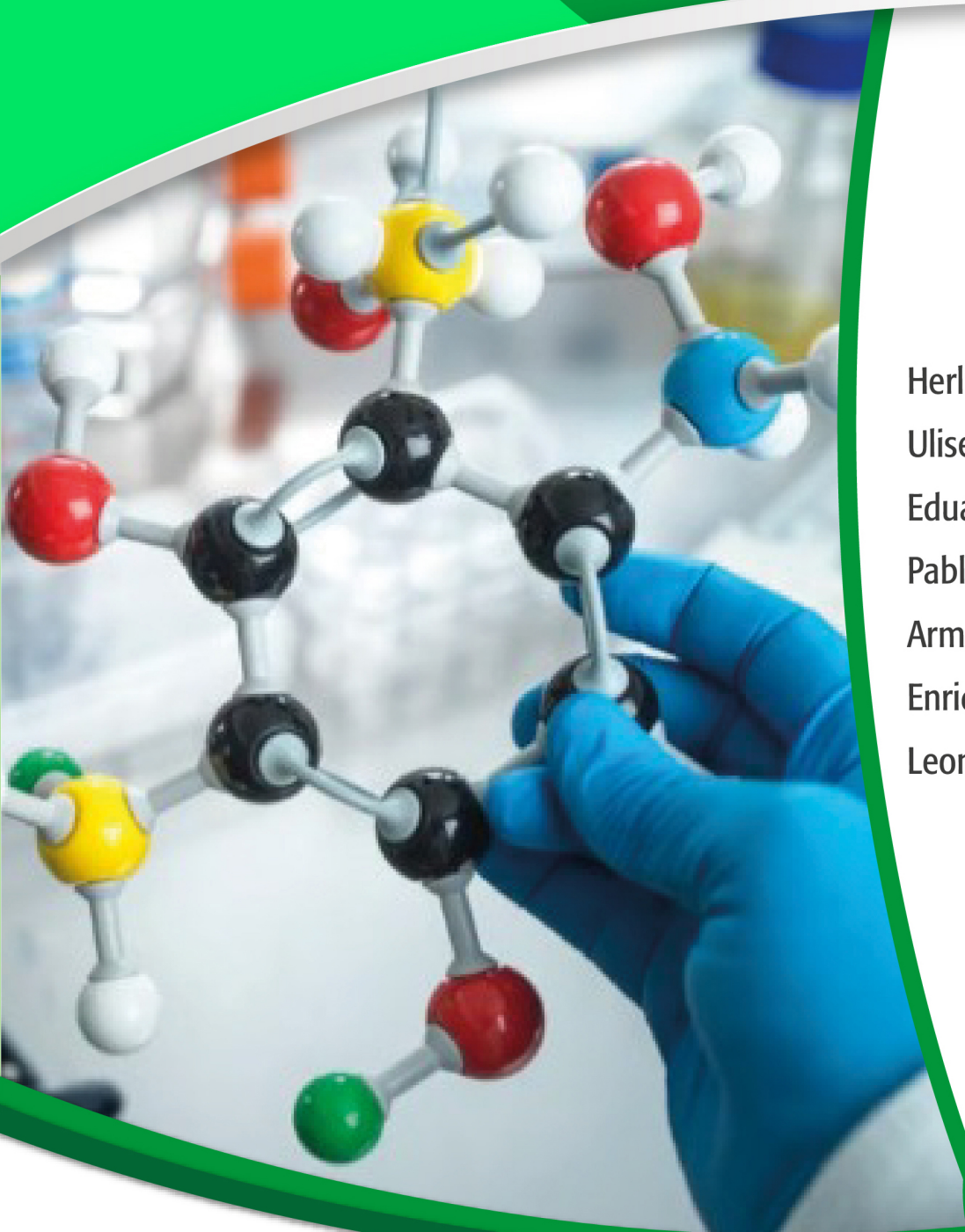


Bioquímica básica: tronco general



Herlinda **Bonilla Jaime**

Ulises **Carrasco Navarro**

Eduardo **Casas Hernández**

Pablo Gustavo **Damián Matzumura**

Armando **Mejía Álvarez**

Enrique **Mendieta Márquez**

Leonor **Rodríguez Cruz**

Bioquímica básica: tronco general

Herlinda **Bonilla Jaime**

Ulises **Carrasco Navarro**

Eduardo **Casas Hernández**

Pablo Gustavo **Damián Matzumura**

Armando **Mejía Álvarez**

Enrique **Mendieta Márquez**

Leonor **Rodríguez Cruz**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Gustavo Pacheco López
Rector General

Dra. Esthela Irene Sotelo Núñez
Secretaria General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dra. Verónica Medina Bañuelos
Rectora de la Unidad

Dr. Javier Rodríguez Lagunas
Secretario de la Unidad

Dra. Edith Arenas Ríos
Directora de la División de C.B.S.

Dr. Juan José Ambriz García
Coordinador de Extensión Universitaria

Lic. Adrián F. Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera edición: diciembre de 2025

ISBN: 978-607-28-3531-3

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186 Col. Leyes de Reforma 1a. Sección
Alcaldía Iztapalapa C.P. 09310, CDMX. Tel.: 58044600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Introducción	5
Práctica 1: Propiedades del agua	7
Práctica 2. Cuantificación del pH y disoluciones amortiguadoras.....	13
Práctica 3. Cromatografía en papel para separación e identificación de aminoácidos	21
Práctica 4. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	25
Práctica 5. Precipitación de una proteína por punto isoelectrico y fuerza iónica	29
Práctica 6. Cuantificación de carbohidratos reductores	33
Práctica 7. Separación de pigmentos vegetales no polares por cromatografía en columna de adsorción	39
Práctica 8 Extracción de ADN de células vegetales	43
Práctica 9. Separación de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	47
Práctica 10. Actividad enzimática de las peroxidasas	55

Introducción

El Manual de Prácticas del Laboratorio de Bioquímica Básica es el resultado de la colaboración de un grupo de docentes con experiencia en el campo, y ha sido elaborado con el propósito de guiar y apoyar el desarrollo de esta UEA, a través del planteamiento de prácticas experimentales que buscan fortalecer el proceso de enseñanza-aprendizaje mediante la aplicación de los conocimientos teóricos en un entorno práctico y controlado.

El laboratorio representa un espacio fundamental para fomentar la curiosidad científica, el pensamiento crítico y el trabajo colaborativo. Por ello, las prácticas incluidas en este Manual han sido diseñadas para fomentar la observación, el análisis y la interpretación de resultados, buscando apoyar los conocimientos adquiridos en la parte teórica del curso, a través del uso de técnicas habitualmente empleadas en los estudios bioquímicos.

Esperamos que este Manual se convierta en una herramienta útil para la formación integral y significativa de los estudiantes y docentes, y que contribuya significativamente al logro de los objetivos académicos planteados en la UEA Bioquímica Básica como parte del Tronco General de los planes de estudio de las licenciaturas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Práctica I

Propiedades del agua

Introducción

El agua es la molécula más abundante en los seres vivos, llegando a constituir hasta el 95% en organismos como las medusas. Es un compuesto polar, que muestra cargas parciales positivas en los hidrógenos y carga parcial negativa en el oxígeno. Esto le permite formar enlaces por puente de hidrógeno con las moléculas vecinas y le confiere muchas de sus propiedades.

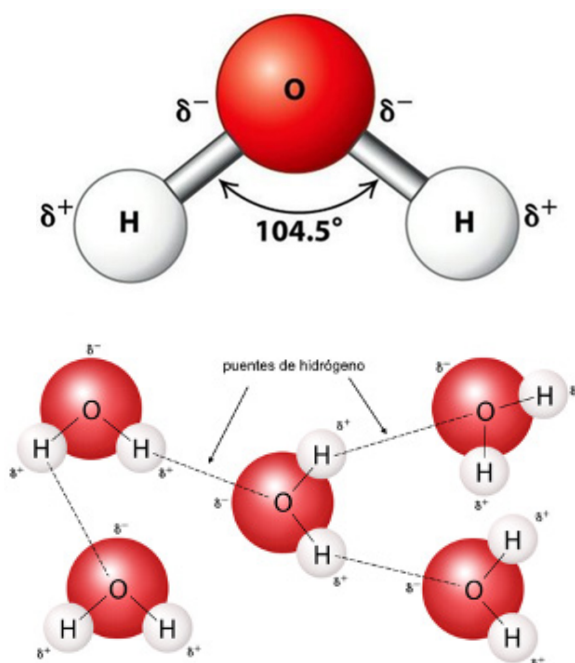


Figura 1. El agua es una molécula polar con cargas parciales positivas y negativas. Por esto es capaz de formar una gran cantidad de puentes de hidrógeno con las vecinas.

Esta cohesión entre las moléculas le confiere la propiedad conocida como tensión superficial, que hace que la superficie del agua se comporte como una capa elástica sobre la que algunos insectos puedan caminar. También provoca que las gotas de agua sean esféricas y que ésta pueda ascender por el interior de un tubo de calibre muy pequeño por capilaridad.

La gran cantidad de puentes de hidrógeno que se forman entre moléculas vecinas hacen que el agua presente un punto de ebullición más alto que otros solventes. También debido a este hecho posee una alta capacidad calorífica, que es la cantidad de energía requerida para incrementar la temperatura del agua y esta propiedad hace que sea empleada por distintos organismos en los procesos de termorregulación, particularmente en los homeotermos.

Es capaz de disolver una gran diversidad de compuestos, incluyendo a los iónicos y a los polares. Puede disolver también compuestos anfipáticos cuando éstos forman micelas. Por esta característica es considerada como el "solvente universal".

En los seres vivos, todas las reacciones químicas ocurren en un medio acuoso y el citoplasma de las células contiene una diversidad de solutos que hacen que el medio interno sea diferente del externo en concentración y composición.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de entender algunas de las propiedades del agua, relacionadas con su estructura molecular, a través de sencillos experimentos.

Actividades

- Mostrar la tensión superficial del agua.
- Mostrar la capacidad calorífica del agua.
- Mostrar los cambios en el punto de ebullición y fusión del agua, dos propiedades coligativas, por la presencia de solutos.

Material y equipo

Material por equipo

- 2 Cajas de Petri de plástico
- 1 Piseta con agua destilada
- 1 Soporte universal
- 1 Anillo
- 1 Rejilla con asbesto
- 1 Mechero Bunsen
- 1 Pinza para matraz
- 1 Termómetro de mercurio, de al menos 150 °C
- 1 Termómetro infrarrojo de -50°C a 500°C
- 2 Vasos de precipitados de 250 mL

Material proporcionado por los alumnos

- Hilo y aguja para coser
- Colorantes artificiales para alimentos
- 2 Clips de metal
- 3 Hisopos de algodón
- 1 Tenedor de plástico
- 1 Cuchara sopera
- 2 Gobos pequeños
- 1 Pocillo de peltre de 500 mL
- Sal de cocina (100 g aproximadamente)
- Salero con sal de cocina
- Jabón líquido para trastes
- Pegamento escolar líquido transparente (por ejemplo, Elmer's Glue)

Procedimiento experimental

A. Tensión superficial. Ensayo I

1. En la base de una caja de Petri agregar agua hasta la mitad de su volumen.
2. Con ayuda de un tenedor de plástico, colocar con cuidado una aguja o un clip sobre la superficie del agua haciéndola flotar sobre la superficie del líquido.
3. Mojar la punta de un hisopo con el detergente de trastes.
4. Tocar suavemente la superficie del agua con el hisopo, en una región cercana a la aguja sin que la toque.
5. Anote sus observaciones.

B. Tensión superficial. Ensayo II

1. Agregar pegamento transparente sobre la base de una caja de Petri, hasta formar una capa de aproximadamente 2 mm, sin que toque los bordes de ésta.
2. Colocar dos o tres gotas de colorante vegetal, de diferentes colores y en distintos puntos, sobre la superficie del pegamento.

