de transporte, dependiendo de la naturaleza de las sustancias, concentración, solubilidad, etc. Entre estos mecanismos se encuentra uno muy importante que es la ósmosis.

La **ósmosis** es un fenómeno en el que se produce el paso o difusión de un solvente a través de una membrana semipermeable, la cual permite el paso del solvente pero no del soluto, desde una solución con menor concentración de soluto a otra con mayor concentración de soluto. Es un fenómeno físico-químico relacionado con el comportamiento del agua ante una membrana semipermeable para el solvente (agua) pero no para los solutos. Tal comportamiento entraña una difusión simple del agua a través de la membrana, sin "gasto de energía". La ósmosis es un fenómeno biológico importante para la fisiología celular de los seres vivos, ya que el solvente del organismo es el agua.

La capacidad que tiene el agua de atravesar la membrana plasmática, que se comporta como una membrana semipermeable, depende de la diferencia de concentración entre los líquidos extracelular e intracelular y viene determinada por la presencia de sales minerales y moléculas orgánicas disueltas.

Los medios acuosos separados por membranas semipermeables pueden tener diferentes concentraciones, y se denominan:

- **Hipertónicos**, los que tienen una elevada concentración de solutos con respecto a otros en los que la concentración es inferior.

- **Hipotónicos**, los que contienen una concentración de solutos baja con respecto a otros que la tienen superior.

Las moléculas de agua difunden desde los medios hipotónicos hacia los hipertónicos provocando un aumento de la presión sobre la cara de la membrana del compartimento hipotónico, denominada **presión osmótica**. Como consecuencia del proceso osmótico se puede alcanzar el equilibrio, igualándose las concentraciones, y entonces los medios serán **isotónicos**, es decir que tienen la misma concentración.

## MATERIAL POR EQUIPO

- 4 Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 Aguja de Vacutainer
- 1 Adaptador para Vacutainer
- 1 Ligadura
- 1 Tubo Vacutainer con anticoagulante (tapón lila)
- 2 Portaobjetos
- 4 Cubreobjetos
- 4 Pipetas de 2 ml
- 4 Pipetas Pasteur con bulbo
- 1 Gradilla para tubos de ensaye
- 1 Microscopio
- 2 Vasos de precipitado de 250 ml

## MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 1 Cuchillo
- 1 Charola de disección

## REACTIVOS

Soluciones de NaCl al 2%, al 0.9% y al 0.5%.  
Torundas con alcohol  
Agua destilada  
Solución saturada de Cloruro de sodio (NaCl)

## MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre humana
- 1 papa

## EXPERIMENTO No. 1 ÓSMOSIS EN CÉLULAS ANIMALES

### PROCEDIMIENTO:

1. Coloca una ligadura en el brazo y realiza limpieza con la torunda con alcohol en un solo sentido en la región de flexión de la articulación del codo.
2. Procede a extraer sangre por punción venosa colocando la aguja con el bisel hacia arriba en un ángulo de menos de  $45^\circ$  con respecto a la vena; extraer la sangre (un total de 3 ml), retira la ligadura, saca el tubo y mézclalo por inversión 3 veces, saca la aguja presionando el sitio de punción para hacer hemostasia.
4. Numera tubos de ensaye en una gradilla y agregue 2 ml de la solución que se indica:

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
NaCl al 2.0%	NaCl al 0.9%	NaCl al 0.5%	H <sub>2</sub> O Destilada

5. Agrega 4 gotas de sangre en cada tubo y mezcla suavemente hasta tener una suspensión uniforme.
6. Deja reposar entre 15-20 minutos. Sostén los tubos contra una hoja blanca para observar si hay transparencia.
7. Pasado el tiempo, mezcla suavemente, con la pipeta Pasteur coloca una gota de cada solución en un portaobjetos; cubre con el cubreobjetos y examina las preparaciones con el objetivo seco fuerte del microscopio.
8. Observa y describe lo que sucede en cada tubo relacionado al fenómeno osmótico.

## EXPERIMENTO No. 2

## ÓSMOSIS EN CÉLULAS VEGETALES

### PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 250 ml (vaso testigo).
2. En otro vaso de precipitados colocar 100 ml de una solución sobresaturada de NaCl.
3. En ambos vasos colocar una rebanada de papa de 1 cm de grosor, como en la figura 1.
4. Dejar reposar ambos vasos durante 30 minutos.

5. Después de 30 minutos se sacan las rebanadas de papa con los dedos y se prueba su dureza o turgencia, tratando de doblarlas y ver qué tan flexibles son, escribe las observaciones.

**CUESTIONARIO:**

1. Define ósmosis.
2. ¿Qué factores alteran el grado de ósmosis y en qué dirección?
3. Da dos ejemplos de casos médicos en los que se presenta este fenómeno y explica cómo se lleva a cabo.
4. Investiga y explica lo que significa el término “coma hiperosmolar” en el organismo humano.
5. Define solución isotónica, solución hipotónica y solución hipertónica.
6. Define lisis, plasmólisis y turgencia.

**PRÁCTICA 3****SOLUCIONES REGULADORAS**

**Objetivo.** El alumno analizará los mecanismos amortiguadores de ciertas sustancias y comparará el pH de diferentes líquidos.

**INTRODUCCIÓN**

Debido a que las propiedades de numerosas moléculas biológicas varían con el pH, es importante que el pH de los sistemas vivos se conserve dentro de ciertos límites estrechos. Para mantener el pH adecuado el cuerpo cuenta con sistemas amortiguadores o soluciones reguladoras o buffer.

Las soluciones reguladoras están formadas por un ácido débil (dador de protones) y su base conjugada (que acepta protones). Estas soluciones pueden resistir un cambio de pH cuando se les añade un ácido o base fuerte (bajo ciertos límites).

La eficacia y capacidad de un sistema amortiguador depende de la relación entre las concentraciones de la base conjugada (o sal) y el ácido débil, como se indica en la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]}$$

En esta ecuación se expresa la relación entre el pH de la forma ácida del par amortiguador (representa el punto medio entre los límites extremos del efecto amortiguador) y la concentración de cada miembro del par amortiguador. El pK es diferente para cada solución amortiguadora y se determina midiendo el pH de una solución que contenga concentraciones iguales de los dos componentes que constituyen el par amortiguador, por ejemplo:

$$\text{Si } [\text{sal}] = [\text{ácido}] \quad \text{entonces: } \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]} = 1$$

Como el logaritmo de 1 es igual a cero, entonces el  $\text{pK} = \text{pH}$  (del sistema amortiguador).

