



Universidad
Continental

BIOQUÍMICA

Guías de Laboratorio



Visión

Ser una de las 10 mejores universidades privadas del Perú al año 2020, reconocidos por nuestra excelencia académica y vocación de servicio, líderes en formación integral, con perspectiva global; promoviendo la competitividad del país.

Misión

Somos una universidad privada, innovadora y comprometida con el desarrollo del Perú, que se dedica a formar personas competentes, íntegras y emprendedoras, con visión internacional; para que se conviertan en ciudadanos responsables e impulsen el desarrollo de sus comunidades, impartiendo experiencias de aprendizaje vivificantes e inspiradoras; y generando una alta valoración mutua entre todos los grupos de interés.

Universidad Continental

Material publicado con fines de estudio

UC0060

2017



Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
ÍNDICE	3
PRÁCTICA N° 2: DESCOMPOSICION DE LA GLUCOSA	7
PRÁCTICA N° 3: RESPIRACIÓN CELULAR	10
PRÁCTICA N° 4: RECONOCIMIENTO DE GLUCOSA	14
PRÁCTICA N° 5: DETERMINACIÓN DE COLESTEROL	17
PRÁCTICA N° 06: TECNOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE.....	21
GUÍA DE PRÁCTICA N° 7	24



GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRIMERA UNIDAD: ESTRUCTURA Y CATALISIS PRÁCTICA N° 1: IDENTIFICACIÓN DE ENZIMA AMILASA

Sección : BS1001
Docente : Mg. MARIA NELLY CASTILLO R.

Apellidos :
Nombres :
Fecha :/.../2017 Duración: 90 min
Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

1. TEMA:

IDENTIFICACIÓN DE ENZIMA AMILASA

2. PROPÓSITO:

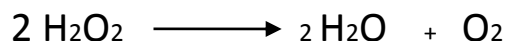
- Observar la desnaturalización de las proteínas.
- Reconocimiento de las enzimas.

3. CONCEPTOS BÁSICOS:

La catalasa es una enzima que se encuentra en las células de los tejidos animales y vegetales. La función de esta enzima en los tejidos es necesario porque durante el metabolismo celular, se forma una molécula tóxica que es el peróxido de hidrogeno H_2O_2 (agua oxigenada).

Esta enzima la catalasa, lo descompone en agua y oxígeno, por lo que se soluciona el problema.

La reacción de la catalasa sobre el H_2O_2 , es la siguiente:



Catalasa

La existencia de catalasa en los tejidos animales, se aprovecha para utilizar el agua oxigenada como desinfectante cuando se echa sobre una herida. Como muchas de las bacterias patógenas son anaerobias (no pueden vivir con oxígeno), mueren con el desprendimiento del oxígeno que se produce cuando la catalasa de los tejidos actúe sobre el agua oxigenada.

4. MATERIALES :

CANTIDAD	EQUIPO
01	BAÑO MARIA

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
02	GRADILLA	
05	TUBOS DE ENSAYO (5)	
01	MECHERO	
01	ENCENDEDOR	
02	PIPETA DE 5 ml	
03	PINZAS DE MADERA	
02	BISTURÍ	

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
10	GRAMOS	AGUA OXIGENADA DE 5 v
c.s.p		SOLUCION DE LUGOL
c.s.p		SOLUCIÓN DE FEHLING
c.s.p		AGUA DESTILADA PARA PRUEBAS BIOQUIMICAS
50	GRAMOS	HIGADO DE POLLO FRESCO
50	GRAMOS	TROCITOS DE TOMATE
10	GRAMOS	ALMIDON

5. EQUIPOS :

Reconocimiento de la *catalasa*

$$2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$

Desnaturalización de la *catalasa*

Hervir trocitos de higado durante 5 minutos

Higado hervido

Añadir agua oxigenada

No hay reacción

6. HIPÓTESIS:

- Los alumnos identifican enzimas en diferentes tejidos animales y vegetales.

7. NOTAS DE SEGURIDAD:

- El laboratorio es un lugar de trabajo científico netamente por lo tanto los estudiantes no deberán tomar a juro el uso y manipulación de ningún instrumento del laboratorio.
- Los bisturíes manipularlos con sumo cuidado.

8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

A. REACCIÓN CON AGUA OXIGENADA:

- ✓ Colocar en un tubo de ensayo unos trocitos de hígado.
- ✓ Añadir 5 ml de agua oxigenada.

Se observara un intenso burbujeo debido el desprendimiento de oxígeno.

B. DESNATURALIZACIÓ DE LA CATALASA:

Mediante esta experiencia vamos a ver una propiedad fundamental de las proteínas, que es la **desnaturalización**. Ya que a catalasa químicamente es una proteína, podemos desnaturalizarla al someterla a altas temperaturas. Al perder



la estructura terciaria, perderá también la función y como consecuencia su función catalítica, por lo que no podrá descomponer el agua oxigenada y no se observara ningún tipo de reacción cuando hagamos la experiencia anterior con muestras de tejidos hervidos.

- ✓ Colocar en un tubo de ensayo varios trocitos de hígado.
- ✓ Añadir agua para hervir la muestra, hervir durante unos minutos.
- ✓ Después de este tiempo retirar el agua sobrante.
- ✓ Añadir el agua oxigenada.

C. HIDROLISIS DEL ALMIDÓN:

La amilasa salival es una enzima que rompe específicamente los enlaces glucosídicos α 1 – 4 de los polisacáridos. La hidrólisis del almidón por amilasa salival de como producto una mezcla de maltosa, maltotriosa (dextrinas) y glucosa. El almidón es un polisacárido formado por dos tipos de cadena: amilasa (lineal) que presenta solo enlace α 1 – 4 y amilopectina (ramificada), con enlaces α 1 – 4 y α 1 – 6. El almidón se reconoce químicamente por el color azul intenso que desarrolla en presencia del yodo, por lo que la hidrolisis enzimática del almidón se puede determinar por la pérdida del color azul de una mezcla de reacción.

Esta mezcla actúa sobre el polisacárido almidón hidrolizando el enlace O – glucosídico, por lo que el almidón se terminará por transformar en unidades de glucosa.

Es importante que recuerdes las reacciones características de glúcidos para comprender esta experiencia.

PROCEDIMIENTOS:

- ✓ Poner en una gradilla cuatro tubos de ensayo, numerados del 1 al 4
- ✓ Añadir en cada tubo 5 ml de una solución diluida de almidón.
- ✓ En el tubo 1 colocar saliva (pH 6,4 – 7, 0)
- ✓ En los tubos 2, 3,4 añadir pequeñas cantidades de saliva. Observar.