3. Con la ayuda de un hisopo mojado en detergente, toque la superficie de cada una de las gotas de colorante.
 4. Anotar las observaciones.
- C. Capacidad calorífica. Ensayo I
1. Inflar un globo pequeño a 2/3 de su volumen. Atar fuertemente el extremo de entrada de aire.
 2. Sujetar el globo con una pinza para matraz sobre una vela pequeña encendida, aproximadamente a 20 cm sobre ella.
 3. Hacer descender el globo poco a poco hasta que estalle. Anotar la altura a la que quedó sobre la flama.
 4. Llenar con agua otro globo, hasta que alcance un volumen semejante al primero. Atar fuertemente el extremo de entrada.
 5. Sujetar con una pinza para matraz y colocarlo sobre la vela encendida. Hacer descender el globo hasta la altura a la que estalló el primero. Mantenerlo ahí por 3 minutos. Si el globo no estalla, bajarlo hasta 2 cm sobre la flama. Mantenerlo ahí por 3 minutos más o hasta que estalle, lo que ocurra primero.
 6. Anotar las observaciones.

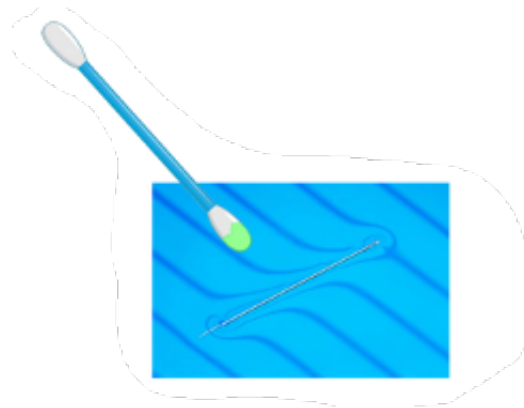


Figura 2. Tocar la superficie del agua con la punta de un hisopo con detergente, en una región cercana a la aguja flotando sobre la superficie del agua, sin que la toque.

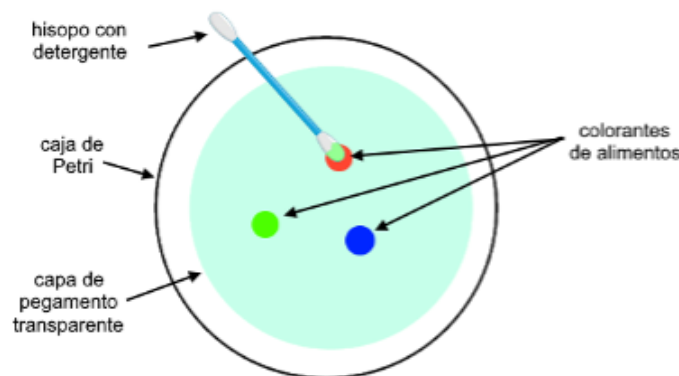


Figura 3. Tocar con la punta de un hisopo con detergente, la superficie de cada una de las gotas de colorantes contenidas en una capa de pegamento transparente.

D. Capacidad calorífica. Ensayo II

1. Colocar el pocillo vacío sobre la rejilla de calentamiento.
2. Encender el mechero para calentar el recipiente.

3. Registrar cada 30 segundos la temperatura exterior del recipiente, a 2 cm por arriba de su base, empleando el termómetro infrarrojo.
4. Registrar la máxima temperatura obtenida. Puede alcanzar una temperatura superior a los 200 °C.
5. Repita el experimento anterior, llenando el pocillo a dos tercios de su capacidad con agua.
6. Calentar a la flama del mechero y registrar cada 30 segundos la temperatura exterior del recipiente, a 2 cm por arriba de su base, hasta que el agua comience a hervir. Registrar la temperatura.
7. Continuar con el calentamiento por 3 minutos más y registra la temperatura máxima obtenida.

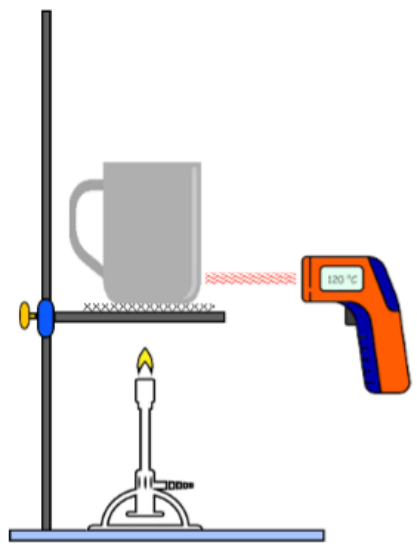


Figura 4. Medir la temperatura del recipiente, vacío o con agua, a 2 cm por arriba de su base.

E. Propiedades coligativas. Punto de ebullición

1. Colocar un vaso de precipitados de 250 mL con agua hasta dos tercios de su capacidad (aproximadamente 170 mL), sobre una rejilla de calentamiento, sobre un mechero Bunsen.
2. Colocar el termómetro de mercurio dentro del líquido e iniciar el calentamiento con el mechero. Seguir con el calentamiento hasta que el agua comience a hervir. Registrar la temperatura de ebullición.
3. Llenar un segundo vaso con la misma cantidad de agua y agregar 3 cucharadas soperas de sal de cocina. Disolver la sal.
4. Colocar el vaso con la solución de sal sobre una rejilla de calentamiento.
5. Colocar el termómetro dentro del líquido e iniciar el calentamiento. Continuar con el calentamiento hasta que el agua comience a hervir. Registrar la temperatura de ebullición y compararla con la temperatura de ebullición del agua sin sal.

F. Propiedades coligativas. Punto de fusión

1. Colocar un cubo de hielo dentro de una caja de Petri.
2. Colocar sobre él un hilo de aproximadamente 10 cm de longitud.
3. Espolvorear con sal el cubo de hielo.
4. Al cabo de un minuto, sujetar los extremos del hilo y levantar el cubo de hielo.
5. Repetir el ensayo del mismo modo, pero omitiendo la adición de sal.
6. Anotar las observaciones.

Resultados

1. Describir los resultados obtenidos en cada experimento agregando, de ser necesario, imágenes o esquemas.



Figura 5. Espolvorear sal sobre un cubo de hielo con un hilo sobre él, y esperar un minuto para tratar de levantarlo.

Análisis de los resultados

1. Explicar los resultados obtenidos en función de las propiedades del agua.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T. Biología Molecular de la célula. 6ª ed. Omega, España. 2016.
- Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. El mundo de la célula. 6ª ed. Pearson. 2011.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th edition. WH Freeman. 2017.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level. 5th edition. Wiley. 2016.

Cuestionario previo

1. ¿Qué tan fuerte es el enlace por puente de hidrógeno, en comparación con el enlace iónico y el enlace covalente?
2. ¿Cuántos enlaces por puente de hidrógeno puede establecer una molécula de agua con las vecinas? ¿Es igual este número en función del estado físico del agua, sólido, líquido o gaseoso?
3. ¿Cómo es el punto de ebullición y el calor de vaporización (calor específico) del agua en comparación con otros solventes?
4. ¿Cuáles son las propiedades coligativas del agua y cómo se modifican con la presencia de solutos?

Práctica 2

Cuantificación del pH y disoluciones amortiguadoras

Introducción

El potencial de Hidrógeno (pH) es una medida convencional que permite expresar la concentración de iones hidrógeno. Es la medida de acidez o alcalinidad de una sustancia acuosa. La concentración de iones hidrógeno o protones (H^+) en un líquido acuoso hace que éste sea ácido (alta concentración de iones H^+) o alcalino (baja concentración de H^+). La escala del pH comienza en 0 y llega hasta 14, porque se deriva del producto iónico del agua (K_w). Para calcular el pH de una solución buffer o amortiguadora se emplea la ecuación de Henderson-Hasselbalch, a partir de la constante de disociación del ácido (pK_a) y de las concentraciones de equilibrio del ácido $[HA]$ sobre la concentración de su ácido conjugado $[A^-]$, a partir de la formula:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

Donde pK_a es la fuerza que tienen las moléculas al disociarse y se expresa como el logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil.

Una solución tampón (buffer o amortiguadora) es cualquier solución que resiste un cambio de pH y permanece constante a medida que se le añade un ácido o una base, hasta un límite. Está formada por un ácido débil y sus sales (para formar el ácido conjugado) o, en su caso, una base débil y sus sales (para formar la base conjugada). En los organismos vivos, los tampones fisiológicos son los sistemas encargados de mantener el pH de los medios biológicos que permiten la realización de funciones bioquímicas y fisiológicas de las células, tejidos, órganos, aparatos y sistemas. Son la primera línea de defensa frente a los cambios de pH de los líquidos corporales, entre los que destacan los de fosfatos y de bicarbonatos. Mantener el pH en los fluidos intra y extracelulares es fundamental, dado que los cambios en el pH influyen en la actividad biológica de las proteínas con función enzimática, hormonal, etc.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de entender el concepto de pH y el principio del funcionamiento de las disoluciones amortiguadoras, especialmente en los sistemas biológicos.

Actividades

- Comparar la medición del pH con potenciómetro y con tiras reactivas.
- Comparar la capacidad amortiguadora de distintas disoluciones.
- Titular el ácido fosfórico (H_3PO_4) para determinar su capacidad amortiguadora, dependiendo de los pK que presenta.

Material y Equipo

Material por grupo

Tiras reactivas (individuales o en rollo) para medir el pH

Material por equipo

- 1 Potenciómetro
- 1 Gradilla
- 30 Tubos de ensayo de 15x100 mm
- 1 Pinza con punta roma
- 1 Pipeta de 1 mL
- 1 Pipeta de 5 mL

- 1 Vaso de precipitados de 25 mL
- 1 Vaso de precipitados de 250 mL
- 1 Probeta de 50 mL
- 1 Bureta
- 1 Soporte universal
- 1 Pinzas para bureta
- 1 Píseta con agua destilada
- 1 Parrilla con agitación
- 1 barra o agitador magnético

Material proporcionado por los alumnos

Muestras de las siguientes opciones: vinagre, leche, saliva, refresco, salsa picante, jugo de naranja, aceite, yogurt líquido, limpiador líquido, solución de jabón.

Reactivos

- Acetato de sodio anhidro
- Ácido acético glacial
- Soluciones de referencia de pH
- Indicador Universal de pH o Reactivo de Yamada

Soluciones

- NaOH 0.01 N
- NaOH 0.2 M
- HCl 0.01N
- H_3PO_4 0.1M
- Solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.5

Procedimiento experimental

A. Comparación de la medición del pH con potenciómetro y con tiras reactivas.

1. Numerar 20 tubos de ensayo de vidrio, de 15 x 100 mm, limpios y secos. Colocarlos en la gradilla en 2 filas, 10 y 10 en cada una.
2. Agregar 2.5 mL de los compuestos proporcionados por el alumno y de las disoluciones amortiguadoras que se van a utilizar, de acuerdo con la Tabla 1.
3. Cortar 10 segmentos de 1 cm cada uno, aproximadamente, del papel reactivo para medir pH 0-14 (Figura 1).
4. Con la ayuda de una pinza con punta roma, sumergir un segmento de la tira reactiva en cada uno de los tubos y mantenerlo sumergido en el líquido por 10 segundos. Procurar que el líquido no toque la pinza para evitar contaminar las demás muestras.
5. Retirar la tira y quitar el exceso de líquido.
6. Comparar el cambio de color de la tira con la escala de pH del contenedor del rollo.
7. En la Tabla 1, registrar los valores de pH obtenidos para cada muestra del 1 al 10.
8. Calibrar el potenciómetro usando 2 soluciones de referencia (pH 7 y pH 4 o pH 10): Enjuagar el electrodo con una píseta con agua destilada y retirar el exceso de agua con papel absorbente. Colocar el electrodo dentro de la solución de pH=7 y oprimir "ON", esperar 1 minuto. Oprimir el botón de "CAL" y esperar hasta que la lectura no varíe significativamente. Oprimir "HOLD" hasta que aparezca el valor de 7 en la pantalla. Enjuagar el electrodo y secar. Colocar el electrodo dentro de la solución de pH=4 o pH=10, durante 1 minuto. **No volver a oprimir "CAL"**, oprimir el botón de "HOLD" hasta que aparezca el valor de pH de la solución empleada. Enjuagar el electrodo y secar.
9. Sumergir el extremo del electrodo del potenciómetro al tubo, procurando que el líquido cubra totalmente la membrana del electrodo.
10. Registrar el valor de pH de cada muestra y registrar en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de la medición del pH con potenciómetro y con tiras reactivas.