**MATERIAL POR EQUIPO**

- 1 Bureta de 25 ml
- 1 Pinza para bureta



- 1 Soporte universal
- 1 Probeta de 50 ml
- 1 Vaso de precipitado de 250 ml
- 1 Vaso de precipitado de 50 ml
- 5 Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
- 1 Gradilla
- 5 Pipetas de 5 ml
- 1 Potenciómetro
- 1 Agitador magnético

## REACTIVOS

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M
- NaOH 0.1 M
- Tiras reactivas de pH Merck
- Torundas de algodón en alcohol
- Solución reguladora a pH de 7.0 (sin colorante)
- Leche
- Refresco de cola
- Jugo natural o comercial
- Melox
- Agua destilada

### EXPERIMENTO No. 1 TITULACIÓN DEL FOSFATO MONOSÓDICO

#### PROCEDIMIENTO:

- 1.- En un vaso de precipitados de 250 ml, colocar 50 ml de la solución de monofosfato de sodio 0.1 M, introducir los electrodos del potenciómetro y medir su pH.
- 2.- En agitación constante agregar lentamente solución de hidróxido de sodio 0.1 M mediante una bureta y anotar los cambios de pH después de la adición de cada 2 ml. Añadir hidróxido de sodio hasta que el pH llegue a 11.
- 3.- Con los resultados obtenidos elaborar una gráfica en papel milimétrico (pH vs ml de hidróxido de sodio 0.1 M gastados) y observar si hay una zona de amortiguación e indicarla en su gráfica.

### EXPERIMENTO No. 2 MEDICIÓN DEL pH EN DIFERENTES SOLUCIONES

#### PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 3 ml de cada una de las sustancias: leche, refresco de cola, jugo, melox y agua en tubos de ensaye.

2. Sumergir una tira reactiva de pH durante 10 segundos en cada uno de los tubos anteriores.
3. Retirar el exceso de líquido sacudiendo ligeramente la tira reactiva o secando con papel.
4. Comparar el color obtenido con la gama de colores que indica el pH obtenido.
5. Elaborar una tabla con los resultados obtenidos.
6. Investigar que compuesto(s) probable(s) establece el pH en cada una de las sustancias probadas.

### **CUESTIONARIO:**

1. Defina qué es un amortiguador y cómo funciona.
2. Diga cómo se encuentran las concentraciones de los componentes de un amortiguador cuando se encuentran a un pH que es igual a su pK.
3. Escribe la reacción que se lleva a cabo entre el monofosfato de sodio y el hidróxido de sodio.
4. Explica por qué se forma una solución amortiguadora durante la titulación del monofosfato de sodio con el hidróxido de sodio.
5. Mencione los principales amortiguadores del organismo humano, de que compuestos está constituido cada uno.

**PRÁCTICA 4****REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO**

**Objetivo.** El alumno observará los mecanismos regulatorios del equilibrio ácido base que llevan a cabo el pulmón y el riñón ante condiciones que tienden a alterarlo.

**INTRODUCCIÓN**

El equilibrio ácido base estudia los mecanismos que mantienen los valores de los iones hidrógeno de los líquidos corporales dentro de los límites normales. La concentración de iones  $H^+$  libres en sangre se mantiene normalmente entre 40 y 45 nmol/litro, lo cual da un valor de pH sanguíneo comprendido entre 7.35 y 7.45, valor medio de referencia 7.4. El organismo produce continuamente ácidos no volátiles y  $CO_2$  como consecuencia del metabolismo, estas moléculas generadoras de  $H^+$  modificarán la concentración de estos iones y el valor del pH. La regulación se realiza en dos etapas:

1. Los iones  $H^+$  son amortiguados o neutralizados por otras moléculas.
2. Posteriormente son eliminados del organismo.

La concentración de  $CO_2$  producido en el metabolismo celular, va a incrementarse durante el ejercicio intenso. Este gas se une con el agua presente en los capilares tisulares formando ácido carbónico, reacción que es catalizada por la enzima anhidrasa carbónica presente en los eritrocitos. El aumento de acidez en sangre se regula gracias a que esta misma enzima cataliza la reacción de forma reversible en los capilares pulmonares formando  $H_2O + CO_2$  y este último sale al exterior con la respiración.

La concentración de bicarbonato en la sangre, es regulada por el riñón y en condiciones normales se mantiene en 25 meq/l. Si los túbulos renales aumentan la excreción de bicarbonato, la orina se vuelve alcalina, y la relación bicarbonato/ácido carbónico se torna menor de 20, disminuyendo el pH de la sangre.

**MATERIAL POR EQUIPO**

- 4 Vasos desechables de 250 ml
- 10 Tiras reactivar para pH Merck

## EXPERIMENTO 1. PARTICIPACIÓN DEL APARATO RESPIRATORIO Y EL RENAL EN EL CONTROL DEL pH DEL ORGANISMO HUMANO.

### PROCEDIMIENTO:

- a) Un alumno de cada equipo desayunará o comerá normalmente evitando la ingestión de jugos ácidos.
- b) Una hora antes de la práctica, tomará 500 ml de agua y durante este tiempo puede orinar pero desechará la orina.
- c) Al iniciar la práctica, deberá ingerir otros 500 ml de agua y acudirá al baño para depositar orina en un vaso desechable de 250 ml, determinar el pH de la orina con tira reactiva.
- d) Después de orinar el alumno volverá a ingerir otros 500 ml de agua y en seguida realizará un ejercicio muscular intenso; puede subir y bajar escaleras o trotar durante 15 minutos.
- e) Al término del tiempo del ejercicio, volverá a orinar y le medirá nuevamente su pH.
- f) A partir de este momento el alumno **ya no podrá ingerir agua** y se recolectarán muestras de orina cada 15 minutos hasta obtener un total de 5. Determinar el pH de cada muestra.

## EXPERIMENTO 2.

### PARTICIPACIÓN DEL RIÑÓN EN EL MANTENIMIENTO DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE.

#### PROCEDIMIENTO:

- a) Un alumno de cada equipo desayunará o comerá normalmente evitando la ingestión de jugos ácidos.
- b) Una hora antes de la práctica, tomará 500 ml de agua y durante este tiempo puede orinar pero desechará la orina.
- c) Al iniciar la práctica, deberá ingerir otros 500 ml de agua y acudirá al baño para depositar orina en un vaso desechable de 250 ml, determinar el pH de la orina con tira reactiva.
- d) Después de orinar, este alumno ingerirá 250 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 3%. A partir de este momento se recolectarán muestras de orina cada 15 minutos hasta completar un total de 5 y se les medirá su pH. **Ya no se debe ingerir agua de aquí en adelante hasta terminar la prueba.**
- e) Con los resultados obtenidos, realizar una gráfica de pH contra tiempo, interpretar los resultados y discutirlos en el grupo.

