

**MANUAL DE LABORATORIO: LE103 BIOQUÍMICA**

**REGLAMENTO PARA INGRESAR**

1.- Los estudiantes deberán ingresar con uniforme completo, lentes, bata blanca cerrada, de manga larga y en buenas condiciones, así como calzado cerrado.

2.- Los estudiantes deberán ingresar con cabello recogido.

3.- Durante las prácticas está prohibido usar aretes, pulseras, collares, anillos, etc.

4.- Está prohibido ingerir alimentos y bebidas dentro del laboratorio.

5.- Las prácticas inician de manera puntual. Los estudiantes tendrán 10 minutos de tolerancia para incorporarse a la actividad. Transcurridos los 10 minutos se cerrará la puerta y no se le permitirá la entrada a nadie.

6.- El estudiante debe leer la práctica con anticipación. Es indispensable el conocimiento y comprensión de la práctica a desarrollar.

7.- Los estudiantes deben contar con los materiales exigidos para cada práctica. De no ser así no podrá realizar la práctica ya que no se permitirá conseguirlos al momento.

8.- Al culminar la práctica los estudiantes deberán dejar el laboratorio en orden y lavar y secar los materiales.

9.- Las actividades prácticas no se recuperan.

10.- En todo momento el estudiante debe tener buen comportamiento dentro del laboratorio para evitar accidentes.

11.- Se deberá entregar un reporte de práctica con los siguientes requisitos:

• Portada

• Índice

• Introducción

• Objetivo

• Materiales y reactivos

• Procedimiento

• Resultados y observaciones (con fotos)

• Conclusiones

• Bibliografía

 **PRÁCTICA 1**

**CAPACIDAD BUFFER DE LA SALIVA**

**INTRODUCCIÓN**

La capacidad buffer de la saliva, es decir, la capacidad de la saliva de resistir cambios de pH frente a la adición de ácidos es uno de los factores que determinan la susceptibilidad o resistencia a la caries dental. Se ha demostrado que para hacer descender el pH de 2 ml de saliva, provenientes de individuos sin caries a 5 hay que agregar un promedio de 0.7 ml (14 gotas) de la solución décimo normal de ácido láctico, mientras que si los pacientes tienen caries rampante, el promedio de ácido láctico es de tan solo 0.25 ml, o sea 5 gotas.

**OBJETIVO**

Evaluar la capacidad amortiguadora de la saliva ante la adición de ácido. MATERIALES Y REACTIVOS

• Un trozo de parafina estéril

• Vaso de precipitados para recoger saliva

• Tubo de ensayo

• Pipeta de 2 ml

• Perilla

• Indicador universal de pH

• Gotero

• Solución 0.1 N de ácido láctico

• Agua destilada

**PROCEDIMIENTO**

• Un estudiante deberá enjuagarse la boca con agua destilada antes de recolectar la saliva. La recolección se hará masticando un trozo de parafina estéril y escupiendo hasta que recolecte 4 o 5 ml de saliva.

• Vierta 2 ml de saliva en un tubo de ensayo y añada 3 gotas de indicador universal de pH. Anote el pH de la saliva.

• Mezcle bien y con el gotero añada gota a gota (agitando suavemente) una solución décimo normal de ácido láctico hasta que se logre el mismo color que en el patrón (pH 5).

La cantidad de gotas que fue necesario agregar, indica la capacidad buffer de la saliva. A menor cantidad de gotas se asocia con alta susceptibilidad de caries.

La capacidad buffer de la saliva que requiera 10 gotas o más puede considerarse como adecuada, mientras que los individuos que requieran menos de 10 gotas deberán modificar ciertos hábitos alimenticios, de higiene bucal y consultar al odontólogo.



**PRÁCTICA 2**

**CARBOHIDRATOS**

**INTRODUCCIÓN**

Los hidratos de carbono constituyen el grupo de biomoléculas más abundante sobre la superficie terrestre, representando aproximadamente el 75 % de la materia orgánica existente. En ocasiones, se denominan también carbohidratos, azúcares, sacáridos o glúcidos.

En los animales los carbohidratos son esenciales desde el punto de vista energético, ya que muchos órganos y células del cuerpo humano, como el cerebro y los glóbulos rojos, obtienen su energía principalmente de la glucosa. Pero sus funciones no se restringen a ser únicamente fuente de energía, sino que también pueden desarrollar funciones estructurales, de reconocimiento celular y adhesión.