9. RESULTADOS O PRODUCTOS

Los alumnos conocen la función de las enzimas.

10. CONCLUSIONES:

- Las enzimas nos ayudan a la desnaturalización de las proteínas para una mejor absorción de nutrientes.

11. CUESTIONARIO:

- ¿La enzima catalasa donde la encontramos y qué función cumple?
- ¿Cómo es la estructura química de la catalasa?
- ¿En el experimento del trozo del hígado, cual es la enzima que se encuentra en esta?
- ¿Qué factores actúan en la actividad e las enzimas?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

- “Bioquímica ilustrada de Harper” MURRAY, R.; DARYL K, GRANNER, RODWELL, VICTOR W.: 17ava edición; editorial “EL MANUAL MODERNO”, México 2008.



GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRIMERA UNIDAD: ESTRUCTURA Y CATALISIS

PRÁCTICA N° 2: DESCOMPOSICION DE LA GLUCOSA

Sección : BS1001
 Asignatura : BIOQUIMICA
 Docente : Mg. MARIA NELLY CASTILLO R.
 Unidad: I Semana: 03

Apellidos :
 Nombres :
 Fecha :/...../2017 Duración: 90 min
 Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

1. TEMA: HIDRATOS DE CARBONO

2. PROPÓSITO:

- ❖ Reconocimiento de la glucosa, sacarosa y lactosa
- ❖ Utilizar correctamente diferentes reactivos

3. CONCEPTOS BÁSICOS:

Los monosacáridos son el grupo funcional más simple de los hidratos de carbono y se clasifican según estén formados por un aldehído o por una cetona.

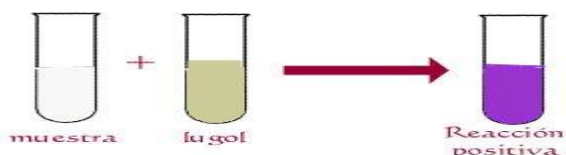
Una de las propiedades químicas que presentan es el carácter reductor, debido a un grupo hidroxilo (OH) en el Carbono 1, que se encuentra libre.

4. MATERIALES :

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
01	GRADILLA	
05	TUBOS DE ENSAYO (5ml)	
01	MECHERO	
01	ENCENDEDOR	
02	PIPETA DE 5 ml	
03	PINZAS DE MADERA	
01	VARILLA DE VIDRIO	

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
c.s.p		SOLUCIÓN DE FEHLING A Y B
c.s.p		SOLUCIÓN DE BENEDICT
c.s.p		SOLUCIÓN SOSA
c.s.p		SOLUCIÓN POTASA
50	GRAMOS	ALMIDON
50	GRAMOS	GLUCOSA
10	GRAMOS	LACTOSA

5. EQUIPOS :



6. HIPÓTESIS:

Los alumnos reconocen a los hidratos de carbono utilizando diferentes reactivos.

7. NOTAS DE SEGURIDAD:

- Utilizar los diferentes reactivos con sumo cuidado.



8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

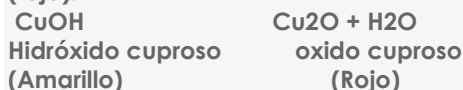
I. FEHLING:

En primer lugar realizaremos el reconocimiento añadiendo al hidrato de carbono dos sustancias: Fehling A y Fehling B, una de las dos contiene sulfato de cobre y reaccionará en caso de que el hidrato de carbono sea reductor, por lo tanto, sea un monosacárido.

1- RECONOCIMIENTO DE LA GLUCOSA.

Se echa 1ml de glucosa en un tubo de ensayo, se echa la misma cantidad de Fehling A y Fehling B, se calienta, se remueve y se observa cómo va pasando de azul, que era su color inicial, a rojo, porque ha reducido al cobre, que ha pasado de Cu^{2+} , es decir, es un monosacárido.

La glucosa se oxida y reduce los iones cúpricos que pasan a cuprosos combinándose a la vez con iones hidroxilo, formando hidróxido cuproso (amarillo), que por el calor se convierte en óxido cuproso (rojo).



2- RECONOCIMIENTO DE LA SACAROSA.

La sacarosa es un disacárido

Para esta reacción vamos a utilizar una solución de sacarosa al 5%, reactivo de Fehling A, reactivo de Fehling B, ácido clorhídrico diluido al 25%, solución de sosa, solución de potasa.

Tomamos en un tubo de ensayo a partes iguales (2 ml) de solución de Fehling A y B, y lo mezclamos con 2 ml de sacarosa. Hervimos y anotamos lo ocurrido.

Vemos que al ser la sacarosa un disacárido que no tiene poder reductor los iones cúpricos no son reducidos a cuprosos, por eso la reacción no pierde su color azul (no se transforma en rojo).

3- RECONOCIMIENTO DE LA LACTOSA

La lactosa es un disacárido. Igual que la glucosa tiene un grupo $-OH$ y se oxida, formando óxido cuproso.

Vamos a reaccionar una solución de lactosa 5%, solución de Fehling A, solución de Fehling B.

Mezclaremos en un tubo de ensayo a partes iguales de Fehling A, B, y lactosa. Hervimos y vemos que al tener la lactosa poder reductor el procedimiento es idéntico al de la glucosa.

La lactosa se oxida y reduce los iones cúpricos que pasan a cuprosos combinándose a la vez con iones hidroxilo, formando hidróxido cuproso (amarillo), que por el calor se convierte en óxido cuproso (rojo).

BENEDICT:

1- RECONOCIMIENTO DE LA GLUCOSA.

Para esta reacción vamos a necesitar una solución de glucosa al 5% además del reactivo de Benedict cualitativo.

Mezclamos 2 ml de glucosa con 2ml del reactivo y lo ponemos a hervir durante 2 o 3 minutos, vemos que se forma un precipitado azul claro que se irá tornando a marrón anaranjado, lo cual nos indica que la prueba estará correcta.

El fundamento de esta reacción es idéntico al de las reacciones anteriores, la única diferencia es que para esta reacción se utiliza álcalis más suaves, como es el carbonato sódico.

2- RECONOCIMIENTO DE LA SACAROSA.

Para esta reacción vamos a necesitar una solución de sacarosa además del reactivo de Benedict cualitativo. Ponemos a hervir durante 2 o 3 minutos, vemos que al ser la sacarosa un disacárido que no tiene poder reductor, y no varía de color, debido a que no es un monómero.

3- RECONOCIMIENTO DE LA LACTOSA

Vamos a reaccionar una solución de lactosa 5%, solución de Benedict. Hervimos y vemos que al tener la lactosa poder reductor el procedimiento es idéntico al de la glucosa.