**CUESTIONARIO:**

1. ¿Cuáles son los sistemas amortiguadores del organismo?
2. ¿Cuál de los sistemas mencionados es el que actúa en la práctica?
3. Explica los mecanismos de compensación pulmonar y renal.
4. ¿Qué tipo de alteración ácido base se presenta en el primer experimento y como la compensa el organismo?
5. ¿Qué tipo de alteración ácido base se presenta en el segundo experimento y como la compensa el organismo?
6. ¿Por qué es importante que se mantenga constante, dentro de ciertos límites, el pH sanguíneo?
7. Mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach, determine el pH sanguíneo de un individuo cuya concentración de bicarbonato fue de 33.9 meq/l y su  $p\text{CO}_2$  de 70 Torr.

**PRÁCTICA 5****PROTEÍNAS**

**Objetivo.** El alumno identificará la presencia de proteínas en algunos alimentos y determinará el efecto de algunas sustancias sobre su estructura.

**INTRODUCCIÓN**

Las proteínas son polímeros de alto peso molecular, compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, que cuando se solubilizan son de dimensiones coloidales. Presentan propiedades físicas y químicas que dependen directamente de factores intrínsecos del propio polímero, como son su estructura y composición de aminoácidos, o bien por factores extrínsecos como el pH, temperatura, sales, etc. Las proteínas son moléculas relativamente frágiles, que conservan su actividad biológica solamente en un intervalo relativamente limitado de pH y de temperatura.

Existen varios métodos para la identificación, caracterización y cuantificación de las proteínas, pero la mayoría tiene como principio alguna reacción química característica de los grupos R de los diferentes aminoácidos. Entre las técnicas de identificación se encuentran las basadas en reacciones de color, cuyo principio se explica de la siguiente manera: de los aminoácidos presentes en todas las proteínas, algunos reaccionarán con cierto reactivo para dar productos con colores característicos. Tales reacciones de color son usadas convenientemente para determinar la presencia de proteínas o bien para determinar la presencia o ausencia de aminoácidos específicos en la molécula proteica. Puede decirse que las proteínas reflejan las propiedades químicas de los residuos de aminoácidos que contienen, por lo que la mayoría de las reacciones coloridas de identificación dependen de la existencia de un aminoácido específico en ellas.

La **reacción xantoproteica** es un método que se puede utilizar para determinar la presencia de proteína en una solución, empleando ácido nítrico concentrado. La prueba da resultado positivo en aquellas proteínas con aminoácidos portadores de grupos aromáticos, especialmente en presencia de tirosina. Una vez realizada la prueba se neutraliza con un álcali virando a un color amarillo oscuro.

**Desnaturalización de las proteínas.** Cuando las proteínas se exponen a valores extremos de temperatura o pH, o a algunas sustancias que afectan sus propiedades de plegamiento, se dice que sufren desnaturalización. En general las propiedades biológicas de una proteína se pierden cuando se desnaturaliza. Los enlaces peptídicos no suelen resultar afectados cuando las proteínas se desnaturalizan y la secuencia de aminoácidos en el polipéptido (estructura

primaria) permanece por tanto inalterada. Sin embargo, la desnaturalización ocasiona un desplegamiento en la cadena polipeptídica al destruirse la estructura de orden superior de la molécula, en particular los enlaces de hidrógeno. El polipéptido desnaturalizado retiene su estructura primaria porque aquella está mantenida por enlaces covalentes. Dependiendo de las condiciones de desnaturalización, el polipéptido puede volver a plegarse una vez suprimido el agente desnaturalizante. Sin embargo, el hecho de que la desnaturalización conlleve generalmente a la pérdida de la actividad biológica de la proteína, demuestra claramente que la actividad biológica no puede asociarse a la estructura primaria de las proteínas, sino que es el resultado del plegamiento preciso de la molécula, eventualmente condicionado por la estructura primaria. El plegamiento de un polipéptido origina, por tanto, dos cosas: (1) el polipéptido logra una forma única que es compatible con una función biológica específica, y (2) el proceso de plegamiento confiere a la molécula su forma química más estable.

## **MATERIAL POR EQUIPO**

- 1 Gradilla.
- 1 Mechero.
- 1 Soporte universal con anillo.
- 1 Tela de asbesto.
- 2 Vasos de precipitados de 600 ml.
- 1 Pinza para tubo de ensayo.
- 11 Tubos de ensayo de 22 x 175 mm.
- 7 Pipetas de 1 ml.

## **REACTIVOS**

- 1 Huevo de gallina por cada 3 equipos.
- Solución de grenetina al 10%.
- Solución de almidón al 10%.
- Solución de sacarosa al 10%.
- Leche entera de vaca.
- Solución de ácido nítrico al 20%
- Hidróxido de amonio concentrado.
- Solución de ácido Clorhídrico 1M.
- Solución de hidróxido de sodio 1M.
- Solución de sulfato de cobre 0.1M.
- Solución de acetato de plomo 0.1M.
- Agua destilada.
- Hielo en cubos.

**EXPERIMENTO No. 1 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS****PROCEDIMIENTO:**

1. Marcar 5 tubos de ensayo, del número 1 al 5 respectivamente, agregar a cada tubo lo siguiente: 1ml de clara de huevo (albúmina) al primero, 1ml de leche al segundo, 1ml de solución de almidón al tercero, 1ml de solución de sacarosa al cuarto y 1ml de solución de gredina al quinto.
2. Agregar a cada tubo ocho gotas de ácido nítrico al 20%, agitar con cuidado.
3. Colocar los tubos en un vaso de precipitados con agua hirviendo durante 10 minutos.
4. Sacar los tubos del baño maría y colocarlos en un vaso de precipitados que contenga agua con hielo durante 5 minutos.
5. Sacar los tubos del agua con hielo y agregar a cada uno cinco gotas de hidróxido de amonio, mezclar y hacer observaciones.