Estructuralmente, un hidrato de carbono típico es una cadena hidrocarbonada con varios grupos alcohol y un carbono más oxidado, en forma de grupo carbonilo. Este grupo oxidado puede situarse en el extremo de la cadena (aldehído), o adyacente, en posición 2 (cetonas). A partir de esta estructura básica, existen otros hidratos de carbono con alguna modificación química.



Muchos azúcares poseen grupos cetónicos o aldehídicos libres. Este tipo de azúcares son llamados azúcares reductores. El indicador utilizado en el reactivo de Benedict es sulfato de cobre en forma de ión cúprico. Los grupos reductores de estos azúcares pueden reducir el ión cúprico hasta óxido cuproso. El color del óxido cuproso va a depender de la concentración y fluctúa entre verde y rojo-anaranjado.

**OBJETIVO**

Identificar carbohidratos reductores mediante la prueba de Benedict

MATERIALES Y REACTIVOS

• 6 tubos de ensayo.

• Agua destilada

• Soluciones patrón de glucosa, fructosa, sacarosa, almidón y solución problema.

• Pipeta de 1 ml

• Perilla

• Baño maría.

• Pinzas para tubo de ensayo.

**PROCEDIMIENTO**

• Se numeran 6 tubos de ensayo.

• Se añade a cada tubo 1 ml de: agua (ensayo blanco), glucosa, fructosa, sacarosa, almidón y solución problema.

• Se añaden 2 ml de reactivo de Benedict a cada uno de ellos y se mezcla bien.

• Se calientan en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. • Si la reacción es positiva aparece un precipitado rojizo, verde o amarillo.

**PRÁCTICA 3**

 **PROTEINAS**

**INTRODUCCIÓN**

Las proteínas son moléculas compuestas por la unión de moléculas más pequeñas y sencillas llamadas aminoácidos, los cuales se unen entre sí mediante enlaces peptídicos.

El enlace peptídico resulta de la reacción del grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro aminoácido.

El gran número de aminoácidos que componen la molécula proteica determina que su estructura sea extraordinariamente compleja, y que para poder estudiarla es necesario dividirla en los llamados niveles estructurales de la proteína:

• Estructura primaria: Es la secuencia de aminoácidos

• Estructura secundaria: Plegamiento de la proteína en forma de hélice o lámina • Estructura terciaria: Plegamiento de la proteína en una forma semiesférica o globular

• Estructura cuaternaria: Se forma por la unión de varios péptidos.

**OBJETIVO**

Detectar la presencia de proteínas y su coagulación mediante diversos métodos. EXPERIMENTO 1.- COAGULACIÓN DE PROTEÍNAS

MATERIALES Y REACTIVO

1 tubo de ensayo

1 inyectadora de 5 ml (o pipeta)

1 huevo

10 ml de ácido acético (vinagre)

Mechero

Pinzas para el calor

**PROCEDIMIENTO**

• Separar la clara de la yema con mucho cuidado evitando que la clara se contamine con trazas de yema.

• Colocar una porción de la clara en un tubo de ensayo y agregarle 5 gotas de ácido acético.

• Tomar el tubo de ensayo con las pinzas para calor y acercarlo a la llama del mechero.



**EXPERIMENTO 2.- PRUEBA DE BIURET**

**MATERIALES Y REACTIVO**

• 4 tubos de ensayo

• Clara de huevo

• Leche

• Gelatina sin sabor

• Jugo de fruta

• Vaso de precipitados

• Agua destilada

• Reactivo de Biuret

**PROCEDIMIENTO**

• Coloca en un tubo de ensayo 3 ml de clara de huevo.

• En el segundo tubo de ensayo coloca 3 ml de leche

• En un vaso de precipitado disuelve la gelatina en agua destilada. Toma 3 ml y colocalos en un tubo de ensayo

• En el cuarto tubo de ensayo coloca 3 ml de jugo.

• Coloca 5 gotas del reactivo de Biuret en cada tuvo y observa lo que sucede.

Esta última reacción provoca un cambio de coloración: violeta azul o violeta rosado da positivo a la presencia de proteínas. Debe señalarse que el color depende de la naturaleza de las proteínas.