La disolución torna de azul claro a naranja butano.

HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA:

En un vaso de precipitados hervimos a partes iguales sacarosa y ácido clorhídrico diluido durante 6-8 minutos. Se deja reposar y enfriar. Se neutraliza con la misma cantidad de sosa y se realiza un Fehling A + otro B (con todo en las mismas proporciones).

Al hidrolizar la sacarosa se produce una molécula de glucosa y otra de fructosa, por lo que con esto ya podemos decir que el azúcar se ha convertido en reductor.

La reacción vira a Rojo.

HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN:



Hervir durante 10 minutos en un tubo de ensayo 2 ml de solución de almidón con 2 ml. De solución de HCl. Dejamos reposar y enfriamos. Neutralizamos con 3 ml de solución de sosa. Dividimos el resultado en dos tubos de ensayo.

En el 1º realizamos una tinción de yodo y vemos que no reacciona con el almidón al ser todo glucosa. En el 2º efectuamos un fehling A y B, y calentamos, vemos que reacciona positivamente tiñéndose de rojo.

El fehling positivo nos indica que el almidón puede hidrolizarse por medio de ácidos diluidos y temperatura.

9. CONCLUSIONES:

Al utilizar diferentes tipos de reactivos podemos reconocer con mayor claridad a los glúcidos

10. CUESTIONARIO:

- Investiga sobre 4 enfermedades producidas por el exceso de ingesta de carbohidratos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

“Bioquímica ilustrada de Harper” MURRAY, R.; DARYL K, GRANNER, RODWELL, VICTOR W.: 17ava edición; editorial “EL MANUAL MODERNO”, México 2008.



GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRIMERA UNIDAD: ESTRUCTURA Y CATALISIS

PRÁCTICA N° 3: RESPIRACIÓN CELULAR

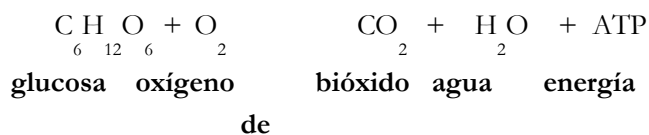
1. **TEMA:** RESPIRACION CELULAR

2. **PROPÓSITO:**

- ❖ Entender qué es la respiración celular, su importancia y los pasos principales de la misma.
- ❖ Diferenciar entre la respiración aeróbica y la anaeróbica.
- ❖ Diferenciar entre la fermentación láctica y alcohólica, y conocer sus aplicaciones.
- ❖ Entender cómo ocurre la fermentación alcohólica a partir de distintos carbohidratos.

3. **CONCEPTOS BÁSICOS:**

- Las células llevan a cabo procesos para funcionar normalmente, los cuales requieren energía.
- **Respiración celular**- serie de reacciones mediante las cuales la célula degrada moléculas orgánicas y produce energía.
- Todas las células vivas llevan a cabo respiración celular para obtener la energía necesaria para sus funciones.
- Usualmente se usa **glucosa** como materia prima, la cual se metaboliza a bióxido de carbono y agua, produciéndose energía que se almacena como **ATP (adenosin trifosfato)**.



- ATP- formada por adenina, ribosa y tres grupos fosfatos con enlaces ricos en energía.
- Cuando la molécula se hidroliza, el fosfato terminal se separa para formar ADP (difosfato de adenosina) y se libera energía.
- El ATP es la fuente de energía que se usa como combustible para llevar a cabo el metabolismo celular.
- La respiración celular se divide en pasos y sigue distintas rutas en presencia o ausencia de oxígeno:
 - **Respiración aeróbica**- en presencia de oxígeno.
 - **Respiración anaeróbica**- en ausencia de oxígeno.¡Ambos procesos comienzan con la glucólisis!
- **Glucólisis**- es el primer paso de la respiración celular y consiste en una serie de reacciones que ocurren en el **citoplasma** de la célula y por las cuales, a partir de una molécula de glucosa, se producen dos moléculas de ácido pirúvico (piruvato).
- *Todos los organismos llevan a cabo la glucólisis.* La glucólisis se divide en dos partes; en la primera la molécula de glucosa se divide en dos moléculas de gliceraldehido-3-fosfato y en la segunda estas dos moléculas se convierten en dos moléculas de ácido pirúvico (piruvato).
- Durante la glucólisis se producen dos moléculas de **ATP**.



- En ausencia de oxígeno, luego de la glucólisis se lleva a cabo fermentación (respiración celular anaeróbica).



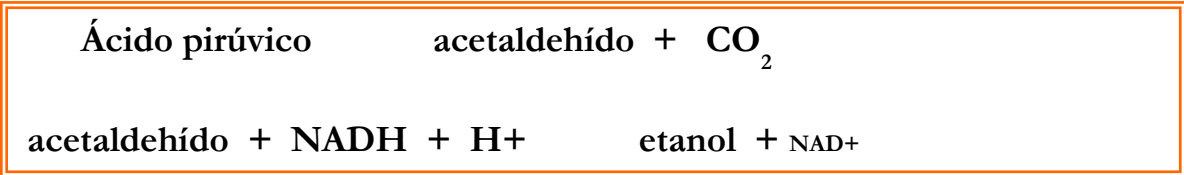
- Algunas bacterias sólo llevan a cabo fermentación, mientras que la gran mayoría de los organismos (incluidos los humanos) pueden llevar a cabo respiración celular aeróbica y anaeróbica.
- **Respiración celular aeróbica-** conjunto de reacciones en las cuales el ácido pirúvico producido por la glucólisis se transforma en CO_2 y H_2O , y en el proceso, se producen **36 moléculas de ATP**.
- En las células eucariotas este proceso ocurre en la **mitocondria** en dos etapas llamadas el **Ciclo de Krebs** (o ciclo de ácido cítrico) y la cadena de transporte de electrones.
- **Cadena de transporte de electrones-** los electrones producidos en glucólisis y en el ciclo de Krebs pasan a niveles más bajos de energía y se libera energía para formar ATP.
- Durante este transporte de electrones las moléculas transportadoras se oxidan y se reducen.
- El último aceptador de electrones de la cadena es el oxígeno.
- En la cadena se producen **34 moléculas de ATP** a partir de una molécula inicial de glucosa.
- **Respiración celular anaeróbica-** ocurre en ausencia de oxígeno.
- Este mecanismo no es tan eficiente como la respiración aeróbica, ya que sólo produce 2 moléculas de ATP, pero al menos permite obtener alguna energía a partir del piruvato que se produjo en la glucólisis.
- Hay dos tipos de respiración celular anaeróbica: fermentación láctica y fermentación alcohólica.