No. Tubo	Muestra	pH (tira reactiva)	No. Tubo	pH (potenciómetro)	Diferencia (tira-potenciómetro)
1	Muestra 1		11		
2	Muestra 2		12		
3	Muestra 3		13		
4	Muestra 4		14		
5	Muestra 5		15		
6	Muestra 6		16		
7	Muestra 7		17		
8	Disolución acetatos		18		
9	Disolución fosfatos		19		
10	Disolución carbonatos		20		



Figura 1. Papel reactivo para medir pH 1-14 y Potenciómetro.

B. Comparación de la capacidad amortiguadora de distintas disoluciones

1. Numerar 10 tubos de ensayo de vidrio, de 15 x 100 mm, limpios y secos. Colocarlos en la gradilla en 2 filas, 5 y 5 en cada una.
2. Realizar la dilución 1:5 del hidróxido de aluminio y magnesio (Melox) o algún antiácido líquido. Tomar 0.5 mL del reactivo y agregar 2 mL de agua destilada.
3. Agregar 2.5 mL de cada uno de los compuestos, de acuerdo con la Tabla 2.
4. Agregar 0.5 mL de la dilución de NaOH 0.01 N a los tubos ones y 0.5 mL de la dilución de HCl 0.01 N a los tubos pares. Agitar vigorosamente, usando agitador tipo Vortex o manualmente, durante 10 segundos.
5. Sumergir el extremo del electrodo del potenciómetro al tubo, procurando que el líquido cubra totalmente la membrana del electrodo.
6. Registrar el valor de pH de cada muestra y registrar en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de la capacidad amortiguadora de distintas disoluciones.

No. Tubo	Muestra 2.5 mL	pH inicial	NaOH 0.01 N	HCl 0.01 N	pH final
1	Disolución acetatos		0.5 mL	---	
2	Disolución acetatos		---	0.5 mL	
3	Disolución fosfatos		0.5 mL	---	
4	Disolución fosfatos		---	0.5 mL	
5	Disolución carbonatos		0.5 mL		
6	Disolución carbonatos		---	0.5 mL	
7	Dilución 1:5 del antiácido		0.5 mL	---	
8	Dilución 1:5 del antiácido		---	0.5 mL	
9	Agua destilada		0.5 mL	---	
10	Agua destilada		---	0.5 mL	

C. Titulación del ácido fosfórico (H_3PO_4) para determinar la capacidad amortiguadora dependiendo de los pKs

1. En un vaso de precipitado limpio y seco de 250 mL, agregar 25 mL de 0.1 M de ácido fosfórico (H_3PO_4).
2. Agregar 4 gotas del reactivo de Yamada (Figura 3), que es una mezcla de los indicadores de pH: azul de timol (pH 1.2-2.8), rojo de metilo (pH 4.2-6.3), azul de bromotimol (pH 6.0-7.8) y fenolftaleína (pH 8.2-14).
3. Con el potenciómetro medir el pH inicial y anotarlo.
4. Llenar la bureta con 50 mL de una solución de 0.2 M de NaOH. Ponerla en la pinza para buretas (pinzas Fisher) que se encuentra sujeta al soporte universal.
5. Colocar el vaso de precipitado con el H_3PO_4 con agitador en una parrilla de agitación. El agitador magnético debe estar limpio y seco antes de depositarlo al vaso de precipitados para evitar contaminación y cambios del pH.
6. Centrar el vaso de precipitado con el H_3PO_4 debajo de la bureta, como se muestra en la Figura 2, para que las gotas caigan al centro.
7. Agregar lentamente (gota a gota) el NaOH mientras se agita el H_3PO_4 en una parrilla con agitador.
8. Medir el pH cada 0.5 mL de NaOH agregado y en cada cambio de color.

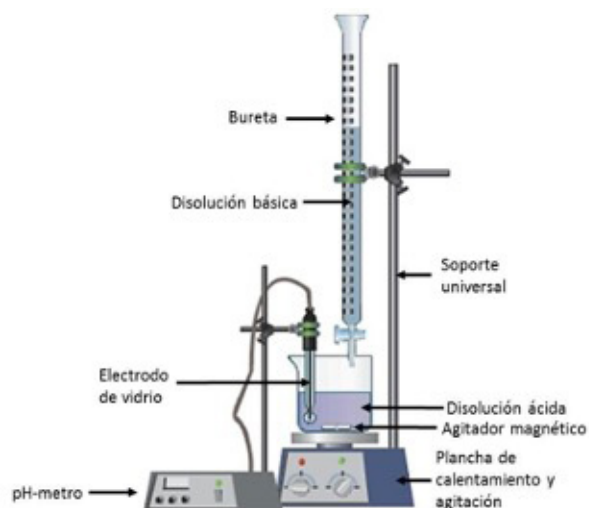


Figura 2. Imagen del montaje de la bureta, el vaso de precipitados, el potenciómetro y el agitador magnético.

Rango de pH	Descripción	Color
≤ 3	Ácido fuerte	Rojo
4–6	Ácido débil	Naranja o amarillo
7	Neutral	Verde
8–10	Álcali débil	Azul
≥ 11	Álcali fuerte	Índigo o violeta



Figura 3.- Cambios de coloración esperados del ácido fosfórico conteniendo el reactivo de Yamada, en función del pH.

Resultados

1. Comparar el pH medido con el potenciómetro y con las tiras reactivas, de acuerdo con la Tabla 1.
2. Analizar la capacidad amortiguadora de las diferentes disoluciones evaluadas a través de los cambios en el pH (Tabla 2).

3. Graficar los cambios de pH (ordenada o eje "y") del ácido fosfórico en función del NaOH agregado (abscisa o eje "x"), como se muestra en la figura 4.
4. Calcular los valores de pKa del H_3PO_4 con base en la gráfica del inciso anterior y compararlos con los reportados ($\text{pKa}1 = 2.12$, $\text{pKa}2 = 7.21$ y $\text{pKa}3 = 12.38$).

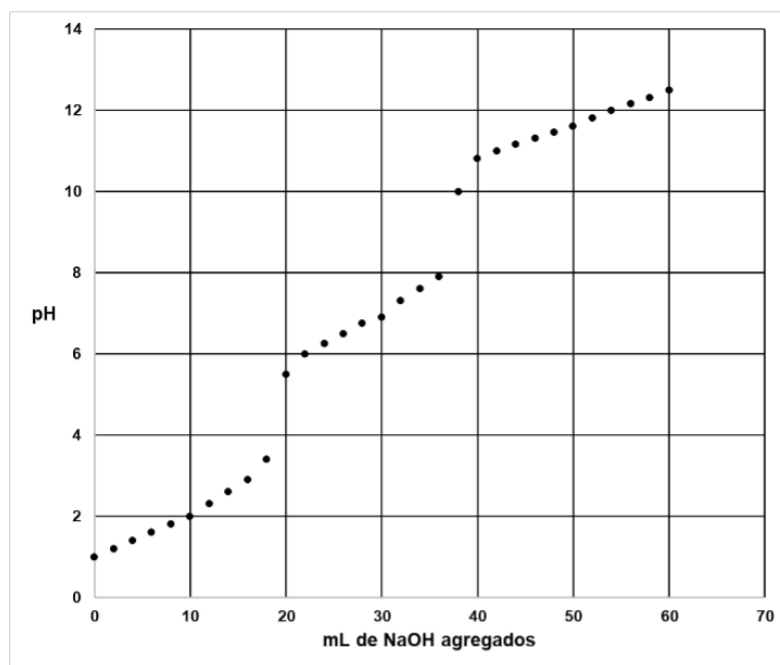


Figura 4. Curva de titulación del H_3PO_4 usando NaOH.

Análisis de resultados

1. Analizar cuál de los métodos de cuantificación del pH utilizados, tiras reactivas o potenciómetro, es más exacto y por qué.
2. Analizar cuál de los amortiguadores (acetatos, fosfatos o carbonatos) tiene mejor capacidad amortiguadora y por qué.
3. Investigar qué funciones fisiológicas tienen los amortiguadores usados en la práctica en los organismos vivos.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Eficacia Amortiguadora [Internet]. Ehu.eus. [citado el 2 de abril de 2022]. Disponible en: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/buffers/efica.htm>
- Guerra JJM. Soluciones amortiguadoras [Internet]. Uaa.mx. [citado el 2 de abril de 2022]. Disponible en: <https://libroelectronico.uaa.mx/capitulo-3-ph-y-soluciones/soluciones-amortiguadoras.html>
- <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/contenido/368-soluciones-buffer-o-amortiguadoras.html>
- Katoch R. Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Editorial Springer, New York. 2011.
- Labster Theory Pages. Indicadores ácido base. <https://theory.labster.com/es/acid-base-indicator-chart/>
- Rodrigo JGK, Órgano VG. Universal pH as a colorimetric reagent for differentiating inorganic anions. Orient J Chem, 36(3): 442-445. 2020.

Soluciones Buffer o Amortiguadoras [Internet]. Edu.pe. [citado e 2 de abril de 2022]. Disponible en: <http://blog.pucp.edu.pe/blog/quimicageneral/quimica-2/unidad-3-equilibrio-quimico/3-6-equilibrio-ionico/3-6-8-soluciones-buffer-o-amortiguadoras/>

Verde-Calvo JR, Vega-Ávila E, López-Cruz JI, Estrada-Zúñiga ME, Malpica-Sánchez FP, Martínez-Orta F, Pelayo-Zaldívar C, Pérez-César MC, Ruiz-Sánchez P, Trejo-Aguilar GM, Tovar-Castro LMZ. Manual de prácticas de laboratorio de Química Analítica. Editorial UAM, DCBS. 2013. <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/analitica.pdf>

Cuestionario Previo

1. ¿Cómo se puede cuantificar el pH y cuál es el principio del potenciómetro?
2. ¿Cómo se calcula el pK_a de una sustancia amortiguadora?
3. ¿Qué es un amortiguador fisiológico y cuál es su importancia en los sistemas biológicos?
4. Mencionar un ejemplo de un amortiguador fisiológico en humanos.

Práctica 3

Cromatografía en papel para separación e identificación de aminoácidos

Introducción

La cromatografía es una técnica de separación que aprovecha la diferencia de solubilidad de un compuesto entre dos fases inmiscibles. La fase estacionaria es un soporte inmóvil que se encuentra revestido o impregnado con un solvente, mientras que la fase móvil está constituida por uno o varios solventes que se desplazan sobre la primera. Cuando la mezcla o molécula a separar se pone en contacto con el sistema cromatográfico, ésta se reparte entre la fase móvil y la fase estacionaria en función de su solubilidad. La concentración del compuesto en cada fase está dada por el coeficiente de partición, que determina su afinidad por una u otra de las fases.

Existen diferentes tipos de cromatografía que pueden ser empleados para la separación de biomoléculas como carbohidratos, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, pigmentos y también para algunos compuestos inorgánicos.

Los aminoácidos pueden ser separados de una manera fácil y económica por medio de una cromatografía en papel, basándose en las diferencias de solubilidad y de su coeficiente de partición en un sistema binario de solventes. Aquellos con mayor afinidad por la fase estacionaria se moverán más lentamente que aquellos que muestran una gran afinidad por la fase móvil. Al término de la separación cromatográfica, la posición de los aminoácidos es revelada por la reacción con una solución de ninhidrina.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de entender los fundamentos de la técnica de cromatografía en papel para separar una mezcla de aminoácidos e identificarlos por comparación con estándares conocidos.

Actividades

- Preparar cámara y papel para cromatografía.
- Correr la cromatografía ascendente en la cámara.
- Revelar el cromatograma utilizando una solución de ninhidrina.
- Calcular el R_f para los aminoácidos estándares y compararlos con los R_f de la muestra problema para identificar los aminoácidos que la componen.