**EXPERIMENTO No. 2 EFECTO DE LOS ÁCIDOS Y LAS BASES EN LAS PROTEÍNAS****PROCEDIMIENTO:**

1. Marcar tres tubos del uno al tres respectivamente.
2. Agregar 1ml de albúmina a cada uno.
3. Añadir al tubo número uno 1ml de agua destilada, al tubo número dos 20 gotas de solución de ácido clorhídrico 1M y, al tubo número tres 20 gotas de solución de hidróxido de sodio 1M.
4. Agitar cada tubo y hacer observaciones.

**EXPERIMENTO No. 3 EFECTO DE LOS METALES SOBRE LAS PROTEÍNAS****PROCEDIMIENTO:**

1. Marcar tres tubos del uno al tres respectivamente.
2. Agregar 1ml de albúmina a cada uno.
3. El tubo número uno es el testigo.
4. Añadir al tubo número dos, 4 gotas de solución de sulfato de cobre 0.1M, al tubo número tres, 4 gotas de solución de acetato de plomo 0.1M.
5. Agitar los tubos y hacer observaciones comparando con el tubo testigo.



## CUESTIONARIO:

1. Describe 2 reacciones coloridas para la identificación de proteínas **diferentes a la realizada en la práctica.**
2. ¿Cuál es la acción del ácido clorhídrico sobre las proteínas de la dieta en el estomago?
3. A qué se le llama estructura nativa de una proteína.
4. Explica claramente que le sucede a la estructura de una proteína cuando se desnaturaliza y cuál es la consecuencia de esto.
5. ¿Qué efectos tienen los metales pesados en nuestro organismo?

## PRÁCTICA 6

## ANHIDRASA CARBÓNICA

**Objetivo.** El alumno constatará la modificación en la velocidad de una reacción ante la presencia de una enzima.

## INTRODUCCIÓN

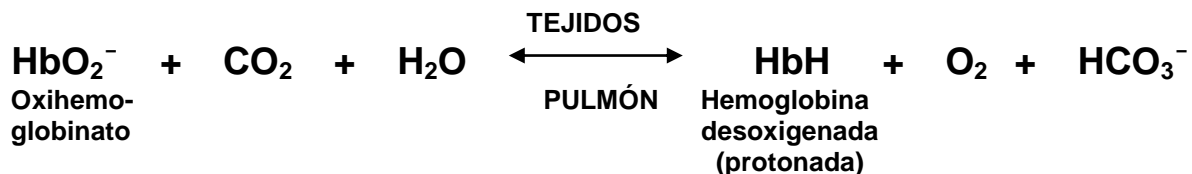
El  $\text{CO}_2$  es un material de desecho proveniente del metabolismo de los tejidos, este gas es mucho más soluble que el  $\text{O}_2$ , por esta razón difunde con facilidad en los medios acuosos y a través de las membranas, en consecuencia, basta una pequeña diferencia de presión parcial ( $\text{pCO}_2$ ) para producir un flujo neto de  $\text{CO}_2$  en cualquier sentido, por eso solo el 6% del  $\text{CO}_2$  presente en la sangre se encuentra disuelto como tal, ya que la enzima **anhidrasa carbónica** contenida en los eritrocitos, cataliza en ambos sentidos la reacción:



El  $\text{CO}_2$  se une a la sangre en los tejidos porque la hemoglobina desoxigenada actúa como un ácido muy débil y además tiene gran afinidad por el  $\text{CO}_2$ , capta hidrogeniones del medio y de este modo favorece la disociación del  $\text{H}_2\text{CO}_3$ :



El ión bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) formado en el interior del eritrocito difunde al plasma, de modo que se transporta por ambos medios: 2/3 por el plasma y 1/3 por los eritrocitos, así la sangre transporta  $\text{CO}_2$  en forma de carbaminohemoglobina y en forma de bicarbonato, **lo contrario ocurre en el pulmón**. La abundancia de  $\text{O}_2$  favorece la formación de oxihemoglobina y al actuar esta como un ácido fuerte, cede  $\text{H}^+$  al  $\text{HCO}_3^-$ , que se convierte en  $\text{H}_2\text{CO}_3$  y se elimina en forma de  $\text{CO}_2$  por acción de la anhidrasa carbónica, las reacciones acopladas son:



## MATERIAL POR EQUIPO

- 3 Tubos de ensayo de 25 x 200 mm.
- 3 Pipetas de 5 ml.
- 1 Probeta de 20 ml.
- 1 Cronómetro.

## MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Tubos Vacutainer (tapón lila)
- 2 Agujas para Vacutainer
- 1 Soporte para aguja de Vacutainer
- 1 Ligadura
- 1 Matraz Erlenmeyer de 50 ml
- 2 Pipetas de 1 ml

## REACTIVOS

- Azul de bromotimol al 0.01% en agua de la llave.
- Solución salina al 0.9 %.
- Torundas en alcohol.
- Agua destilada.
- Hielo.

## MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre humana.

## PROCEDIMIENTO:

El profesor preparará en el matríz Erlenmeyer una mezcla a partes iguales de sangre y solución salina suficiente para todos los equipos.

1. Marcar cada equipo sus tubos con las letras **A**, **B** y **C** respectivamente.
2. Agregar a cada uno de los tubos 15 ml de agua destilada a pH neutro (medidos con la probeta) y 1 ml de azul de bromotimol (indicador).
3. A los tubos **A** y **B** agregar 0.1 ml de mezcla de sangre-solución salina, agitar los tubos hasta tener una mezcla de color uniforme.
4. Introducir todos los tubos en un vaso con hielo y agua durante 10 min.
5. Sacar el tubo **A** del agua con hielo e introducir hasta el fondo del tubo una pipeta de 5 ml, soplar en forma lenta y constante dentro de la solución del tubo al mismo tiempo que inicia el conteo del tiempo en el cronómetro; al observar el cambio de color en la solución, detener el cronómetro y anotar el tiempo transcurrido.
6. Repetir lo anterior con el tubo **B**.

**Nota: La persona que le soplo al tubo anterior debe soplarle a los otros dos tubos.**

7. Con los resultados de los tubos **A** y **B** obtener un promedio y ese será el resultado de su experimento en presencia de enzima.
8. Sacar el tubo **C** del agua con hielo, introducir hasta el fondo del tubo una pipeta de 5 ml y soplar hasta el cambio de color de la solución, midiendo el tiempo en que ocurre esto, este será el resultado del experimento sin enzima.
9. Hacer las conclusiones con respecto a la actividad enzimática del experimento.