- **Fermentación láctica-** ocurre en algunas bacterias y gracias a este proceso obtenemos productos de origen lácteo tales como yogurt, crema agria y quesos.
- Este proceso sucede también en el músculo esquelético humano cuando hay deficiencia de oxígeno, como por ejemplo, durante el ejercicio fuerte y continuo.
- La acumulación del ácido láctico causa el dolor característico cuando ejercitamos los músculos excesivamente.

FERMENTACION ALCOHOLICA

- Este tipo de fermentación ocurre en levaduras, ciertos hongos y algunas bacterias, produciéndose CO_2 y alcohol etílico (etanol); ambos productos se usan en la producción de pan, cerveza y vino.



○ **PRODUCCION DE ATP**

- En la respiración celular aeróbica se producen 36 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa, mientras que en la ruta anaeróbica sólo se extraen 2 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa.

FERMENTACION ALCOHOLICA EN LEVADURAS

- En este ejercicio se estudiará el proceso de fermentación alcohólica que llevan a cabo las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Estos organismos llevan a cabo respiración aeróbica en presencia de oxígeno y respiración anaeróbica en ausencia de éste.
- En la fermentación alcohólica se produce bióxido de carbono y alcohol etílico (etanol). El bióxido de carbono crea la efervescencia en la cerveza y hace que el pan “suba”



dentro del horno. El etanol que se produce es el alcohol presente en la cerveza y los vinos.

- Se usarán varias soluciones de carbohidratos para determinar cuáles pueden metabolizarse mediante la fermentación.

4. MATERIALES :

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
01	■ Gradilla para tubos de ensayo	
05	■ Tubos de ensayo	5ml
04	■ Pipetas graduadas de	5 ml
01	■ Un sobre de levadura	
	■ Vaso de precipitado	200 ml

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
50	MI	■ Soluciones de sacarosa,
50	MI	■ Soluciones de galactosa,
50	MI	■ Soluciones de maltosa
50	ml	■ Soluciones de lactosa

5. EQUIPOS :

6. HIPÓTESIS:

La respiración se da en las mitocondrias de las células.

7. NOTAS DE SEGURIDAD:

- Utilizar los materiales de laboratorio con mucho cuidado.

8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

1. Prepare una suspensión de levadura por laboratorio mezclando:
 - o Un paquete de levadura
 - o 2 g de sacarosa o melaza
 - o 100 ml de agua tibia
2. Rotule cuatro tubos del 1 al 4. Añada y mezcle bien lo siguiente:
 - a. Tubo 1: 2 ml de solución de sacarosa y 2 ml de suspensión de levadura
 - b. Tubo 2: 2 ml de solución de galactosa y 2 ml de suspensión de levadura
3. Tubo 3: 2 ml de solución de maltosa y 2 ml de suspensión de levadura
4. Tubo 4: 2 ml de solución de lactosa y 2 ml de suspensión de levadura
 - a. 3. Para cada tubo:
5. Llene una pipeta graduada con la solución del tubo
6. Tape el extremo con el dedo mientras sella el lado opuesto con papel de parafina
7. Utilizando la pipeta Pasteur, continúe llenando la pipeta graduada con la solución hasta que se desborde.
 - a. Invierta la pipeta, colocándola en el tubo de ensayo
8. Durante la fermentación, el CO₂ subirá y se acumulará en el extremo superior de la pipeta.
9. Anote la producción de CO₂ en cada pipeta a intervalos de 5 minutos durante 20 minutos y anótelo en la siguiente tabla:

**PRODUCCIÓN DE CO₂ DURANTE LA FERMENTACIÓN**

TIEMPO EN MINUTOS	TUBO 01	TUBO 02	TUBO 03	TUBO 04
05				
10				
15				
20				

9. CONCLUSIONES:

Al utilizar diferentes tipos de reactivos podemos reconocer con mayor claridad a los glúcidos

10. CUESTIONARIO:

¿Cuál fue la producción final de CO₂ (ml/20 min) para cada tubo?

¿Qué tipo de fermentación ocurrió?

¿Puede la levadura usar diferentes carbohidratos para la fermentación?

¿Qué sucedería si no sella con parafina el extremo superior de la pipeta?

¿Por qué hay diferencia en la fermentación de los carbohidratos usados?

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

- "Bioquímica ilustrada de Harper" MURRAY, R.; DARYL K, GRANNER, RODWELL, VICTOR W.: 17ava edición; editorial "EL MANUAL MODERNO", México 2008.



GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRIMERA UNIDAD: ESTRUCTURA Y CATALISIS

PRÁCTICA N° 4: RECONOCIMIENTO DE GLUCOSA

Sección : BS1001
 Asignatura : BIOQUIMICA
 Docente : Mg. MARIA NELLY CASTILLO R.
 Unidad: I Semana: 04

Apellidos :
 Nombres :
 Fecha : .../.../2017 Duración: 90 min
 Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

1. TEMA: RECONOCIMIENTO DE GLUCOSA

2. PROPÓSITO:

- ❖ Conocer los valores normales.
- ❖ Funciones de la glucosa.

3. CONCEPTOS BÁSICOS:

GLUCOSA:

Glucosa, azúcar monosacáridos, de fórmula $C_6H_{12}O_6$, se encuentra en la miel y en jugo de numerosas frutas.

La glucosa se forma en la hidrólisis de numerosos hidratos de carbono, como la maltosa, sacarosa, celulosa, almidón y glucógeno. La fermentación de la glucosa por la acción de levaduras produce alcohol etílico y dióxido de carbono. Industrialmente la glucosa se obtiene por hidrólisis del almidón bajo acción de ácido diluido o más frecuentemente de enzimas. Su aplicación más importante es como agente edulcorante en la elaboración de alimentos. También se emplea en curtidos y tintes, y en medicina para tratamiento de la deshidratación y alimentación intravenosa.

La insulina segregada por el páncreas controla la concentración en la sangre del azúcar glucosa, necesaria como combustibles en numerosas reacciones químicas, en una persona sana la digestión del alimento induce al aumento de la glucosa en la sangre. El páncreas libera insulina, que estimula la absorción de glucosa por parte de las células, también contribuye a transformar la glucosa en glucógeno, que se almacena en el hígado y en los músculos como reserva energética. Las hormonas regulan la liberación de insulina estimulando la disminución de la concentración de azúcar en la sangre, lo que a su vez frena la secreción pancreática. En una persona con diabetes mellitus el páncreas no produce insulina suficiente, el organismo se ve obligado a descomponer las grasas, pues no puede utilizar la glucosa para obtener energía, como consecuencia se eliminan con la orina unos compuestos tóxicos llamados cetonas, que también se acumulan en la sangre y provocan acidosis cetónica, un cuadro grave que puede degenerar en coma o muerte. Si el organismo no es capaz de utilizar la insulina, la glucosa se acumula fuera de las células y circula si ser absorbida. Las concentraciones elevadas de este azúcar en la sangre y orina deterioran la capacidad del organismo para combatir las infecciones y pueden provocar también acidosis cetónica.