Material y equipo

Material por equipo

- Una hoja de papel Whatman No. 2, para cromatografía
- 1 Cámara para cromatografía en papel
- 6 Tubos capilares
- 1 Mechero Bunsen
- 1 Parrilla de calentamiento
- 1 Probeta de 100 mL

Material proporcionado por los alumnos

- Hidrolizado de proteína o suplemento de aminoácidos, comerciales
- Atomizador de 100 mL
- Un pliego de cartulina
- Regla de 30 cm
- Un par de guantes desechables
- Secadora para el cabello
- Tijeras

- Hilo blanco
- Masking tape

Reactivos

- Fenilalanina
- Ácido aspártico
- Glutamina
- Ninhidrina
- Butanol
- Ácido acético

Soluciones

- Solución de fenilalanina 0.02 M.
- Solución de ácido aspártico 0.02 M.
- Solución de glutamina 0.02 M.
- Solución con una mezcla de dos de los aminoácidos anteriores, preparada por el profesor. Se pueden emplear mezclas diferentes para cada equipo.
- Solución al 1% del hidrolizado de proteína o suplemento de aminoácidos.
- Solución de ninhidrina al 0.2% en acetona.
- Solución de butanol-ácido acético-agua (12:3:5, v/v).

Procedimiento experimental

A. Preparación de la cámara y papel para la cromatografía

1. Colocar la mezcla de solventes (butanol-ácido acético-agua; 12:3:5; v/v) en la cámara de cromatografía y taparla para saturar a temperatura ambiente.
2. Cortar un fragmento de 20 x 9 cm de papel Whatman, haciendo que el lado mayor corresponda a la dirección de corrimiento. Manipular la hoja con guantes todo el tiempo, sobre una cartulina limpia. Marcar dirección de corrimiento. (Ver figura 1)

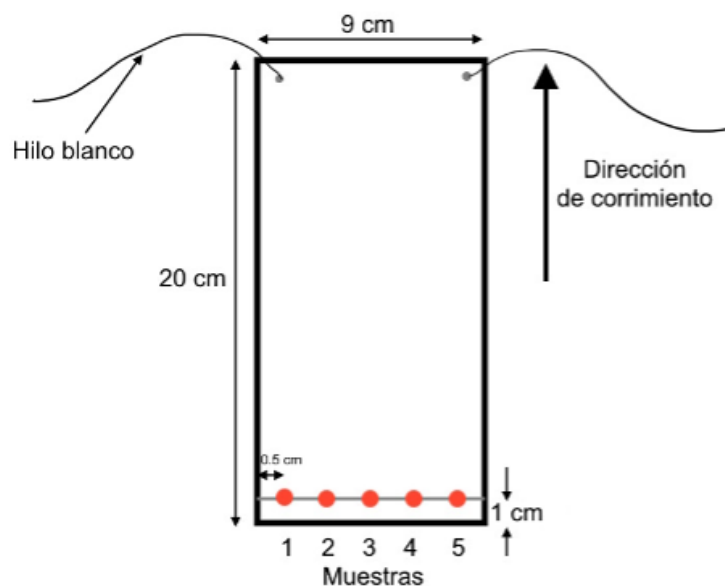


Figura 1. Preparación del papel con las muestras. Colocar las muestras en una línea trazada con lápiz a 1 cm de la base del papel. Sujetar el borde superior con dos hilos.

3. Trazar una línea con lápiz a 1 cm del borde inferior. Marcar cinco puntos equidistantes desde 0.5 cm de los bordes laterales.
4. En los primeros 3 puntos (1-3), colocar las soluciones 0.02 M de los aminoácidos indicados, empleando capilares alargados y diferentes para cada muestra. En cada caso colocar una gota en el punto correspondiente y secar después de la primera aplicación. Repetir la aplicación 4 veces más para cada muestra.
5. En el cuarto punto, colocar la solución de la mezcla de aminoácidos preparada por el profesor, siguiendo las indicaciones del punto anterior.
6. En el quinto punto, colocar la solución del hidrolizado de proteínas o suplemento de aminoácidos, siguiendo las indicaciones previas.
7. Sujetar la hoja de papel con dos tramos de hilo blanco.

B. Corrimiento de la cromatografía ascendente

1. Colocar la hoja dentro de la cámara, cuidando que no toque la base y que el solvente no llegue a la línea de lápiz con las muestras. (Ver figura 2)
2. Cerrar la cámara y permitir que la mezcla de solventes ascienda por 2 h aproximadamente o antes de que toque el borde superior.
3. Sacar la hoja de la cámara y marcar con lápiz el sitio al que llegó el solvente. Dejar secar por completo.

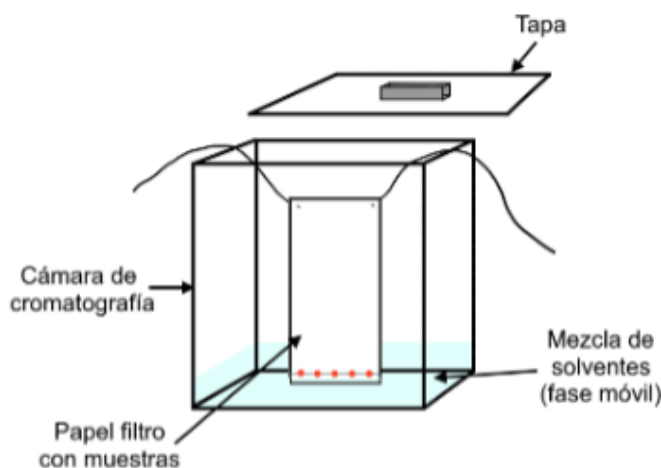


Figura 2. Montaje de la cámara de electroforesis. Colgar el papel con las muestras dentro de la cámara, con ayuda de los hilos. Sumergir la base del papel sin que el líquido alcance la línea en que se colocaron las muestras.

C. Revelado del cromatograma

1. Rociar por completo el cromatograma con la solución de ninhidrina de manera homogénea, a 10 cm de distancia. Secar el papel a 100 °C por 10 minutos.

D. Cálculo de los valores de Rf

1. Después de secar el papel, trazar con lápiz los bordes de las distintas manchas y calcular el punto central.
2. Medir la distancia desde el sitio de aplicación hasta el centro de cada mancha. Éste será el valor de corrimiento de la muestra. (Ver figura 3)
3. Medir la distancia recorrida por el solvente, siguiendo la misma dirección de migración de la muestra. Ésta será el valor del corrimiento del solvente.
4. Calcular el valor de Rf para cada muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por cada muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

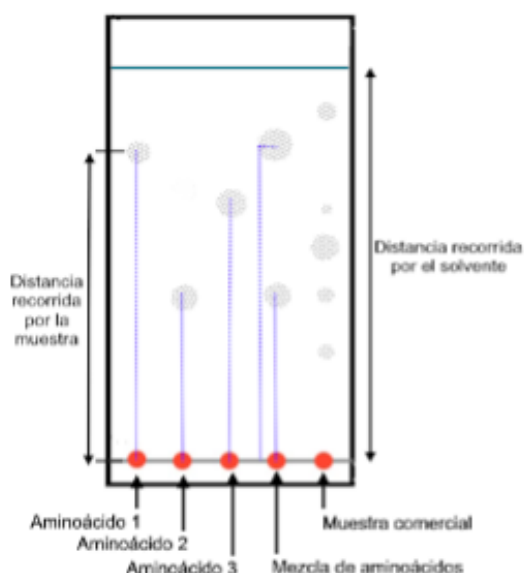


Figura 3. Procedimiento para calcular el R_f de los aminoácidos.

Resultados

1. Hacer una tabla comparativa de los R_f de los aminoácidos estándar y de las manchas de la muestra problema y la muestra comercial.

Análisis de resultados

1. Comparar los R_f de los aminoácidos en función de su polaridad.
2. Identificar a los aminoácidos componentes de la muestra problema.
3. Identificar a los aminoácidos componentes de la muestra de hidrolizado de proteína o suplemento de aminoácidos comercial.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Katoch R. Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Springer Science & Business Media. 2011.
- Lottspeich F, Engels JW (eds). Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology. Wiley. 2018.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th edition. WH Freeman. 2017.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level. 5th edition. Wiley. 2016.
- Wilson, ID, Poole CF. Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science. Boston: Elsevier. 2009.

Cuestionario previo

1. Para este tipo de cromatografía, ¿cuál es la fase estacionaria y cuál la fase móvil?
2. ¿Cuál es la polaridad de los solventes utilizados como fase móvil: butanol, ácido acético y agua?
3. ¿Cuál es la polaridad de los aminoácidos fenilalanina, ácido aspártico y glutamina? ¿Cómo se correlaciona esta propiedad con las características de las cadenas laterales de cada uno?
4. ¿Qué reacción química ocurre entre la ninhidrina y los aminoácidos? ¿Todos los aminoácidos reaccionan igual con la ninhidrina?

Práctica 4

Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford

Introducción

La cuantificación de proteínas es uno de los ensayos bioquímicos más empleados no sólo en el laboratorio de investigación, sino en varias industrias, como la alimentaria y biofarmacéutica. Una de las técnicas más empleadas para determinar la concentración de proteínas en una muestra son los ensayos espectrofotométricos UV y visibles, los cuales son procedimientos confiables y sencillos.

Varios métodos han sido desarrollados para la cuantificación de proteínas, entre ellos podemos mencionar el método de Biuret, el método de Lowry, el ensayo por BCA (ácido bicinónico), y el método de Bradford. Cada uno de estos ensayos tiene sus ventajas y desventajas, sin embargo, es el método de Bradford uno de los más empleados en la actualidad.

El principio del método de Biuret se basa en el complejo que se forma entre los iones cobre y el enlace peptídico de los residuos de aminoácidos, en condiciones alcalinas, el complejo de color púrpura se puede cuantificar espectrofotométricamente a 540 nm.

Por su parte el método de Lowry se basa en la reacción de las proteínas con los iones de cobre en un entorno alcalino, los iones de cobre reaccionan con el reactivo de Folín, produciendo un complejo de color azul, la intensidad de color se mide ahora espectrofotométricamente, entre los 650-750 nm.

El ensayo de BCA, se fundamenta en la reducción de los iones cobre $[Cu_2^{+}]$ a iones cobre $[Cu^{+}]$ por parte de las proteínas en un ambiente alcalino, los iones cobre $[Cu^{+}]$ reaccionan con el BCA para formar un complejo púrpura, la absorbancia ahora se puede medir a 562 nm.

El método de Bradford se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G250 a las proteínas (principalmente a los residuos de aminoácidos básicos), este colorante presenta una forma aniónica la cual se une a las proteínas (dando por resultado un color azul), esta forma aniónica presenta una máxima absorbancia de 595 nm. La cantidad de proteína se estima determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul a una longitud de onda de 595 nm.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de cuantificar la concentración de proteínas en una muestra problema, utilizando un método colorimétrico con el reactivo de Bradford.

Actividades

- Preparar una solución estándar de seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$.
- Realizar los cálculos necesarios para obtener una curva patrón, a partir de la solución de BSA (100 $\mu\text{g/mL}$).
- Obtener los valores de absorbancia de la curva patrón.
- Construir la gráfica de la curva patrón, a partir de la cual se obtiene la ecuación de la recta.
- Determinar la concentración de proteína de una muestra problema.

Material y equipo

Material por grupo

- Balanza analítica

Material por equipo

- 1 Espectrofotómetro
- 1 Agitador vórtex
- 1 Micropipeta de 100-1000 μL
- 1 Rack con puntas de 1000 μL

- 34 Tubos de ensayo de 5 mL
- 1 Gradilla para tubos de ensayo
- 1 Piseta con alcohol al 70%
- 1 Vaso de precipitado de 50 mL
- 6 Celdas para espectrofotómetro
- Matraz aforado de 5 mL
- Cucharilla/espátula para pesar

Material proporcionado por los alumnos

- Muestra de leche deslactosada light

Reactivos

- Agua destilada
- Seroalbúmina bovina (BSA)
- Reactivo de Bradford (BioRad, número de catálogo 500-0006, Precaución: este reactivo contiene metanol, en contacto con la piel, puede causar irritación, la inhalación excesiva puede causar vómito y mareos)

Soluciones

- Solución de etanol al 70 %

Procedimiento experimental

A. Preparación de la solución estándar de BSA

1. Calcular la cantidad a pesar de BSA para preparar 5 mL a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.
2. Pesar la cantidad necesaria de BSA y aforar a 5 mL con agua destilada, agitar la mezcla hasta que la proteína se haya disuelto por completo.