### **CUESTIONARIO:**

1. ¿Cuál es la función de las enzimas?
2. Explica el mecanismo por el cual las enzimas aceleran las reacciones.
3. ¿Cómo está formado el sitio activo de una enzima?
4. ¿Cuál es la función de las coenzimas?
5. ¿Qué es el  $K_m$  y que significa?

**PRÁCTICA 7****INHIBIDORES ENZIMÁTICOS**

**Objetivo.** El alumno observará el efecto de los inhibidores en las reacciones enzimáticas para comprender su importancia en los procesos metabólicos.

**INTRODUCCIÓN**

La inhibición de la actividad enzimática por moléculas específicas es importante porque constituye el principal mecanismo de control de los sistemas biológicos.

A todos aquellos agentes que son capaces de interrumpir o retardar la actividad enzimática se les llama inhibidores. La inhibición puede ser:

- Reversible. Puede ser de tres tipos: competitiva, no competitiva y acompetitiva.
- Irreversible.

**Inhibición competitiva.** El inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo, cuando se aumenta la concentración de sustrato el inhibidor puede ser desplazado ya que la unión entre enzima e inhibidor es reversible. El inhibidor competitivo presenta cierto parecido estructural con el sustrato, de modo que se puede unir a la enzima en el sitio activo, un ejemplo de inhibidor competitivo es el ácido malónico, el cual tiene un parecido estructural con el ácido succínico que es el sustrato de la enzima succinato deshidrogenasa. La succinato deshidrogenasa es una enzima que se encuentra asociada a la membrana interna de la mitocondria, esta remueve 2 protones y 2 electrones del succinato para dar origen al fumarato, oxidación asociada a la coenzima FAD.

**Inhibición irreversible.** Este tipo de inhibidores se unen por medio de enlaces covalentes a los grupos funcionales de la enzima, modificando la estructura de la enzima de tal manera que el sitio activo queda bloqueado impidiendo la unión del sustrato. Este tipo de inhibición es inespecífica, ya que un mismo inhibidor puede afectar a diversos sistemas enzimáticos.

La citocromo oxidasa es sensible a la presencia de cianuro, azida y monóxido de carbono, los cuales inhiben irreversiblemente este complejo enzimático y se interrumpe el transporte de electrones produciéndose una cianosis celular.

## MATERIAL POR EQUIPO

- 3 Tubos de 13 X 100 mm.
- 7 Tubos de 16 X 150 mm.
- 1 Gradilla.
- 1 Pipeta de 5 ml.
- 1 Pipeta Pasteur con bulbo.
- 1 Mortero con pistilo
- 1 Probeta de 50 ml
- 1 Vaso de precipitado de 50ml.
- 1 Embudo
- 1 Gasa de 20 X 20 cm

## MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Balanzas granatarias.
- 1 Baño maría a 37°C.
- 1 Centrifuga.

## REACTIVOS

- Arena de cuarzo.
- Aceite mineral
- Corazones de pollo fresco.
- Solución de malonato de sodio al 1%.
- Solución de parafenilendiamina al 1%.
- Solución de fosfato disódico al 0.06%.
- Solución de azul de metileno al 0.01%.
- Solución de succinato de sodio al 1.5%.
- Solución de cianuro de sodio al 0.01%.

## I. OBTENCIÓN DE ENZIMAS.

### PROCEDIMIENTO:

- a) Pesar aproximadamente 4 gramos de corazón de pollo.
- b) Moler lo anterior en un mortero con un poco de arena de cuarzo y 24 ml de fosfato disódico.
- c) Dejar reposar la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- d) Colocar la gasa en el embudo y filtrar el contenido del mortero sobre el vaso de precipitado de 100 ml.
- e) Llenar 2 tubos de 13 X100 mm con la solución obtenida en el paso anterior.
- f) Centrifugar a 3000 r.p.m., durante 3 minutos.
- g) Con la pipeta Pasteur, separar el sobrenadante y colocarlo en un tubo de 13 X 100 mm.

**Nota:** El líquido obtenido es la fuente de enzimas, contiene a la **deshidrogenasa succínica** y a la **citocromo oxidasa**.

## II. EFECTO DE LOS INHIBIDORES.

### EXPERIMENTO No. 1. DESHIDROGENASA SUCCÍNICA.

#### PROCEDIMIENTO:

a) Preparar 3 tubos como se indica en la siguiente tabla:

Tubo	Enzima ml	Succinato ml	Malonato ml	Agua ml	Azul de metileno ml
1	2.0	0.5	–	1.0	1.0
2	2.0	0.5	1.0	–	1.0
3	–	0.5	–	3.0	1.0

b) Agitar los tubos, observar la coloración y añadir a cada uno 1 ml de aceite mineral, no mezclar.

c) Incubar los tubos en el baño maría a 37 °C durante 15 minutos.

d) Sacar los tubos del baño maría, observar la coloración e interpretar.

e) Agitar el tubo número 1, observar la coloración e interpretar.

### EXPERIMENTO No. 2. CITOCROMO OXIDASA.

#### PROCEDIMIENTO:

#### PRECAUCIÓN:

**LA SOLUCIÓN DE CIANURO ES UN VENENO MUY ACTIVO, SU INGESTIÓN PUEDE CAUSAR LA MUERTE, SEGUIR LAS INSTRUCCIONES DEL PROFESOR.**

a) Preparar tres tubos como se indica en la siguiente tabla:

Tubo	Enzima ml	Cianuro de sodio ml	Agua ml	Parafenilendiamina ml
1	1.0	–	1.0	1.0
2	1.0	1.0	–	1.0
3	–	–	2.0	1.0

- b) Observar la coloración de los tubos, agitarlos e incubarlos en el baño maría a 37 °C durante 6 minutos.
- c) Sacar los tubos del baño maría, observar la coloración e interpretar ésta.

### **CUESTIONARIO:**

1. ¿Qué es un inhibidor enzimático?
2. ¿Cuántos tipos de inhibición enzimática hay y en qué consisten?
3. ¿Cuál es el papel que desempeñan los inhibidores enzimáticos en nuestro organismo?
4. De los inhibidores empleados en esta práctica, ¿cuál es competitivo y cual irreversible?
5. ¿Cuál es la función del aceite mineral en la práctica?
6. ¿Cuál es la función del azul de metileno en la práctica?
7. Escribe las reacciones que catalizan la deshidrogenasa succínica y la citocromo oxidasa.