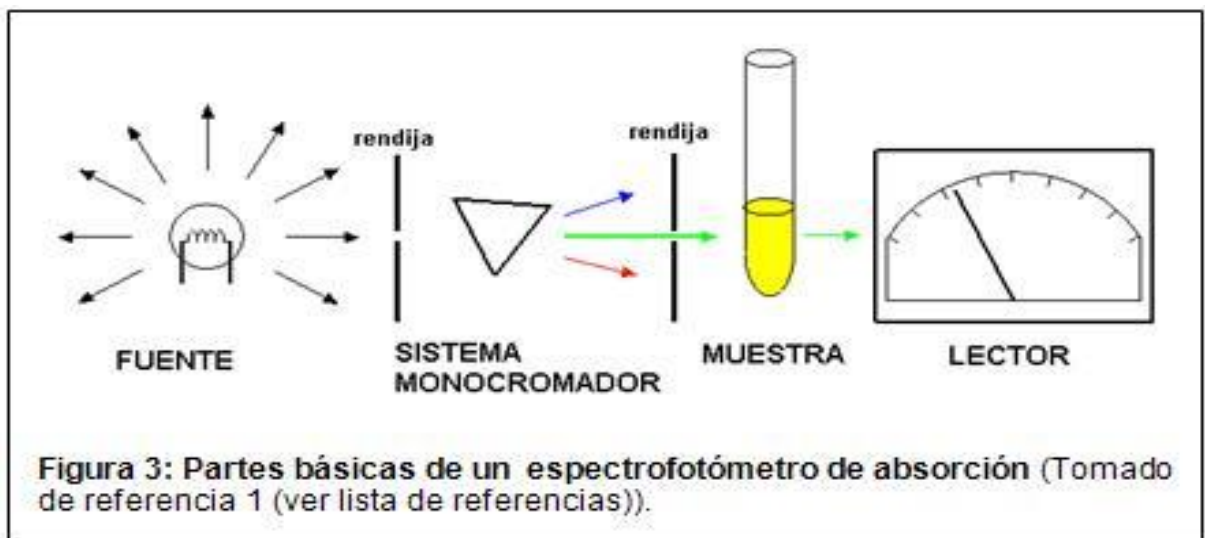
4. MATERIALES :

CANTIDAD	EQUIPO
01	ESPECTOFOTÓMETRO MANUAL O AUTOMÁTICO 505 nm (RANGO 500 A 554 nm)
01	CRONÓMETRO

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
01	MICROPIPETA DE RANGO	10 ul A 50 ul
01	GRADILLA	
03	TUBOS DE ENSAYO DE	13 X 75 mm
06	PUNTERAS	

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
10	gramos	Buffer fosfato pH 7.0 75 mM
		Glucosa oxidasa (aspergillus niger) > 15000 U/l
		Peroxidasa > 2000 U/l
		4 – aminoantipirina 0.5 mM
		Ácido p-hidroxibenzoico 10 mM
		Ázida sódica 0.1 g/dl
		Estabilizantes y preservantes no reactivos
		Heparina

5. EQUIPOS :



6. NOTAS DE SEGURIDAD:

- Utilizar los materiales de laboratorio con mucho cuidado.

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

MUESTRA BIOLÓGICA:

La muestra a utilizar puede ser tonto suero como plasma, líquido cerebro espinal, orna y otros fluidos biológicos. La muestra debe tomarse con el paciente en ayunas.

Separar el suero o plasma a la brevedad posible de las células para evitar una disminución de la glucosa debido a la glucolisis.

En caso de utilizar plasma, utilizar como anticoagulante fluoruro de sodio que actúa como inhibidor de la glucolisis.

La glucosa se establece en suero o plasma 5 horas a 30°C y 24 horas a 4°C

Para periodos mas prolongados congelar a -20°C

Una muestra es estable por una semana a temperatura ambiente, y 1 mes a 4°C evitando la contaminación bacteriana y la evaporación.

**a. TECNICA MANUAL:**

1. Llevar el reactivo a temperatura que indique el ensayo.
2. Las micro pipetas a utilizar deben estar bien limpias
3. Tabla de volúmenes, tres tubos de ensayo.

	BLANCO 1er Tubo	CALIBRADOR 2do Tubo	DESCONOCIDO 3er Tubo
MUESTRA (ml)			0.01 (10 ul)
MUESTRA ESTANDAR (ml)		0.01 (10 ul)	
REACTIVO MUESTRA (ml)	1.0	1.0	1.0

4. Homogenizar cada tubo y llevar a incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)
5. Leer las absorbancias a 505 nm, llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo.
6. El color resultante es estable por lo menos 30 min.

$\text{FACTOR} = \frac{\text{CONCENTRACION CALIBRADOR}}{\text{Abs. CALIBRADOR}}$
$\text{PROTEÍNA TOTAL (g/Dl)} = \text{factor} \times \text{Abs. Muestra}$

RANGO REFERENCIAL:

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia en función de la población de pacientes. Los rangos de referencia que se enumeran a continuación están tomados de bibliografías existentes.

60 – 110 mg/dL

b. TABLA DE RESULTADOS:

RESULTADO	VALOR REFERENCIAL
.....g/dL	60 – 110 mg/dL

8. CUESTIONARIO:

- ¿Cómo es la estructura química de los monosacáridos?
- ¿Cómo es la estructura química del almidón y el glucógeno?
- ¿Explica porque es importante los carbohidratos para el hombre?
- ¿Cuáles son los valores normales de glucosa en la sangre en mujeres embarazadas, diabéticas y en el recién nacido?

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

“Bioquímica ilustrada de Harper” MURRAY, R.; DARYL K, GRANNER, RODWELL, VICTOR W.: 17ava edición; editorial “EL MANUAL MODERNO”, México 2008.



GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PRIMERA UNIDAD: ESTRUCTURA Y CATALISIS

PRÁCTICA N° 5: DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

Sección : BS1001
 Asignatura : BIOQUIMICA
 Docente : Mg. MARIA NELLY CASTILLO R.
 Unidad: II Semana: 05

Apellidos :
 Nombres :
 Fecha :/...../2017 Duración: 90 min
 Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

1. TEMA: DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

2. PROPÓSITO:

- ❖ Cuantificación del colesterol total
- ❖ Conocer los valores normales

3. CONCEPTOS BÁSICOS:

COLESTEROL:

El colesterol es una sustancia cerosa, de tipo grasoso, que existe naturalmente en todas las partes del cuerpo. El cuerpo necesita de determinadas cantidades de colesterol para funcionar adecuadamente. Pero el exceso de colesterol en la sangre puede adherirse a las paredes arteriales. Esto se denomina placa. Las placas pueden estrechar las arterias o incluso obstruirlas.

Los niveles de colesterol elevado en la sangre pueden aumentar el riesgo de enfermedades cardíacas. Los niveles de colesterol tienden a aumentar con la edad. El aumento de colesterol so suele tener signos ni síntomas, pero puede detectarse con un análisis de sangre. Usted tiene probabilidades de tener un nivel de colesterol alto si tiene antecedentes familiares, sobrepeso o consume muchas comidas grasosas.

Es posible disminuir el colesterol mediante ejercicios y el consumo de mas frutas y verduras. Tal vez sea necesario tomar medicamentos que disminuyan el colesterol.

El colesterol además de encontrarlo en la sangre lo encontramos en la bilis y el tejido cerebral, el precursor de los ácidos biliares, esteroides y vitamina D

DETERMINACION ENZIMÁTICA DE COLESTEROL

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

El colesterol se determina por acción de las enzimas colesterol ester hidrolasa y colesterol oxidasa. La primera libera el colesterol de los esteres del colesterol y la segunda oxida el colesterol libre produciendo peróxido de hidrógeno, el cual e presencia de las enzimas peroxidasa reacciona con el sistema cromogenico dando origen a un compuesto coloreado que absorbe a 505 nm.

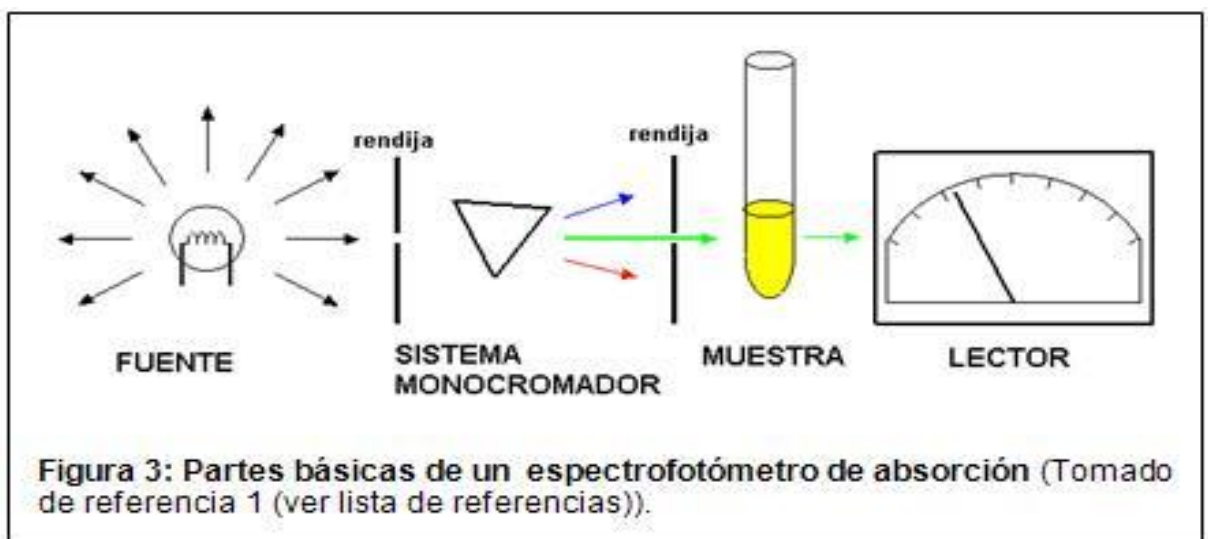
4. MATERIALES :

CANTIDAD	EQUIPO
01	ESPECTOFOTÓMETRO MANUAL O AUTOMÁTICO 505 nm (RANGO 500 A 554 nm)
01	CRONÓMETRO

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
01	MICRIPIPETA	01 ml
01	MICROPIPETA DE RANGO	10 ul A 50 ul
01	SUEROS CONTROLES (REACTIVO)	
01	GRADILLA	

03	TUBOS DE ENSAYO	13 X 75 mm
06	PUNTERAS	
CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
c: s: p	ml	Buffer fosfato pH 7.0 75 mM
c: s: p	MI	Glucosa oxidasa (aspergillus niger) > 15000 U/l
c: s: p	MI	Peroxidasa > 2000 U/l
c: s: p	MI	4 - aminoantipirina 0.5 mM
c: s: p	MI	Ácido p-hidroxibenzoico 10 mM
c: s: p	MI	Ázida sódica 0.1 g/dl
c: s: p	MI	Estabilizantes y preservantes no reactivos

5. EQUIPOS :



6. NOTAS DE SEGURIDAD:

- Utilizar los materiales de laboratorio con mucho cuidado.

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

PREPARACION DEL REACTIVO DE TRABAJO

El reactivo se provee listo para el uso

El reactivo con el tiempo puede tomar un leve color rosado que no afecta los resultados.

Descartar el reactivo si su absorbancia contra blanco de agua es superior a 0,4 D: O a 505

nm.

MUESTRA BIOLÓGICA:

La muestra a utilizar puede ser tonto suero como plasma (hepatina o EDTA) libre de hemólisis. La muestra debe tomarse con el paciente en ayunas, los tubos y materiales de vidrio deben estar bien limpios y libres de residuos de detergente, el colesterol es estable 7 días a temperatura ambiente y 6 meses en congelador.

c. TECNICA MANUAL:

7. Llevar el reactivo a temperatura que indique el ensayo.
8. Las micro pipetas a utilizar deben estar bien limpias
9. Tabla de volúmenes, tres tubos de ensayo.

	BLANCO 1er Tubo	CALBRADOR 2do Tubo	DESCONOCIDO 3er Tubo
MUESTRA (ml)			0.01 (10 ul)
MUESTRA ESTANDAR (ml)		0.01 (10 ul)	



REACTIVO MUESTRA (ml)	1.0	1.0	1.0
--------------------------	-----	-----	-----

10. Homogenizar cada tubo y llevar a incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)
11. Leer las absorbancias a 505 nm, llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo.
12. El color resultante es estable por lo menos 30 min.