Tabla 1. Curva patrón de BSA

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Concentración de BSA ($\mu\text{g/mL}$)	0	10	20	30	40	50
Volumen de solución estándar (μL)	0	100	200	300	400	500
Volumen de agua destilada (μL)	1000	900	800	700	600	500

B. Preparación de la curva patrón de BSA

1. Para obtener la curva patrón, primero es necesario rotular los tubos de ensayo, posteriormente, a partir de la solución estándar prepare las diluciones de la curva patrón de acuerdo con los volúmenes indicados en la tabla 1, cada dilución deberá prepararse por triplicado.

C. Obtener los valores de absorbancia de la curva patrón

1. Pipetear 800 μL de cada una las diluciones de la curva, depositar en un tubo de ensayo.
2. Adicionar a cada uno de los tubos, 200 μL del reactivo de Bradford.
3. Agitar las muestras en vórtex por aproximadamente 5 segundos.
4. Incubar la mezcla por 5 minutos.
5. Transferir cada una de las muestras a celdas para espectrofotómetro.
6. En el espectrofotómetro, ajustar la absorbancia a un valor de cero a 595 nm con el blanco (tubo 1).
7. Medir la absorbancia de las diluciones a 595 nm en el espectrofotómetro.

8. Registrar el valor de absorbancia, transferir el contenido de la celda al tubo de ensayo.
9. Con los resultados obtenidos, elaborar la curva patrón; para esto, graficar los valores de absorbancia contra los valores de concentración de proteína. Con la gráfica resultante, obtener la ecuación de la recta, que servirá para calcular la concentración de proteína de una muestra problema.

La figura 1 muestra el procedimiento general de la práctica.

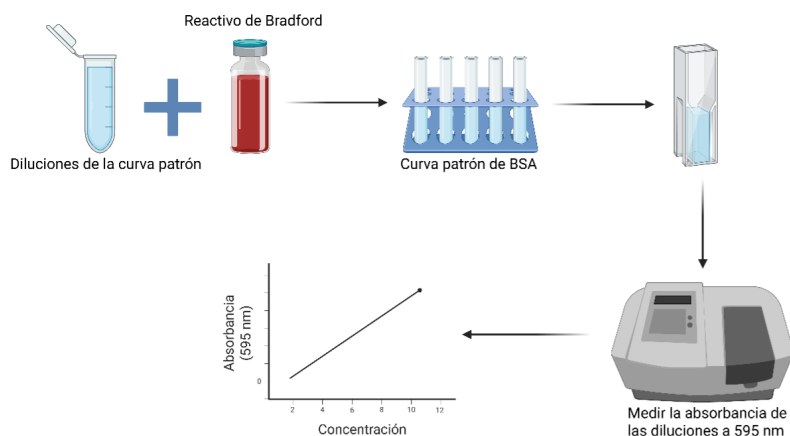


Figura 1. Procedimiento general de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford
(imagen creada en: <https://BioRender.com>)

D. Determinar la concentración de proteína de una muestra problema

1. Prepare una serie de diluciones de la muestra de leche (descremada), para lo cual, deberá tomar 1 mL de leche descremada y aforar a 250 mL con agua destilada, a partir de esta solución prepare las diluciones recomendadas en la tabla 2 cada dilución deberá prepararse por triplicado.
2. Pipetear 800 μL de cada una de las diluciones de la muestra de leche, depositar en un tubo de ensayo.
3. Adicionar a cada uno de los tubos, 200 μL del reactivo de Bradford.
4. Agitar las muestras en vórtex por aproximadamente 5 segundos.
5. Incubar la mezcla por 5 minutos.
6. Transferir cada una de las muestras a celdas para espectrofotómetro.
7. En el espectrofotómetro, ajustar la absorbancia a un valor de cero a 595 nm con el blanco (use el tubo 1 de la curva patrón).
8. Medir la absorbancia de las diluciones a 595 nm en el espectrofotómetro.
9. Registrar el valor de absorbancia, transferir el contenido de la celda al tubo de ensayo.

Tabla 2. Diluciones recomendadas de la muestra de leche

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Volumen de solución leche (μL)	800	600	400	200	100
Volumen de agua destilada (μL)	0	200	400	600	700

Resultados

1. Elaborar una gráfica (regresión lineal) con los valores de concentración de proteína y los valores de absorbancia obtenidos. Obtener la ecuación de la gráfica (los valores de concentración de proteína irán en el eje X y los de absorbancia en eje Y).
2. Con la ecuación de la gráfica, despejar la variable de concentración y calcular las concentraciones de proteína para cada una de las muestras problema (diluciones de leche descremada).

Análisis de resultados

1. Analizar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que permiten su cuantificación espectrofotométrica.
2. Analice las limitaciones del método de Bradford.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con el objetivo planteado y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Cortés-Ríos J, Zárate AM, Figueroa JD, Medina J, Fuentes-Lemus E, Rodríguez-Fernández M, Aliaga M, López-Alarcón C. Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Anal Biochem*. 608:113904. 2020.
- Zheng K, Wu L, He Z, Yang B, Yang Y. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement*, 112:16-21. 2017.
- Kruger NJ. The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker JM. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. 2009.
- Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 463:73-95. 2009.

Cuestionario previo

1. ¿Cuál es el fundamento del método de Bradford para la cuantificación de proteínas?
2. ¿Qué es una curva estándar y cuál es su función en esta práctica?
3. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método de Bradford en comparación con otros métodos para la cuantificación de proteínas?
4. ¿Qué tipo de interacción ocurre entre el colorante y las proteínas?, ¿Qué aminoácidos contribuyen a esta interacción?

Práctica 5

Precipitación de una proteína por punto isoelectrico y fuerza iónica

Introducción

La solubilidad de una proteína varía en función de varios factores, y cada proteína tiene un perfil de solubilidad único dependiendo de su estructura y las condiciones del medio, de tal forma que esta característica puede ser utilizada para separar proteínas de una fuente inicial en la que se encuentren mezclas diferentes proteínas.

Para el caso de las proteínas solubles en medios acuosos, algunos de los factores del medio que pueden influir sobre su solubilidad son los siguientes:

- a) pH: La solubilidad es mínima en el punto isoelectrico (pI), donde la carga neta de la proteína es cero. Fuera del pI, la carga neta de la proteína aumenta, lo que favorece la repulsión electrostática y la solubilidad.
- b) Fuerza iónica (Concentración de sales): A bajas concentraciones de sal, la solubilidad aumenta debido al efecto de "salado" (*salting-in*) mientras que, a elevadas concentraciones de sal, la solubilidad disminuye por la competencia del ion con el agua, causando precipitación (*salting-out*).
- c) Temperatura: En general, el aumento de temperatura puede mejorar la solubilidad, pero temperaturas muy altas pueden desnaturar la proteína y hacerla insoluble, y
- d) Cambios en la polaridad del solvente: Solventes con menor polaridad pueden afectar las interacciones hidrofóbicas y cambiar la solubilidad.

La caseína es una proteína que se encuentra principalmente en la leche y sus derivados, y se utiliza frecuentemente en suplementos nutricionales y en la industria alimentaria para la fabricación de quesos y otros productos lácteos debido a su capacidad para formar geles y estructuras estables.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de entender el efecto del pH y la fuerza iónica sobre la solubilidad de una proteína, utilizando diferentes métodos de obtención.

Actividades:

Cada equipo de laboratorio empleará una estrategia diferente para la precipitación y purificación de caseína de leche. Utilizarán uno de los siguientes métodos:

- Ajustar el pH a 4.6 (punto isoelectrico de la caseína).
- Ajustar el pH a un valor por debajo de 4.6 (por ejemplo, pH 3).
- Ajustar el pH a un valor superior de 4.6 (por ejemplo, pH 6).
- Agregar diferentes soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con concentraciones cero, baja, media o alta.

Como resultado de este procedimiento, se obtendrá un precipitado de proteína y se realizarán los siguientes pasos para la purificación parcial de la proteína:

- Obtener el precipitado por centrifugación.
- Calcular el rendimiento.
- Comparar los resultados de todos los equipos para contrastar los métodos de precipitación. Determinar el efecto de las variables analizadas sobre la solubilidad de la caseína.

Material y equipo

Material por grupo

- Balanza analítica
- Centrifuga clínica

Material por equipo

- 2 Vasos de precipitados de 250 mL
- 1 Agitador magnético
- 1 Parrilla con agitación magnética
- 1 Potenciómetro
- 2 Pipetas graduadas de 5 mL
- 2 Tubos de centrifuga de 50 mL

Material proporcionado por los alumnos

- Leche deslactosada light (un litro por grupo)

Reactivos

- $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ (Acetona)
- Acetato de sodio CH_3COONa
- Ácido clorhídrico HCl
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Soluciones

- Solución de HCl al 20% (v/v)
- Solución de NaOH al 20% (v/v)
- Solución 1 M de CH_3COONa , ajustada a pH 4.6
- Solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Preparación: Adicionar 780 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la solución de CH_3COONa . Dejar que sedimenten los cristales y utilizar el sobrenadante.

Procedimiento experimental

A. Preparación preliminar

Colocar 80 mL de la leche en un vaso de precipitados de 250 mL, que contenga un agitador magnético y colocar sobre la parrilla. Introducir el electrodo, previamente calibrado, en el vaso, teniendo cuidado de no golpear el electrodo con el agitador magnético.

Los equipos se dividirán en dos secciones: una analizará el efecto del pH sobre la solubilidad de la caseína, y otra evaluará el efecto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la solubilidad de la proteína.

B. Precipitación por Punto isoeléctrico

Los tres equipos de la primera sección adicionarán gota a gota, con una pipeta graduada, la solución de HCl hasta ajustar el pH deseado: un equipo lo ajustará a pH 4.6 (pl de la caseína), otro lo hará a un pH menor (añadiendo 5 mL de la solución de HCl), y el tercero a un pH mayor (adicionando 5 mL de la solución de NaOH).

C. Precipitación por fuerza iónica

Los demás equipos ajustarán el pH a 4.6, y procederán a evaluar el efecto de la adición de sal sobre la solubilidad de la caseína. Para ello, los equipos añadirán los siguientes volúmenes de la solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

EQUIPO	1	2	3	4	5
mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	0	5	10	20

Como resultado del proceso, se formará un precipitado. En ese momento se detiene la agitación y se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se resuspenderá el precipitado y se procederá a centrifugarlo a 2000 rpm durante 10 minutos.

D. Evaluación del rendimiento

Para todos los equipos, el precipitado de cada uno de los tubos se coloca en un vaso y se adicionan 20 mL de agua, agitando hasta tener una suspensión homogénea, y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se recupera el precipitado y se le añade un volumen igual de acetona para volver a centrifugar y obtener el precipitado final. A continuación, el precipitado se pesará en una balanza analítica.

Resultados

1. Calcular el peso del precipitado obtenido bajo las condiciones experimentales del equipo al que pertenece
2. Elaborar una tabla con los resultados obtenidos por todos los equipos

Análisis de resultados

1. ¿Cómo varió el rendimiento obtenido en función de los diferentes pH de la solución?
2. ¿Cómo varió el rendimiento como resultado de la adición de una sal al medio?

Conclusiones

A partir de la comparación de los resultados obtenidos por los diferentes equipos, se determinará el efecto del pH y la fuerza iónica del medio sobre la solubilidad de la caseína.

Bibliografía

- Devlin TM. Bioquímica, 4a ed. Barcelona: Reverté. 2015.
- Horton HR, Moran LA Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD. Principios de Bioquímica, 4ª Ed. Pearson Educación, México. 2008.
- Murray RK, Bender DA, Botham, KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper Bioquímica Ilustrada, 29ª Ed. McGraw-Hill. México. 2012.
- Nelson MM, Cox DL. Principios de Bioquímica de Lehninger. 7ª Ed. Omega. España. 2018.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular. 4ª Ed. Editorial Médica Panamericana. España. 2016.