## PRÁCTICA 8

## VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO)

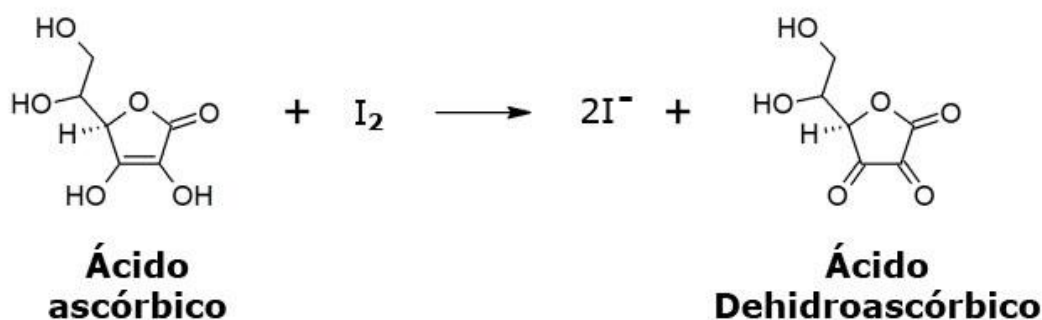
**Objetivo.** El alumno determinará la presencia del ácido ascórbico en diferentes alimentos.

## INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son sustancias orgánicas, de naturaleza y composición variada imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos. No aportan energía, ya que no se utilizan como combustible, pero sin ellas el organismo no es capaz de aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por la alimentación. Las vitaminas se deben ingerir en la dieta ya que el organismo humano no las puede sintetizar o lo hace en cantidades tan pequeñas que no son suficientes para la salud.

El *ácido ascórbico* conocido como vitamina C, se encuentra en las verduras y frutas frescas y su deficiencia ocasiona el escorbuto. Es un cofactor enzimático implicado en diversas reacciones fisiológicas (hidroxilación) tales como la síntesis de colágeno, metabolismo del hierro, transformación de la dopamina en noradrenalina y la biosíntesis de carnitina. Se oxida al contacto con el aire perdiendo su función de antioxidante y vitamínica. Es un fuerte agente reductor y en su oxidación cede dos átomos de hidrógeno para transformarse en *ácido dehidroascórbico*, que también tiene actividad de *Vitamina C*, la proporción de estas dos formas varía en el organismo aunque predomina la forma reducida. El ácido ascórbico está implicado en la síntesis del colágeno, la principal proteína estructural del tejido conjuntivo.

El método que se seguirá para la determinación del ácido ascórbico, se basa en la oxidación de éste por el yodo en un medio ácido y se convierte en ácido dehidroascórbico.



## MATERIAL POR EQUIPO

- 1 Gradilla
- 6 Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- 6 Pipetas de 5 ml
- 1 Pipeta Pasteur con bulbo
- 2 Probetas de 20 ml
- 1 Embudo
- 2 Gasas de 15 x 15 cm
- 2 Vaso de precipitados de 100 ml

## MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 1 Mortero con pistilo
- 1 Matraz aforado de 100 ml

## REACTIVOS

- Agua destilada
- Solución de Almidón al 10%
- Solución de lugol al 20%
- Una tableta de vitamina C (no efervescente) de 500 mg
- Jugo de naranja o toronja natural
- Un jugo comercial de naranja u otro que contenga vitamina C

**Solución de vitamina C.** En un mortero triturar la tableta de vitamina C, vaciar en un vaso de precipitados de 100 ml disolver agregando porciones de agua destilada, una vez disuelto pasar el contenido a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con agua destilada.

**NOTA:** La solución se prepara por el profesor para ser utilizada por todo el grupo.

## PROCEDIMIENTO:

1. En una probeta de 20 ml colocar el embudo con una gasa y colar el jugo de una naranja.
2. Prepara la siguiente serie de tubos para proceder a la determinación de la vitamina:

	Tubo					
	1	2	3	4	5	6
<b>Solución de almidón al 10% (ml)</b>	4		2	2	2	2
<b>Solución de vitamina C (ml)</b>		4	2			
<b>Jugo de naranja recién obtenido (ml)</b>				2		
<b>Jugo de naranja obtenido 24 hrs antes (ml)</b>					2	
<b>Jugo comercial (ml)</b>						2

3. Agregar a cada tubo gota a gota solución de lugol al 20% hasta que cambie de color.
4. En base a los resultados obtenidos determinar de manera cualitativa la cantidad de vitamina C presente en los jugos probados, con respecto a la concentración de ella en el comprimido.

### CUESTIONARIO:

1. Escribe las reacciones en las que interviene el ácido ascórbico en nuestro organismo.
2. Describa las manifestaciones clínicas del escorbuto.
3. ¿Cuál es el papel del almidón en la práctica?
4. ¿Por qué sustancias está formada la solución de lugol?
5. Si exprimimos una naranja y guardamos el zumo para tomarlo al día siguiente, ¿habrá perdido gran parte de la vitamina que contiene? ¿Por qué?
6. Puesto que las vitaminas son beneficiosas para el organismo, ¿es conveniente tomar comprimidos vitamínicos en abundancia? ¿Sí o no y por qué?

**PRÁCTICA 9****OBTENCIÓN DE ADN**

**Objetivo.** El alumno obtendrá ADN a partir de un tejido vegetal.

**INTRODUCCIÓN**

El ácido nucleico ADN es una doble cadena de un polímero de nucleótidos con desoxirribosa. Su función es la de guardar la información genética que constituye a un organismo. Este ADN cuyas cargas externas son negativas, se encuentra asociado a proteínas básicas las histonas (cargadas positivamente a pH fisiológico), esto le confiere estabilidad al ADN y permite su empaquetamiento en el núcleo de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. El empaquetamiento da lugar a los cromosomas, constituyentes del genoma celular. El genoma humano está constituido por 46 cromosomas y contiene  $5 \times 10^6$  kpb (miles de pares de bases nitrogenadas) en su totalidad.

Según el tipo de células en estudio (en nuestro caso son eucariotas), el aislamiento del ADN 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 ADN. Por último hay que proteger el ADN de enzimas que pueden degradarlo y posteriormente aislarlo con alcohol.