**PRÁCTICA 4**

**LIPIDOS (EXTRACCIÓN DE LECITINA)**

**INTRODUCCIÓN**

Los lípidos son un grupo de sustancias que se definen en términos de sus características de solubilidad; así, son solubles en solventes orgánicos como el benzol, éter, acetona, tetracloruro de carbono, cloroformo, etc., e insolubles en agua, aunque algunos lípidos, como los jabones y las sales biliares, se dispersan coloidalmente en ella. Otros, en cambio, apenas son solubles en éter, entre ellos sobresalen los cerebrósidos, las esfingomielinas y las saponinas.

Generalmente, los lípidos se encuentran distribuidos en la naturaleza como ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Su hidrólisis alcalina (conocida como saponificación) origina un alcohol y la sal de sodio o potasio de los ácidos grasos constituyentes; los productos de esta hidrólisis pueden ser solubles en agua.

La lecitina es un compuesto químico formado principalmente por ácidos grasos, glicerol, ácido fosfórico y colina, y es uno de los fosfolípidos. Es un producto completamente natural que se encuentra en las yemas de huevos, las habas de soja, las semillas de girasol y las células de las semillas de las plantas.

Las principales funciones de la lecitina son estabilizar las membranas celulares, estimular diversos procesos metabólicos, respaldar la regeneración de células hepáticas y muchas otras.

La lecitina es un extraordinario emulsionante, ya que puede combinarse con grasas y aceites como con el agua. Las sustancias inmiscibles, como el aceite y el agua, forman emulsiones estables gracias a la lecitina. A la fecha de hoy todavía no se han encontrado sustitutos sintéticos cuyas funciones puedan ni siquiera acercarse a las de la lecitina.

**OBJETIVOS**

Extraer lecitina a partir de la yema de huevo.

**MATERIALES Y REACTIVOS**

• Varilla de vidrio

• Pipeta de 10 ml

• Perilla

• 1 vasos de precipitados de 250 ml

• 1 vasos de precipitados de 100 ml

• 2 probetas

• Papel filtro

• 2 tubos de ensayo

• Soporte universal

• Embudo

• 1 matraz Erlenmeyer

• Placa de calentamiento

• 1 huevo

• Cloroformo (o éter)

• Acetona

**PROCEDIMIENTO**

• Separar la yema del resto del huevo y depositarla en un vaso de precipitados de 250 ml.

• Añadir 15 ml de cloroformo y agitar durante 30 segundos con la varilla de vidrio. Posteriormente se añaden los 20 ml de acetona sin dejar de agitar. Se observará que la lecitina se empieza a adherir a las paredes del vaso. • Esperar a que se separen fases.

• Colocar papel filtro en el embudo y posteriormente sostenerlo en el soporte universal.

• Coloca el matraz Erlenmeyer debajo del embudo y vacía la mezcla a través del papel filtro.

• Después de la filtración vacía el contenido del matraz en 1 vaso de precipitados de 100 ml y colócalo sobre la placa de calentamiento. Cuando haga ebullición retíralo del calor.

• En un tubo de ensayo coloca agua destilada y el otro coloca aceite. • Pon 2 ml del filtrado en cada tubo y observa si se mezclan o no.

**PRÁCTICA 5**

**DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN POR ACCIÓN DE LA AMILASA SALIVAL**

**INTRODUCCIÓN**

El almidón es un glúcido formado a partir de la unión de una gran cantidad de moléculas de glucosa. La amilasa salival es una enzima que hidroliza al almidón rompiendo sus enlaces y liberando glucosa y maltosa (disacárido formado por dos moléculas de glucosa).

**OBJETIVOS**

Comprobar la acción de la amilasa salivar sobre el almidón.

Identificar los productos resultantes de la acción de la amilasa sobre el almidón

**MATERIALES Y REACTIVOS**

• Embudo, 8 tubos de ensayo, 6 pipetas y 1 vaso de precipitados • Perilla

• Muestra de saliva

• Agua destilada

• Disolución de almidón al 2%

• Reactivo de Benedict

• Reactivo de lugol

• Mechero de alcohol

• Placa calefactora

**PROCEDIMIENTO**

*a) Obtención de la enzima amilasa*

• Después de enjuagarte la boca, mastica un trozo de papel filtro para estimular la

• salivación.