Cuestionario previo

1. ¿Qué tipo de proteína es la caseína?
2. ¿Qué otras proteínas pueden encontrarse en la leche?
3. ¿Por qué es preferible utilizar leche descremada y deslactosada?
4. ¿Qué es el pI de una proteína?
5. ¿Por qué varía la solubilidad de una proteína en función del pH?
6. ¿Cómo afecta la presencia de otros solutos a la solubilidad de una proteína?
7. ¿En qué se basa la centrifugación para separar partículas de diferente tamaño?
8. ¿Los métodos utilizados en esta práctica podrían llevar a la desnaturalización de la proteína?

Práctica 6

Cuantificación de carbohidratos reductores

Introducción

Los carbohidratos o hidratos de carbono constituyen biomoléculas formados principalmente por carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), elementos que se conjugan para formar diversos tipos. Los carbohidratos están ampliamente distribuidos tanto en tejidos animales como vegetales.

Los carbohidratos pueden clasificarse como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos son los azúcares más sencillos y dependiendo del número de carbonos, se clasifican como triosas, tetrasas, pentosas, hexosas y heptosas. Los más importantes biológicamente, son los que tienen 3, 5 y 6 átomos de C. Estos contienen un grupo aldehído (aldosas) o cetona (cetosas) y nos son hidrolizables, todos son reductores.

Entre los principales oligosacáridos se encuentran los disacáridos que son dos moléculas de monosacáridos unidas a través de un enlace glicosídico. Los más importantes son la sacarosa (glucosa-fructosa), la lactosa (glucosa y galactosa) y la maltosa (glucosa-glucosa).

Los polisacáridos son enormes cadenas formadas por uno o varios tipos de monosacáridos. La celulosa (componente principal de la pared celular de los vegetales) y el almidón (reserva en las plantas) está formado por unidades de glucosa combinadas entre sí, por uniones glicosídicas.

Los carbohidratos son biomoléculas que tienen una gran importancia en el campo de la investigación de las ciencias biológicas y en la aplicación industrial derivada de ello. Por lo tanto, es de gran relevancia su determinación y cuantificación.

Un método ampliamente utilizado para determinar la cantidad de azúcares en una muestra es el propuesto por Miller en 1959 (Figura 1), que utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual reacciona con los azúcares reductores presentes en una muestra utilizando calor, lo cual reduce el DNS a 3-amino-5 nitrosalicílico, y cambiando el color de la muestra que se oxida en apariencia amarilla-café. La cantidad de azúcares reductores en la muestra se puede determinar aplicando la ley de Beer-Lambert. Este método colorimétrico utiliza una longitud de onda de 540 nm y muestra un alto coeficiente de correlación, siendo efectivo para la determinación de azúcares reductores en diferentes muestras biológicas.

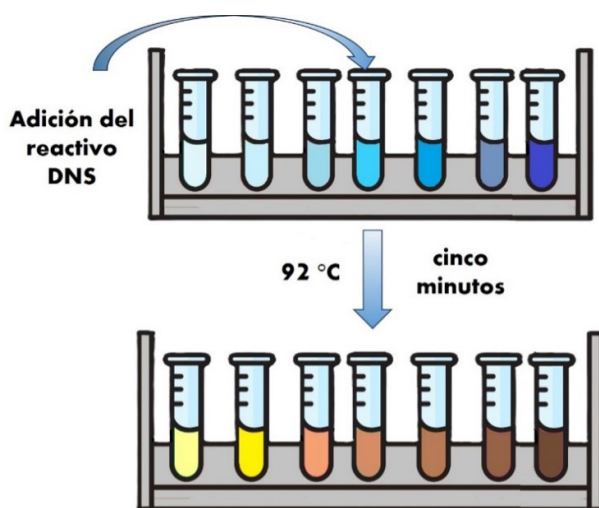


Figura 1. Método de Miller para cuantificar azúcares reductores. Muestras con cantidades crecientes de glucosa, reaccionan con el DNS y el calor para desarrollar un color amarillo-café en relación a su concentración.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de cuantificar la concentración de carbohidratos reductores, mediante el uso del método espectrofotométrico con DNS.

Actividades

- Elaborar la curva patrón de glucosa.
- Preparar las diluciones de cada una de las muestras problema.
- Adicionar el volumen adecuado de DNS a los tubos que contienen la curva patrón y a los que contienen las muestras problema.
- Calibrar el espectrofotómetro con el tubo blanco.
- Medir la absorbancia de cada uno de los tubos y anotar el valor.

Material y equipo

Material por equipo

- 14 Tubos de ensayo con tapón de rosca de 12 x 75mm
- 7 Tubos eppendorf
- 1 Espátula
- 1 Gradilla
- 1 Micropipetas de 1000 mL
- Puntas para micropipetas
- 1 Vaso de pp de 250 mL
- 2 Pipetas Pasteur
- 1 Pisseta con agua destilada
- 1 Pinza para tubo de ensayo
- 1 Espectrofotómetro
- 3 Celdas para espectrofotómetro
- 1 Parrilla de calentamiento
- 1 Cristalizador
- 1 Termómetro de -20 a 150 °C

Material proporcionado por los alumnos

- Refresco con azúcar
- Refresco sin azúcar
- Jugo de frutas.

Reactivos

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- NaOH
- Tartrato de Na-K

Procedimiento experimental

A. Preparación del reactivo DNS

1. Pesar 1.6g de NaOH, 43.8 g de tartrato de Na-K y 1.0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico.
2. Adicionar 50 mL de agua destilada a un vaso de precipitados y agregar el NaOH hasta disolver completamente.
3. Posteriormente, agregar el tartrato de Na-K lentamente hasta disolver por completo la solución mediante agitación magnética.
4. Adicionar el ácido 3,5-dinitrosalicílico, protegiendo el reactivo de la luz con papel aluminio.
5. Aforar la solución hasta 100 mL con agua destilada en un matraz aforado de 100 mL y dejar en agitación toda la noche en un frasco ámbar.

B. Preparación de la solución madre (solución stock) 3 mg/mL de glucosa

1. Pesar 0.3 g de glucosa y disolverlos en 50 mL de agua destilada.
2. Verter en un matraz aforado de 100 mL y aforar hasta la marca de aforo. Esta solución tiene una concentración final de 3 mg de glucosa por mL.

B. Determinación de la concentración de azúcares reductores en la curva patrón

1. Preparar 7 tubos de ensayo con tapón de rosca, cubrirlos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz y etiquetar de acuerdo con la concentración de glucosa.
2. Añadir a cada tubo, el volumen correspondiente de la solución madre de glucosa, de acuerdo con la Tabla 1.
3. Añadir 250 μ L de agua destilada a cada tubo.
4. Adicionar a cada tubo 250 μ L del reactivo DNS.
5. Colocar los tubos en un baño a 92 °C durante cinco minutos.
6. Transcurrido el tiempo, sacar cuidadosamente los tubos y colocarlos en un baño en hielo por cinco minutos
7. Agregar 2.5 mL de agua destilada a cada tubo y agitar
8. Finalmente ajustar el espectrofotómetro a 540 nm, ajustar con el tubo 1 (blanco) la absorbancia a cero y realizar la lectura de la absorbancia de cada uno de los tubos.
9. Anotar los valores en la tabla correspondiente (Tabla 3).

Tabla 1. Preparación de la curva patrón de glucosa

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Concentración final de glucosa (mg/mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Solución madre de glucosa μ L)	0	42	83	125	167	208	250
Agua destilada (μ L)	250	208	167	125	83	42	0
Reactivo DNS (μ L)	250	250	250	250	250	250	250
Incubar a 92 °C por cinco minutos							
Incubar en hielo durante 5 minutos y agregar 2.5 mL de agua destilada a todos los tubos							

C. Determinación de la concentración de azúcares reductores en las muestras

1. Diluir las muestras problema 1:250 con agua destilada.
2. Preparar 6 tubos con tapa de rosca cubiertos con papel aluminio.
3. Añadir 250 μ L de muestra problema diluida al tubo correspondiente, como se muestra en la tabla 2.
4. Adicionar 250 μ L del reactivo DNS.
5. Colocar los tubos en un baño maría a 92 °C por cinco minutos.

6. Sacar cuidadosamente los tubos y colocarlos en hielo durante cinco minutos.
7. Agregar 2.5 mL de agua destilada a cada tubo y agitar.
8. Realizar la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.
9. Anotar los valores en la tabla correspondiente (Tabla 4).

Tabla 2. Preparación de las muestras problema.

	Tubo					
	1	2	3	4	5	6
Muestra problema diluida (μL)	250	250	250	250	250	250
Reactivo DNS (μL)	250	250	250	250	250	250
Colocar a 92 °C por cinco minutos						
Incubar en hielo durante cinco minutos y agregar 2.5 mL de agua destilada a todos los tubos.						

Resultados

1. Anote los resultados de sus observaciones en las siguientes tablas:

Tabla 3. Absorbancias obtenidas de la curva patrón de glucosa.

Concentración Glucosa (mg/mL)	0	0.5	0.7	1.0	1.5	1.7	2.0
Absorbancia							

Tabla 4. Valores de absorbancia para cada una de las muestras.

Tubo	1	2	3	4	5	6
Tipo de muestra						
Absorbancia						

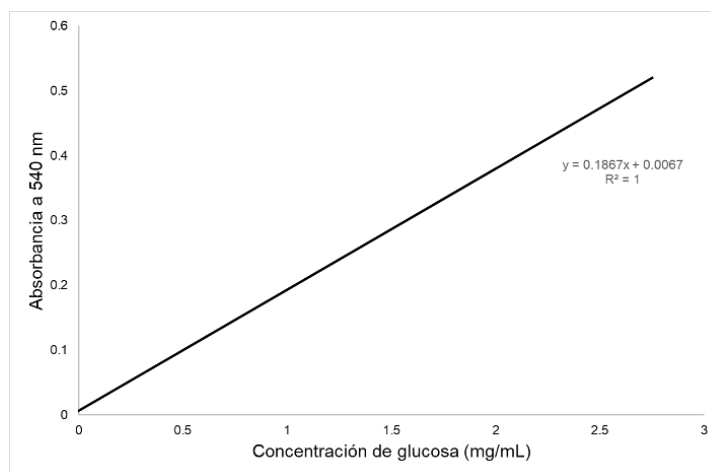


Figura 2. Ejemplo de una curva de calibración.

2. Con los datos obtenidos realizar una curva de calibración del patrón de glucosa, de acuerdo con el ejemplo de la figura 1. Colocar en el eje X los valores de concentración de glucosa y en el eje Y, los valores de las absorbancias. Para obtener la concentración de azúcares reductores, se puede interpolar los valores de absorbancias obtenidas de cada una de las muestras.
3. Realizar una regresión lineal a la curva de calibración, despejar la variable concentración en función de la absorbancia medida y obtener las concentraciones de carbohidratos en cada una de las muestras.

Análisis de resultados

1. Comparar la concentración de carbohidratos obtenida con la curva patrón con la obtenida con la regresión lineal. Indicar si estas concuerdan y si no es así mencionar por qué es de esta forma.
2. Cotejar la concentración de azúcar encontrada con las indicadas en las etiquetas de los productos que utilizaron como muestras.
3. Resaltar si las concentraciones corresponden con las indicadas para cada producto.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

Kennelly PJ, Botham KM., McGuinness O, Rodwel VW, Weil AP. Harper. Bioquímica ilustrada. 32 ed. Editorial McGraw Hill. 2023.

Burgos L. Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fundación Universidad de América. Revista de Investigación 13(1):58-66. 2020.

Rakus JF, Mahal LK. New technologies for glycomic analysis: toward a systematic understanding of the glycome. Annu Rev Anal Chem 4:367–92. 2011.

Cuestionario previo

1. ¿Qué es un carbohidrato reductor?
2. ¿Qué es un carbono anomérico?
3. Esquematiza la estructura de un carbohidrato reductor y uno no reductor
4. ¿Cuál es la relación que existe entre el valor de absorbancia y la intensidad del color de una muestra que se lee en un espectrofotómetro?
5. ¿Qué tipo de azúcar se presenta en los refrescos y jugos de frutas?