**MATERIAL POR EQUIPO**

- 2 Varillas de vidrio
- 2 Vaso de precipitados de 150 ml
- 3 Probetas de 50 ml
- 1 Probetas de 20 ml
- 2 Tubos cónicos para centrifuga de 50 ml
- 2 Pipetas Pasteur con bulbo
- 1 Pipeta de 10 ml
- 1 Embudo
- 1 Trozo de gasa de 20 X 20 cm

**MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO**

- 1 Licuadora (refrigerar el vaso 24 hrs antes)
- Centrifuga clínica para tubos cónicos de 50 ml.

## REACTIVOS

Cloruro de sodio 5 M

Lauril sulfato sódico (SDS) al 20%

Alcohol etílico de 96° refrigerado a 4°C 24 horas antes.

Ácido etilendiaminotetraácetico (EDTA) al 0.5 M refrigerado a 4°C 24 horas antes.

500 ml agua destilada refrigerada a 4°C 24 horas antes.

## MATERIAL BIOLÓGICO

400 g de chicharos frescos

## PROCEDIMIENTO:

El profesor colocara los 400 g de chicharos en el vaso de la licuadora añadirá 500 ml de agua destilada fría y los molera.

1. Cada equipo tomara en una probeta 50 ml del licuado de chicharos.
2. Filtrar la preparación sobre la gasa doblada por la mitad, en un vaso de precipitados de 150 ml para separar los restos celulares.
3. Añadir a la solución obtenida 50 ml de EDTA 0.01 M, mezclar suavemente durante 5 min.
4. Vaciar la mezcla en 2 tubos cónicos para centrifuga de 50 ml. Centrifugar a 3000 rpm por 3 min. Descartar la mayor parte del sobrenadante, con una pipeta Pasteur, dejando una cantidad igual a la del precipitado.
5. Resuspender el precipitado en el sobrenadante que se dejó y transferirlo a una probeta de 20 ml para medirlo.
- 6.-Vaciar la solución anterior en un vaso de precipitados de 150 ml, agregar un volumen igual de NaCl 2 M, mezclar suavemente con ayuda de la varilla de vidrio durante 10 min.
7. Añadir a la suspensión anterior, 10 ml de SDS al 20%, mezclar suavemente con la varilla de vidrio durante 10 min.
8. A continuación retirar la varilla de vidrio y agregar lentamente y resbalando por las paredes del vaso 50 ml de alcohol de 96° frío. Se formaran dos capas y en la interface, se observara el ADN.
9. Introducir una varilla de vidrio limpia y seca, remover suavemente en una misma dirección. **Observar que sobre la varilla de vidrio se van adhiriendo unas fibras blancas visibles a simple vista, son el resultado de la agrupación de muchas fibras de ADN.**

## **CUESTIONARIO:**

- 1.- ¿En qué consisten las dos capas formadas en el vaso de precipitados en el punto 9?
- 2.- ¿Qué son y cuál es la función de las endonucleasas?
- 3.- ¿Cuál es la acción del EDTA, del cloruro de sodio y del SDS en la práctica?
- 4.- ¿Qué propiedad tiene el ADN que puede precipitar en presencia de alcohol?
- 5.- ¿Cuál es la longitud real del ADN y debido a que se puede replegar tanto como para caber en el núcleo de una célula?
- 6.- Mencione algún método que nos ayude a comprobar que las fibras obtenidas son efectivamente de ADN.

## BIBLIOGRAFÍA

- Devlin T.M. Bioquímica, Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas. 4ª. Edición. Barcelona, Editorial Reverté, 2004.
- Flores A. L. J., Sánchez E. S. y Uribe L. S. Bioquímica, manual de prácticas. Editorial McGraw-Hill, 2005.
- Ganong. Fisiología Médica. 23ª Edición. Edit. McGraw-Hill Lange. 2010.
- Hicks J.J., Bioquímica. 2ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. 2007.
- Lehninger L.A., Principios de Bioquímica, 5ª Edición. Ediciones Omega. 2007.
- Mathews, C. K.; Van Holde K. E.: Bioquímica. 4ª Edición. Editorial Pearson. 2013.
- McKee, Trudy. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 5ª Edición Editorial McGraw-Hill Education. 2013.
- Montgomery R Bioquímica, Casos y Texto. 6ª. Edición. Editorial Harcourt-Brace, 1999.
- Murray, R. K. y Col.: Harper Bioquímica ilustrada. 29ª Edición. Editorial McGraw-Hill Lange. 2013.
- Pacheco L.D., Bioquímica Médica. Editorial Limusa.2013.
- Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W.: Fundamentos de Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2006.

## ANEXO 1

### RELACIÓN DE REACTIVOS

REACTIVO	MARCA	No. CATALOGO
Aceite mineral frasco de 1 L	J.T.Baker	PI270501
Acetato de plomo trihidratado frasco de 100 gr	Fermont	PQ11791
Ácido clorhídrico frasco de 2.5 L	J.T. Baker	9535-05
Ácido etilendiaminotetraacético anhidro (EDTA) frasco de 1 Kg	Sigma Aldrich	SAEDS1000
Ácido nítrico frasco de 1 L	J.T. Baker	9621-02
Almidón frasco de 500 gr	J.T. Baker	4006-0
Arena de cuarzo (arena de sílice) bolsa de 3 Kg		
Azul de bromotimol frasco de 100 gr	Hycel	HY96300100
Azul de metileno cloruro indicador frasco de 25 gr	Hycel	HY103300025
Buffer de referencia pH 4 frasco de 1 L	Hycel	2206
Buffer de referencia pH 7 frasco de 1 L	Hycel	21231
Cianuro de sodio frasco de 500 gr	Sigma Aldrich	SA71431500
Cloruro de sodio frasco de 2.5 Kg	J.T. Baker	3624-05
Dodecil sulfato sódico (SDS) frasco de 500 gr	J.T. Baker	4095-04
Fosfato de sodio dibásico anhidro frasco de 500 gr	J.T. Baker	PI382801
Fosfato de sodio monobásico frasco de 500 mg	J.T. Baker	PI381801
Grenetina grado farmacéutico frasco de 500 gr	Hycel	136
Hidróxido de amonio frasco de 1 L	J.T. Baker	9721-02
Hidróxido de sodio frasco de 1 Kg	Merck	MM1064621000
Malonato de sodio frasco de 500 gr	Sigma Aldrich	M1875
Papel indicador pH 0-14 caja con 100	Merck	109535001
Parafenildiamina frasco de 100 gr	Sigma Aldrich	PG001
Pimienta negra en polvo	McCornick	
Sacarosa 100 gr	Hycel	HY2700100
Sodio succinato anhidro frasco de 500 gr	Panreac	143578.1210
Sulfato cúprico anhidro frasco de 100 gr	J.T. Baker	PI85050
Yodo lugol concentrado frasco de 500 ml	Hycel	267800500

<http://www.reactivosyequipos.com.mx/buscador>



## ANEXO 2

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos se deben preparar con agua destilada a pH de 7.0, si no es posible conseguirla se pueden preparar con agua Bonafont.