$\text{FACTOR} = \frac{\text{CONCENTRACION CALIBRADOR (mg/dL)}}{\text{Abs. CALIBRADOR}}$
$\text{PROTEÍNA TOTAL (g/DL)} = \text{factor} \times \text{Abs. Muestra}$

RANGO REFERENCIAL:

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia en función de la población de pacientes. Los rangos de referencia que se enumeran a continuación están tomados de bibliografías existentes.

60 – 110 mg/dL

d. TABLA DE RESULTADOS:

RESULTADO	VALOR REFERENCIAL
.....g/dL	60 – 110 mg/dL

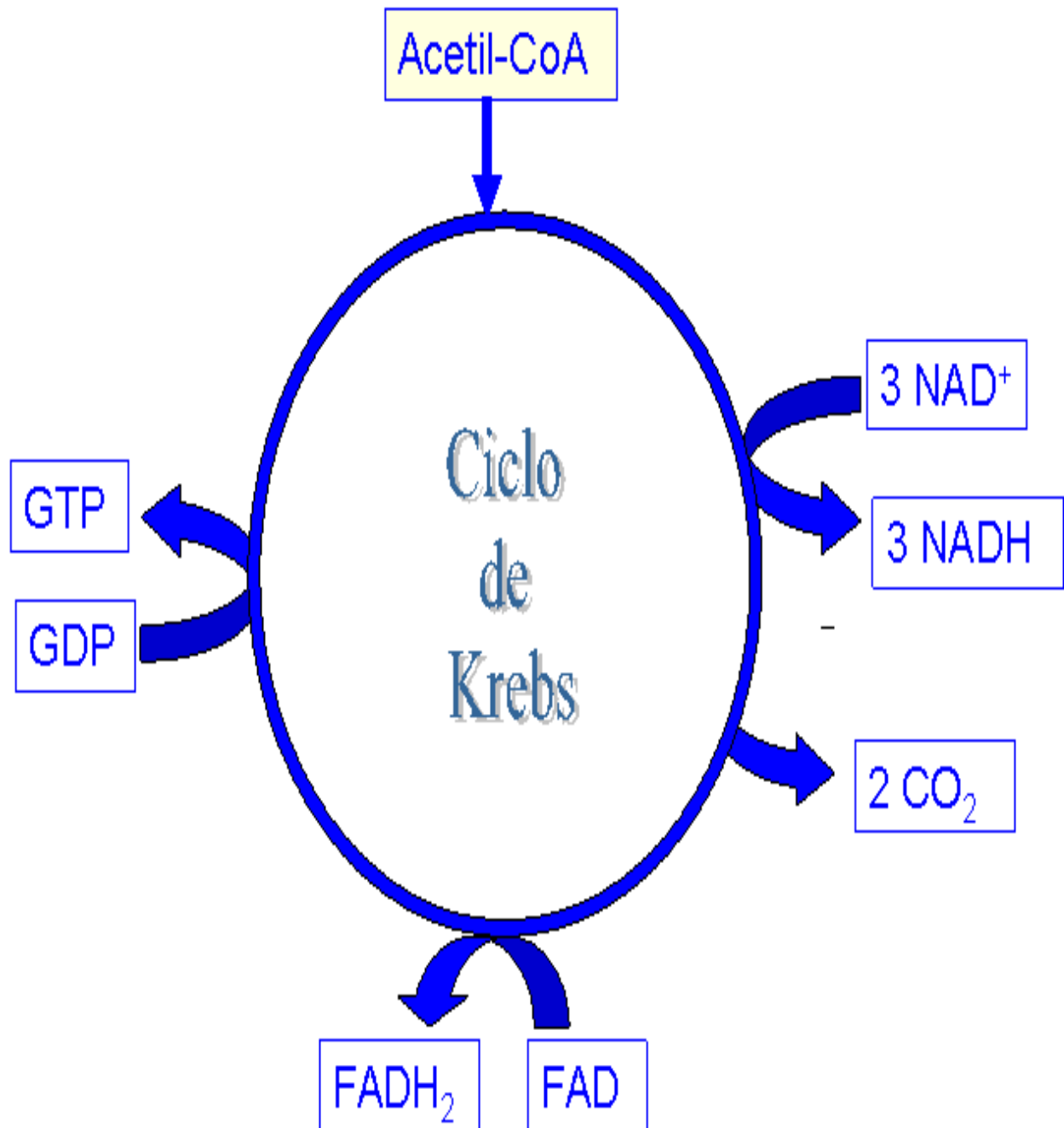
8. CUESTIONARIO:

- ¿Cómo es la estructura química de los HDL, LDL y colesterol?
 - ¿Cómo es la estructura química del omega 3, omega 6 y omega 9?
 - ¿Explica porque es importante la alimentación con lípidos para el hombre?
- Realizar un organizador sobre la clasificación de los lípidos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

- "Bioquímica ilustrada de Harper" MURRAY, R.; DARYL K, GRANNER, RODWELL, VICTOR W.: 17ava edición; editorial "EL MANUAL MODERNO", México 2008.





GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

TERCERA UNIDAD: RUTAS DE LA INFORMACIÓN

PRÁCTICA N° 06: TECNOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE

Sección : BS1001
Asignatura : BIOQUÍMICA
Docente : Mg. MARIA NELLY CASTILLO R.
Unidad: III Semana: 10

Apellidos :
Nombres :
Fecha :/.../2017 Duración: 90 min
Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

1. TEMA: RECOMBINACIÓN DE ADN Y SEPARACION DE MUESTRA

2. PROPÓSITO:

- ❖ Extraer ADN de tejidos animales e identificarlos como tales.

3. CONCEPTOS BÁSICOS:

El proceso de extracción del DNA geonómico sigue ciertas pautas para su correcta purificación que son muy diferentes a los empleados en la purificación de proteínas, lo que refleja las diferencias básicas en la estructura de estos dos tipos de macromoléculas.

El primer paso en la purificación del DNA consiste en homogeneizar las células y distar los núcleos de los cuales se extrae el DNA. El medio de extracción de ordinario contiene un detergente, como el SDS, que sirve para lisar los núcleos y liberar el DNA, hecho que aumenta notablemente la viscosidad de la solución. El detergente inhibe también cualquier actividad nucleasa en la preparación.

El objetivo de los pasos de purificación es separar el DNA de materiales contaminantes, como RNA y proteínas. La desproteización se logra en general agitando la mezcla con un volumen de fenol. El fenol (o alternativamente cloroformo) es un desnaturizador activo de proteínas que suprime la solubilidad de las proteínas en la preparación y las precipita. Puesto que el fenol y la solución salina amortiguadora no se mezclan, solo se requiere centrifugar la suspensión para separar las bases, permaneciendo el DNA (y el RNA) en la solución dentro de la fase acuosa de arriba y la proteína presente como un precipitado concentrado en la interface. La fase acuosa se retira y se somete a ciclos repetidos de agitación con fenol y centrifugación hasta agotar toda la proteína de la solución. Añadiendo etanol frío. El etanol frío forma una capa arriba de la solución acuosa del DNA, el cual, se aísla de las demás moléculas conforme sale de la solución.