Práctica 7

Separación de pigmentos vegetales no polares por cromatografía en columna de adsorción

Introducción

La cromatografía en columna es una técnica empleada para la separación de los compuestos componentes de una mezcla. Se basa en la adsorción diferencial de los compuestos a una fase estacionaria (generalmente un gel de sílice o alúmina) y su afinidad por los solventes de una fase móvil (solventes polares y no polares). Su principal ventaja es el bajo costo y la obtención de los compuestos libres de restos de la fase estacionaria, y se puede aplicar para obtener cantidades de compuestos en el orden de microgramos. De manera general, los solventes fluyen a lo largo de la columna por el efecto de la gravedad, o puede acelerarse aplicando un gas comprimido.

La técnica fue inventada por el botánico ruso Mikhail Tsvet en 1900 y la empleó para separar los pigmentos fotosintéticos contenidos en las hojas de distintas plantas, que son utilizados por ellas para realizar la fotosíntesis. Por su estructura, algunos de estos pigmentos (clorofilas y carotenos, xantofilas y licopenos) son solubles en solventes orgánicos, lo que los hace fáciles de separar por esta técnica, a partir de un extracto vegetal. Al no poder interactuar adecuadamente con el agua, estos pigmentos vegetales tienden a disolverse mejor en solventes no polares, y serán esencialmente insolubles en medios acuosos. Las clorofilas son los pigmentos principales para la fotosíntesis, con una estructura tetrapirrólica con un átomo de magnesio al centro y se encuentran unidos a proteínas dentro de los cloroplastos. Los carotenoides, que incluyen a los carotenos, xantofilas y licopenos, pertenecen al grupo de los terpenos, lípidos formados por múltiples unidades de isoprenos, y son considerados como pigmentos accesorios que ayudan a la planta a recoger luz de longitudes de onda que la clorofila no puede absorber.

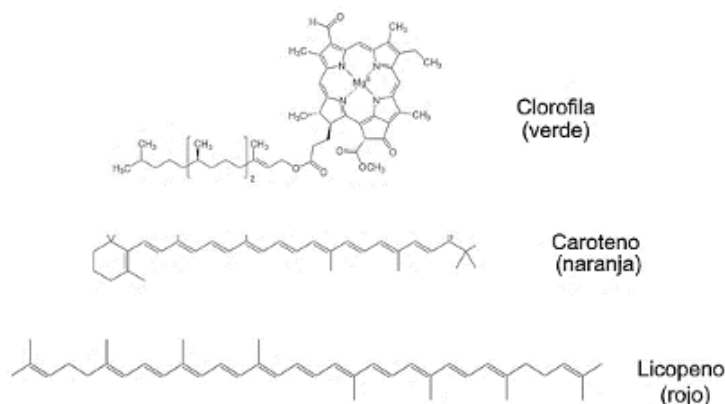


Figura 1. Ejemplos de pigmentos vegetales no polares. Los carotenos y los licopenos son lípidos pertenecientes al grupo de los terpenos.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de extraer pigmentos de diferentes tejidos vegetales y separarlos empleando la técnica de cromatografía de adsorción.

Actividades

- Extraer los pigmentos de diferentes tejidos vegetales. Cada equipo empleará una muestra diferente: flores, frutos u hojas de diferentes especies vegetales.
- Preparar la columna de cromatografía descendente.
- Correr la cromatografía empleando una mezcla de solventes como eluyente.
- Realizar una identificación tentativa de los pigmentos separados, por su coloración.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 Columna de vidrio de 15 cm de altura por 1 cm de diámetro
- 1 Mortero con pistilo
- 1 Embudo de vidrio
- 1 Embudo de separación
- 1 Vaso de precipitados de 100 mL
- 1 Vaso de precipitados de 50 mL
- 1 Pipeta Pasteur con bulbo
- 1 Soporte universal con anillo
- 1 Espátula pequeña
- 1 Pinza para bureta
- 1 Parrilla de calentamiento
- 1 Cristalizador
- Fibra de vidrio
- Un recipiente con hielo picado

Material proporcionado por los alumnos

- 100 g de muestras de tejidos vegetales que contengan pigmentos: lechuga, col, espinacas, apio, zanahoria, jitomate, brócoli, toronja, hojas de "pluma de indio" (*Stromanthe sanguinea*) o "sapito" (*Maranta leuconeura*).
- 4 Gasas de algodón
- 50 g de azúcar de repostería (azúcar glass)
- 10 g de azúcar granulada refinada
- 1 Colador de poro fino o un cernidor de harina

Reactivos

- Etanol
- Éter dietílico
- Éter de petróleo
- Hexano
- Sulfato de sodio
- Metanol

Soluciones proporcionadas por el profesor

- Mezcla de éter-metanol-hexano (45:15:5, v/v), 200 mL aproximadamente
- Mezcla de hexano-éter (2:3, v/v), 250 mL aproximadamente

El manejo de solventes orgánicos en un laboratorio de docencia requiere trabajar en campanas de extracción para evitar la inhalación de vapores tóxicos, utilizar siempre el equipo de protección adecuado, evitar el contacto con la piel y nunca succionarlos con la pipeta directamente con la boca, sino con el uso de una propipeta. Los solventes deben almacenarse en envases correctamente etiquetados, cualquier derrame debe limpiarse de inmediato y los residuos deben desecharse en contenedores especiales, de acuerdo con las normas de seguridad vigentes.

Procedimiento experimental

A. Extracción de pigmentos vegetales

1. Pesar 10 g del tejido vegetal seleccionado.
2. Cortar y macerar los tejidos vegetales con 10 mL de etanol en un mortero, en baño de hielo.
3. Agregar 10 mL más de etanol y 5 mL de éter y mezclar con el macerado.
4. Filtrar a través de 2 gasas colocadas en un embudo y recibir el filtrado en un embudo de separación.
5. Agregar 15 mL de la mezcla de solventes (éter-metanol-hexano, 45:15:5, v/v) y 25 mL de agua destilada.

6. Agitar suavemente y colocar el embudo de separación sobre un anillo en un soporte universal, y esperar a que se separen las fases acuosa y orgánica.
7. Colectar la fase orgánica, que queda en la parte superior del embudo, en un vaso de precipitados.
8. Agregar una pizca de cristales de sulfato de sodio.
9. Concentrar el extracto, por evaporación en una parrilla de calentamiento, hasta tener aproximadamente 1 mL de volumen final.

B. Preparación de la columna para cromatografía

1. Colocar un tapón de fibra de vidrio o algodón a la columna de cromatografía perfectamente seca.
2. Mezclar 2/3 de azúcar glass con 1/3 de azúcar granulada, en una cantidad necesaria para llenar la columna.
3. Cernir la mezcla de azúcares con un colador de malla fina o con un cernidor de harina.
4. Agregar el azúcar en porciones pequeñas y compactarla dando ligeros golpes, con cuidado, a la punta de la columna sobre la mesa de trabajo. Repetir el procedimiento hasta llenar la columna hasta un centímetro del borde superior. Tener cuidado de que no queden huecos o fracturas en el interior de la columna.
5. Colocar la columna en un soporte con ayuda de una pinza para bureta.



Figura 2. Tamizado de la mezcla de azúcares para obtener un granulado fino.

C. Desarrollo de la cromatografía

1. Agregar poco a poco el total del extracto de pigmentos por la parte superior de la columna, y posteriormente inicie la adición de la mezcla de hexano-éter (2:3, v/v). No permita que la columna se seque, continuando con la adición de solventes todo el tiempo.
2. Seguir agregando solventes hasta que se observe la separación de los pigmentos en distintas bandas coloridas. Si es necesario, desechar la mezcla de solventes, sin pigmentos, que sale por la parte inferior.

Resultados

1. Registrar en un esquema o en una fotografía los pigmentos separados. (Ver figura 3)
2. Elaborar una tabla con los resultados obtenidos por todos los equipos, en cuanto al número de bandas y colores obtenidos.

Análisis de resultados

1. Indicar el número y orden de los pigmentos obtenidos en la columna y tratar de identificarlos de acuerdo con referencias bibliográficas que indiquen los pigmentos contenidos en el tejido vegetal empleado.
2. Ordenar a los pigmentos obtenidos por el equipo de acuerdo con la velocidad a la que se desplazaron dentro de la columna, indicando cuáles son más polares y cuáles menos polares.
3. Comparar con los resultados obtenidos por otros equipos y determinar si alguno de los pigmentos se presentó en todas las muestras o si alguno de ellos fue exclusivo de algún tejido vegetal.

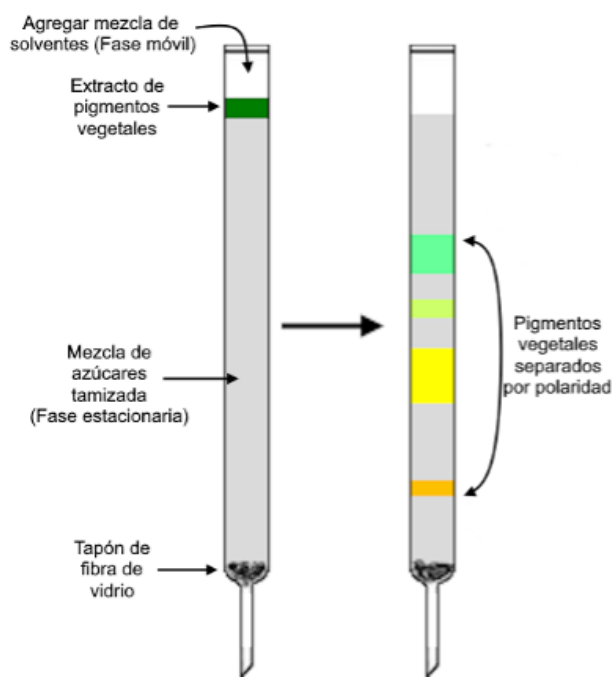


Figura 3. Columna de cromatografía de adsorción. Al inicio se coloca el extracto de pigmento y se comienza con la adición continua de la mezcla de solventes. Al final se observa la separación de los distintos pigmentos en diferentes bandas coloridas.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Dias AM, Ferreira ML. "Supermarket Column Chromatography of Leaf Pigments" Revisited: Simple and Ecofriendly Separation of Plant Carotenoids, Chlorophylls, and Flavonoids from Green and Red Leaves. *J Chem Educ.* 92:189-192. 2015.
- Katoch R. *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Springer Science & Business Media. 2011.
- Lottspeich F, Engels JW (eds). *Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology.* Wiley. 2018.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 7th edition. WH Freeman. 2017.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level.* 5th edition. Wiley. 2016.
- Wilson, ID, Poole CF. *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science.* Boston: Elsevier. 2009.

Cuestionario previo

1. Para este tipo de cromatografía, ¿cuál es la fase estacionaria y cuál la fase móvil?
2. Ordenar a los solventes empleados en función de su polaridad, del más polar al menos polar
3. Mencionar ejemplos de otros pigmentos vegetales que, por ser solubles en agua, no se recuperan con esta metodología.
4. Investigar la longitud de onda de la luz que es absorbida por los diferentes pigmentos vegetales.

Práctica 8

Extracción de ADN de células vegetales

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula de enorme importancia biológica, que se encuentra en todos los organismos vivos. El ADN está dentro de las células, en las procarionotas se encuentra disperso en el citoplasma, mientras que, en las células eucariotas, se localiza al interior del núcleo celular.

Estructuralmente, la molécula de ADN está formada por dos cadenas lineales formadas por los monómeros conocidos como nucleótidos unidos a través de enlaces fosfodiéster. Los nucleótidos están formados por un azúcar (desoxirribosa, en el caso del ADN), un grupo fosfato y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas son cuatro: adenina (A), timina (T), citosina (C), y guanina (G). Se conoce que las bases son complementarias debido a que para formar la doble hélice estas bases se forman pares de bases, así que la A se une a una T y la C se empareja a una G, en ambos casos mediante puentes de hidrógeno. Estas cadenas se enrollan sobre sí mismas formando una estructura de doble hélice, que confiere al ADN la capacidad de duplicarse de manera autónoma (Figura 1). El ADN es una molécula extremadamente larga, cuyo tamaño se mide en pares de bases (pb) o kilobases (kb).