Las cantidades de reactivos que se proponen a continuación pueden variar, si aumenta (multiplicar) o si disminuyen (dividir) según lo solicitado; algunos de ellos pueden almacenarse durante un tiempo razonable (3 o 4 meses), a temperatura ambiente o en refrigeración.

- Es muy importante pesar o medir las cantidades de reactivos de manera exacta y siempre disolver en un recipiente de mayor volumen para tener la libertad de agitar el reactivo. Posteriormente se debe llevar a un matraz aforado adecuado para que las soluciones queden bien preparadas.

#### **Solución de NaCl al 2%**

Pesar 2 g de Cloruro de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada a pH de 7.0 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. **Puede guardarse en refrigeración por 30 días.**

#### **Solución de NaCl al 0.9%:**

Pesar 0.9 g de Cloruro de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada a pH de 7.0 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. **Puede guardarse en refrigeración por 30 días.**

#### **Solución de NaCl al 0.5%:**

Pesar 0.5 g de Cloruro de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada a pH de 7.0 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. **Puede guardarse en refrigeración por 30 días.**

#### **Solución saturada de NaCl**

En un matraz Erlenmeyer de 2 lt añadir un litro de agua destilada pH de 7 ir agregando cloruro de sodio y agitar, continuar agregando hasta que este ya no se disuelva. **Puede guardarse en refrigeración por 90 días.**

#### **Solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0.1 M**

Disolver 12 gr de fosfato de sodio monobásico en 1 lt de agua destilada pH de 7. **Puede guardarse en refrigeración por 30 días.**

#### **Solución de NaOH al 0.1 N**

Disolver 4 g de hidróxido de sodio en un vaso de precipitados de 250 ml con 80 ml de agua, agitar suavemente y con **cuidado ya que es un reactivo que puede quemar la piel.** Se deja enfriar y se pasa el contenido a un

matraz aforado de 1000 ml y se completa hasta la marca con el agua destilada. **Se puede conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente indefinidamente.**

#### **Solución de NaHCO<sub>3</sub> al 3%**

Disolver 3 gr de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Puede guardarse en refrigeración por 90 días.**

#### **Solución de grenetina al 10%**

Disolver en baño maría 10 gr de grenetina en 100 ml de agua destilada pH de 7, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Mantenerse a 37°C en la estufa bacteriológica. **Desecharse después de su uso.**

#### **Solución de almidón al 10%**

Disolver 10 gr de almidón en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Si no se utiliza el mismo día, guardar en refrigerador a 4°C, solamente por tres días.**

#### **Solución de sacarosa al 10%**

Disolver 10 gr de sacarosa en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Desecharse después de su uso.**

#### **Solución de HNO<sub>3</sub> al 20%**

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 80 ml de agua destilada pH de 7 añadir 20 ml de ácido nítrico lentamente. **Guardar en frasco ámbar con tapón de hule indefinidamente a temperatura ambiente.**

#### **Solución de HCl 1M**

En un matraz aforado de 1 lt con 300 ml de agua destilada pH de 7 añadir 83.5 ml de ácido clorhídrico lentamente y aforar hasta la marca. **Guardar en frasco ámbar con tapón de hule indefinidamente a temperatura ambiente.**

#### **Solución de NaOH 1M**

Disolver 40 g de hidróxido de sodio en un vaso de precipitados de 250 ml con 150 ml de agua, agitar suavemente y con **cuidado ya que es un reactivo que puede quemar la piel.** Se deja enfriar y se pasa el contenido a un matraz aforado de 1000 ml y se completa hasta la marca con el agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente indefinidamente.**

#### **Solución de CuSO<sub>4</sub> 0.1M**

Disolver 1.59 gr de sulfato cúprico anhidro en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente indefinidamente.**

**Solución de  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1M**

Disolver 3.79 gr de acetato de plomo trihidratado en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente indefinidamente.**

**Solución de azul de bromotimol al 0.01%**

Disolver 0.01 gr de azul de bromotimol en 100 ml de **agua de la llave. Se puede conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente durante 3 meses.**

**Solución de  $\text{Na}_2\text{H}_4\text{C}_4\text{O}_5$  al 1%**

Disolver 1 gr de malonato de sodio en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en refrigeración durante 3 meses.**

**Solución de parafenilendiamina al 1 %**

De acuerdo a la cantidad solicitada por grupo, pesar la parafenildiamina necesaria y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 125 ml forrado con papel aluminio. Aparte en otro matraz colocar el agua destilada pH de 7 necesaria para disolver el reactivo. **Desechar el sobrante.**

**Solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 0.06 %**

Disolver 0.06 gr de fosfato de sodio dibásico anhidro en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en refrigeración por 7 días.**

**Solución de azul de metileno al 0.01 %**

Disolver 0.01 gr de azul de metileno en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede guardar en frasco ámbar con tapón de hule a temperatura ambiente. Si se forma una natilla en la superficie se debe desechar.**

**Solución de  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$  1.5 %**

Disolver 1.5 gr de succinato de sodio en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en refrigeración por 7 días.**

**Solución de  $\text{NaCN}$  al 0.01 %**

Disolver 0.01 gr de cianuro de sodio en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Se puede guardar en frasco ámbar con tapón de hule a temperatura ambiente indefinidamente.**

**Solución de lugol al 10%**

En un matraz Erlenmeyer añadir 10 ml de yodo lugol concentrado y agregar 100 ml de agua destilada pH de 7. **Conservar en frasco ámbar y con tapón de hule.**

**Solución de  $\text{NaCl}$  5 M**

Disolver 292 gr de cloruro de sodio en 1 lt de agua destilada pH de 7. **Puede guardarse en refrigeración por 90 días.**

**Solución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 20%**

Disolver 20 gr de SDS en 100 ml de agua destilada pH de 7. **Puede guardarse en refrigeración por 90 días.**

**Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M**

En un matraz aforado de 1 lt añadir 146 gr de EDTA anhidro y aforar con agua destilada pH de 7. **Puede guardarse en refrigeración por 90 días.**