En la interface el RNA sale de la solución salina.

En contraste, el RNA sale de la solución como precipitados. Luego de este primer paso de purificación, se disuelve el DNA y se trata con ribonucleasa mediante tratamiento con una proteasa.

Enseguida sale la proteasa por desproteización con fenol y se vuelve a precipitar el DNA. La electroforesis es una de las técnicas mas empleada en bioquímica y biología molecular, usada para separar y a veces purificar macromoléculas, especialmente proteínas y ácidos nucleicos, que difieren en tamaño, carga o conformación.

Cuando las moléculas cargadas son sometidas a un campo eléctrico, migran hacia el polo positivo (ánodo) como es el caso de los ácidos nucleicos o negativo (cátodo) de acuerdo a sus

cargas.

Los fragmentos de DNA lineal migran a través del gel de agarosa con una movilidad inversamente proporcional al log10 de su masa molecular, situándose los más pequeños más cerca del polo positivo, adoptando una apariencia similar a un código de barras.

Cada barra contiene un fragmento de ADN de un tamaño determinado más o menos cada 23 pares de bases.

MATERIALES :

CANTIDAD	EQUIPO
01	BIOMIX
01	CENTRIFUGA

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
10	TUBO DE CENTRIFUGA	1 ml
5	TUBOS DE ENSAYO DE	5 ml
07	MORTERO Y PISTILO	

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
20	MI	BUFFER DE EXTRACCIÓN DE ADN

4. EQUIPOS :



5. NOTAS DE SEGURIDAD:

- Utilizar los materiales de laboratorio con mucho cuidado.

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

- Rompimiento de membranas y paredes celulares.

Primero molimos un pedazo de hígado de pollo en un mortero, lo machacamos muy bien.

- Digestión.

Ya molido bien el hígado se tomo muestras del mismo y se colocaron en pequeños tubos de 1 ml. y se le agrego el buffer de extracción (tris-HCl 0.05 M, Urea 7 M) a temperatura de cuarto.

Una ves agregado el buffer se agito bien la muestra y los que le hacían falta se agitaron de forma esporádica por 10 minutos.

- Separa el ADN animal en un tubo limpio, lo mismo realiza con el ADN vegetal, luego júntalos y introduce el tubo en la centrifuga durante 5 min, observa la muestra y anota los resultados.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf



- “Bioquímica ilustrada de Harper” MURRAY, R.; DARYL K, GRANNER, RODWELL, VICTOR W.: 17ava edición; editorial “EL MANUAL MODERNO”, México 2008.
- Badui, S. 1986. Química de los Alimentos. Edit. Alhambra. México, D.F.
- Belitz, H.; Grosch, W. 1985. Química de los Alimentos. Acribia. Zaragoza, España.
- Hart, L y Fisher H. 1971. Análisis Moderno de Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España
- Tscheuschner, H. 2001. Fundamentos de Tecnología de los Alimentos. Acribia. Zaragoza, España.
- Normas COVENIN



GUÍA DE PRÁCTICA N° 7

1. TEMA: SOLUCIONES AMORITUGADORAS

2. PROPÓSITO:

Determinar la capacidad reguladora del pH que poseen las soluciones preparadas.

3. MATERIALES A UTILIZAR:

CANTIDAD	MATERIALES	CAPACIDAD
01 12	gradilla Tubos de ensayo	18 x 100

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	REACTIVO
30	mL	solución de KCl al 1 %
20	ml	Sol. de KH_2PO_4 0.01 M.
30	ml	Sol. de Na_2HPO_4 0.01 M. Indicador azul de bromotimol. Indicador naranja de metilo.
10	ml	Sol. de HCl 0.01 M.
10	ml	Sol. de NaOH 0.01 M.

LAS SOLUCIONES BUFFER:

Existen ciertas soluciones a las cuales se pueden adicionar cantidades relativamente grandes de ácidos o álcalis sin alterar de manera significativa su pH. Por tal motivo se les denomina soluciones reguladoras, amortiguadoras, buffer o tampón. Lo que resulta evidente es que dichas soluciones tienen una acción **amortiguadora**, entendiéndose por ésta “la capacidad de resistir la adición o pérdida de iones hidrógeno o de iones hidroxilo sin que se produzca un cambio acentuado en su pH”.

Si bien es cierto que los ácidos y las bases fuertes pueden actuar como amortiguadores, en circunstancias ordinarias la acción amortiguadora se debe a la presencia en la solución de un sistema formado por un ácido o por una base débil y su sal correspondiente (ácido- base conjugado). Por lo que esta propiedad se aprovecha para preparar soluciones que mantienen un pH constante.

La regulación fisicoquímica tiene lugar en todos los medios que contienen reguladores, constituidos principalmente por ácidos o bases débiles y sus sales. Por ejemplo el de fosfatos $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ con un pH de 7.2 (o 6.8 a la temperatura corporal), es el principal amortiguador intracelular. El principal amortiguador extracelular en la sangre y líquidos intersticiales es el sistema bicarbonato $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$ con un pH de 6.1.

**4. PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Disponer tres series de 4 tubos. Se numeran los tubos del 1 al 4.
- 2.- Colocar en los tubos los reactivos de acuerdo al cuadro precedente.
- 3.- Determinar cuántas gotas del reactivo indicado son necesarias para obtener el color del tubo número 1 en los tubos 2, 3, 4 respectivamente.

SERIE A	SERIE B	SERIE A	SERIE B
1. 5ml de H ₂ O d 1 gota de Azul de bromotimol	1. 5ml de H ₂ O d 1 gota de naranja de metilo.	10 gotas de HCl	10 gotas de NaOH
2. 5ml de sol. De KCl 1 gota de Azul de bromotimol	2. 5ml de sol. De KCl 1 gota de naranja de metilo.		
3. 2ml de KH ₂ PO ₄ + 3 ml de Na ₂ HPO ₄ 1 gota de Azul de bromotimol	3. 2ml de KH ₂ PO ₄ + 3 ml de Na ₂ HPO ₄ 1 gota de naranja de metilo.		

RESULTADOS: Responde a las siguientes preguntas:

- a) ¿Qué indica el cambio de color en cada una de las series?
- b) ¿Cómo se explica la diferencia en las cantidades de ácido y base que hay que agregar a los tubos 2, 3