• Deposita los líquidos segregados en un embudo colocado sobre un tubo de ensayo.

• hasta obtener al menos 1 ml (1cm de altura en el tubo de ensayo). • Diluye la saliva con 3 ml de agua destilada. Esta es la solución base de la enzima.

*b) Ensayos*

• Numera 6 tubos de ensayo del 1 al 6.

• En el tubo de ensayo número 1 coloca:

2 ml de agua destilada + 2 ml de la solución de almidón + 2 ml de solución base de la enzima.

• En el tubo de ensayo número 2 coloca:

4 ml de agua destilada + 2 ml de la disolución de almidón

• Coloca los tubos 1 y 2 al baño maría a 37º C durante 15 minutos.

**Realización de la prueba de Lugol**

La prueba del lugol permite identificar la presencia de almidón. Con este reactivo se obtiene un positivo cuando la muestra presenta color azul – violeta.

• Toma 2 ml del tubo de ensayo número 1 y viértelos en el tubo de ensayo número 3.

• Toma 2 ml del tubo de ensayo número 2 y viértelos en el tubo de ensayo número 4.

• Añade una gota de lugol en cada uno de los tubos de ensayo 3 y 4. • Agita, observa y anota el resultado en la tabla (positivo/negativo)

**Realización de la prueba de Benedict**

La prueba de Benedict permite identificar la presencia de azucares sencillos como la glucosa y la maltosa. Es positivo cuando se produce un precipitado rojo ladrillo que indica la presencia de azúcares sencillos.

• Toma 2 ml del tubo de ensayo número 1 y viértelos en el tubo de ensayo número 5.

• Toma 2 ml del tubo de ensayo número 2 y viértelos en el tubo de ensayo número 6.

• Añade 1 ml de reactivo de Benedict en cada uno de los tubos de ensayo número 5 y 6

• Agita, calienta los tubos 5 y 6 en el mechero de alcohol evitando que se salga su

• contenido por ebullición, observa y anota el resultado en la tabla (positivo y negativo)



**PRÁCTICA 6**

**EXTRACCIÓN DE ADN**

**INTRODUCCIÓN**

ADN es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchado a cada azúcar hay una de las siguientes 4 bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases; la adenina se enlaza con la timina, y la citosina con la guanina. La secuencia de estas bases a lo largo de la cadena es lo que codifica las instrucciones para formar proteínas y moléculas de ARN.

Para obtener el material genético se requiere de una serie de etapas básicas. En primer lugar, debemos conseguir lisar o romper la pared celular y/o la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula dónde se encuentra alojado el ADN. A continuación, debe romperse de igual forma la membrana nuclear para dejarlo libre. Una vez liberado, hay que proteger el ADN de enzimas y otros componentes celulares que puedan dañarlo. Y finalmente, se debe precipitar en un medio estable.

**OBJETIVO**

Extraer ADN de la saliva y otras muestras.

MATERIALES Y REACTIVOS

• 8 vasos desechables transparentes.

• Lavavajillas (de preferencia sin color)

• Sal

• Agua destilada

• Alcohol etílico

• 1 vegetal (jitomate, espinacas, fresas, por ejemplo)

• Licuadora

• 8 cucharas soperas desechables

**PROCEDIMIENTO**

Saliva

1.- Un estudiante colocara en su boca un poco de agua destilada y la dejara ahí aproximadamente 1 minuto. Posteriormente escupirá en un vaso desechable.

2.- En otro vaso mezclar 3 cucharadas soperas de agua destilada con una cucharada sopera de lavavajillas. Mezclar sin hacer espuma.

3.- En otro vaso mezclar 1 cucharada sal y disolver con agua destilada.

4.- En un vaso coloca una cucharada sopera del contenido de cada uno de los 3 vasos anteriores.

5.- Agrega alcohol asegurándote de que escurra a través de la pared del vaso con suavidad hasta que quede una película semitransparente encima. 6.- Los pequeños hilos blancos que se observan son ADN.

**Vegetal**

1.- Colocar un trozo del vegetal seleccionado en la licuadora con un poco de agua destilada. Licuar y vaciar el contenido en un vaso.

Realizar los pasos 2 al 6 explicados en la sección de saliva.