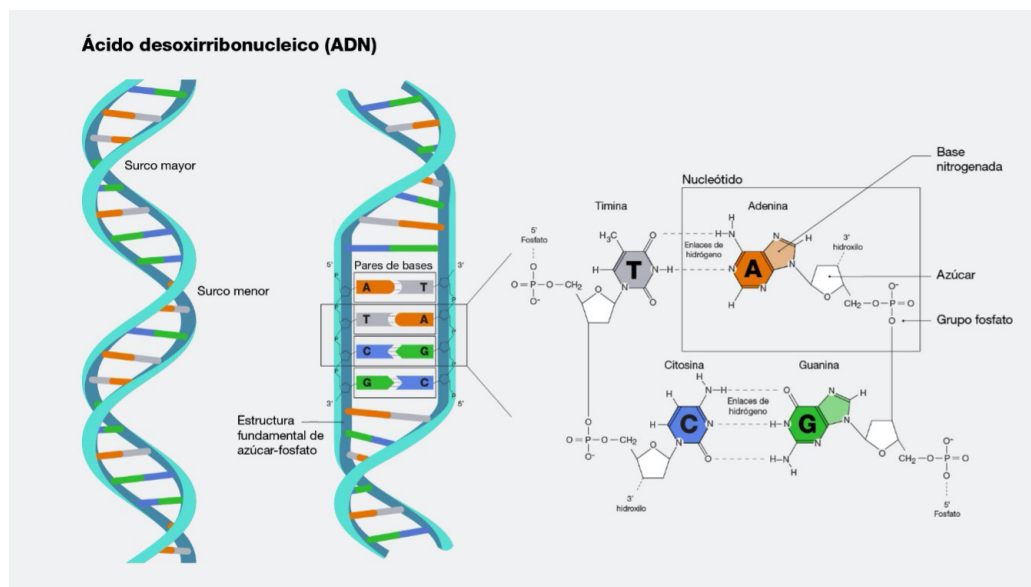


Figura 1. Estructura del Ácido desoxirribonucleico o ADN (Cortesía: National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ácido-desoxirribonucleico-ADN>).

La función del ADN es ser el depósito principal de la información genética de todos los seres vivos, es decir, contiene las instrucciones que determinan la forma y características de un organismo y sus funciones.

La aplicación de técnicas moleculares comienza con la extracción de ADN a partir de diferentes tipos de muestras. El éxito en la obtención de resultados confiables y reproducibles depende en gran medida de la obtención de un ADN de alta calidad. Esta calidad es determinada por el tipo de muestra, su manipulación, almacenamiento y el método de extracción de ADN usado. Aunque la cantidad de ADN de un organismo es igual y constante a través de sus células, la cantidad que se puede extraer difiere ampliamente entre los tipos de muestras. Existen diferentes métodos de extracción de ADN, depende para que se requiere el ADN el método a seleccionar. Un método de extracción de ADN ideal es corto, con un número mínimo de pasos y con reactivos que no sean nocivos para los investigadores y el ambiente.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN) de diferentes vegetales, utilizando un método sencillo de lisis celular y precipitación.

Actividades

- Pesar la cantidad requerida del producto vegetal a utilizar.
- Macerar perfectamente en el mortero.
- Adicionar las soluciones indicadas para la extracción.
- Observar cuidadosamente el ADN obtenido.

Material y equipo

Material por grupo

- Balanza de dos platos.
- Centrífuga
- 2 Palanganas con hielo

Material por equipo

- 1 Bisturí
- 1 Embudo
- 1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 1 Mortero con pistilo
- 1 Píseta con agua destilada
- 1 Pipeta graduada de 1 mL
- 1 Pipeta Pasteur.
- 1 Probeta de 100 mL
- 2 Tubos de centrífuga de 50 mL

Material proporcionado por los alumnos

- 50 g de fresa, kiwi o lechuga
- 3 sobres de gasa estéril

Reactivos

- Etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)

Soluciones

- Etanol etílico 96% frío
- NaCl 2 M
- SDS al 5%

Procedimiento experimental

1. En un mortero colocado en un baño de hielo adicionar 15 g de fresa, kiwi o lechuga.
2. Cortar con un bisturí en fragmento pequeños los productos vegetales a utilizar.
3. Triturar perfectamente hasta obtener una mezcla homogénea.
4. Agregar 25 mL de agua destilada, continuar macerando durante al menos dos minutos.
5. Colocar dos capas de gasa en un embudo de vidrio, poner el tallo del embudo dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 mL frío en el cual caerá el filtrado.
6. Filtrar la suspensión y adicionar otros 25 mL de agua destilada para enjuagar perfectamente el mortero.

7. Añadir al filtrado 50 mL de la solución de NaCl 2M y mezclar suavemente por agitación.
8. Adicionar 1 mL del detergente SDS y mezclar cuidadosamente, evitando que se forme espuma.
9. Dejar incubar en el baño de hielo durante 10 min.
10. Verter lentamente por las paredes del matraz Erlenmeyer 50 mL de etanol frío, para formar dos fases. Tener mucho cuidado de NO MEZCLAR las fases.
11. Incubar en hielo durante 10 min.
12. Con una pipeta Pasteur, tomar cuidadosamente el ADN de la interfase, de color blanquecino con una consistencia viscosa, y colocarlo en un tubo de centrifuga. Es muy importante observar cuidadosamente la consistencia de la interfase.
13. Centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 5 min y desechar el sobrenadante.
14. Adicionar 5 mL de agua destilada y disolver el precipitado (*pellet*).

Resultados

1. Describir la consistencia de la muestra de ADN obtenida.
2. Comparar con las muestras obtenidas por otros equipos que trabajaron con otros productos vegetales.

Análisis de resultados

Describir la consistencia de la muestra de ADN obtenida y compararla con la obtenida con otros productos vegetales.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología Molecular de la Célula. 5ª ed. Omega. España. 2008.
- González F, Martínez M B. Técnicas instrumentales en genética forense. Institución Fernando el católico. <http://77ifv.dpz.es>. 2001.
- Karp G. Biología Celular y Molecular, conceptos y experimentos. 7ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México. México. 2014.
- Osorio-Cadavid E, Ramírez M, López W A, Mambuscay LA. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. Revista Colombiana de Biotecnología, 11(1):125-131. 2009. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10339/10834>
- Salazar-Moscato YM, Martínez-Garro J, Guzmán-González PA, Plese T. Extracción de ADN usando métodos mínimamente invasivos en *Xenarthra* orden Pilosa, una contribución a su conservación. Actual Biol. 44(116): 1-10. 2022.

Cuestionario previo

1. ¿Cómo se puede conocer la pureza y calidad del DNA después de su aislamiento?
2. ¿Cuáles son las diferencias en la composición y estructura del DNA y el RNA?
3. Describe brevemente la función de cada una de las soluciones que se utilizan en este método de aislamiento de DNA.
4. Menciona al menos otros dos métodos de aislamiento de ADN.

Práctica 9

Separación de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

Introducción

La electroforesis (ἤλεκτρον [electrón] - ámbar, carga eléctrica y φόρησις [foresis] - transporte) es una técnica utilizada para separar polímeros biológicos con cargas eléctricas, como las proteínas y los ácidos nucleicos, mediante la formación de un campo eléctrico. La electroforesis consta de 2 componentes, un soporte o gel formado de polímeros que permitan el movimiento de las biomoléculas y un medio acuoso para generar el campo eléctrico. Los componentes más comunes para hacer los geles son la agarosa y la poliacrilamida, siendo la primera la que se utilizará en la presente práctica. La agarosa es un producto formado por monómeros de galactopiranosas (galactosa cíclica), que es extraída de las algas marinas y forma una matriz gelatinosa al gelificar o polimerizar. Para que se genere el medio que conduce los electrones se requiere que el gel esté inmerso (sumergido) en soluciones amortiguadoras que pueden ser de boratos (TBE; Tris, Borato de sodio, EDTA [ácido etilén diamino tetra acético]) o de acetatos (TAE; Tris, acetato de sodio, EDTA) debido a que son altamente iónicos.

Los ácidos nucleicos son biopolímeros que se denominan de acuerdo con la presencia del azúcar ribosa (ARN o ácido ribonucleico) o desoxirribosa (ADN o ácido desoxirribonucleico). Estas biomoléculas están formadas por monómeros denominados nucleótidos que contienen una de las siguientes bases nitrogenada: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) o uracilo (U), un azúcar (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato que les confiere carga eléctrica negativa a pH fisiológico. El ADN y el ARN se separan en el campo eléctrico debido a esta carga, con base en su peso molecular de manera inversamente proporcional (a mayor peso, menor migración). Otros factores que modifican la separación son la concentración de la agarosa (a mayor concentración, menor migración; ver Tabla 1) y la conformación del ácido nucleico (circular o lineal, monocatenario o bicatenario), lo que puede generar que 2 fragmentos de ADN del mismo peso molecular (cantidad de pares de bases), uno circular y uno lineal, migren de manera diferente, por lo que se denomina “peso molecular aparente”, pareciendo que la forma circular es más ligera (mayor migración) por tener mayor compactación.

Esta técnica es muy utilizada en la investigación básica en una gran cantidad de áreas, incluyendo el diagnóstico clínico y forense, detección de mutaciones, establecimiento de parentescos, etc.

Objetivo

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de realizar la separación de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN), utilizando la técnica de electroforesis en geles de agarosa.

Actividades

- Preparar la cámara de electroforesis.
- Preparar la muestra para electroforesis.
- Visualizar el ADN en el transiluminador.

Material y equipo

Material por grupo

- Cámaras para electroforesis de ácidos nucleicos.
- Fuentes de poder (1 para 2 cámaras).
- Fotodocumentador (Laboratorio Divisional de Biología Molecular, DCBS, UAM-I) o transiluminador de UV.
- Horno de microondas.

Material por equipo

- 1 micropipeta de 1 a 10 µL.
- 1 micropipeta de 10 a 100 µL.
- 1 micropipeta de 100 a 1000 µL.

- Puntas para las micropipetas: 1 a 10 μL (blancas); 10 a 100 μL (amarillas); 100 a 1000 μL (azules).
- Matraz Erlenmeyer de 125 mL (para preparación del gel de agarosa).

Material proporcionado por el alumnado

Guantes de látex o nitrilo del tamaño adecuado (deben quedar justos).

Reactivos

- Muestra de ADN (entregada por el profesorado: genómico, plasmídico, producto de PCR). Con la finalidad de hacer comparaciones, se puede incluir una muestra de ADN degradado.
- Agarosa grado Biología Molecular.
- Marcador de peso molecular.

Soluciones

- Solución TBE 0.5 X (se prepara a partir de la solución 5X).
- Solución TE (10mM Tris-HCl y 1mM EDTA).
- Solución de carga ("loading buffer") para ADN, concentrado (6X; azul de bromofenol, xileno de cianol y glicerol).
- Solución de tinción de ADN (GelRed® o GelGreen®).

Procedimiento experimental

A. Ensamblado de la cámara de electroforesis para ácidos nucleicos.

1. La cámara de electroforesis consiste en un contenedor para el amortiguador, una charola para formar el gel de agarosa y un dispositivo para formar los pozos, llamado "peine", con diferente número de "dientes", dependiendo del número de muestras que se van a separar (Figura 1). Todo debe estar completamente limpio y seco.
2. Para preparar el gel, en la charola se deben poner los soportes laterales y el "peine" en la posición donde quedarán los pozos para depositar. Ver:
<https://www.youtube.com/watch?v=NL1usCc0n38>
OBSERVACIÓN: La cámara de electroforesis se debe nivelar en forma horizontal para que el corrimiento sea correcto. Se puede usar un nivel o burbuja sobre una base ajustable.
3. Para preparar el gel de agarosa, pesar la cantidad de acuerdo con la concentración deseada (Tabla 1), en función del tamaño del ADN que se va a separar. En caso de que no se conozca el tamaño, se puede usar una concentración 1.0% (p/v), la cual permite separar ADN de 0.5 a 8 Kb.

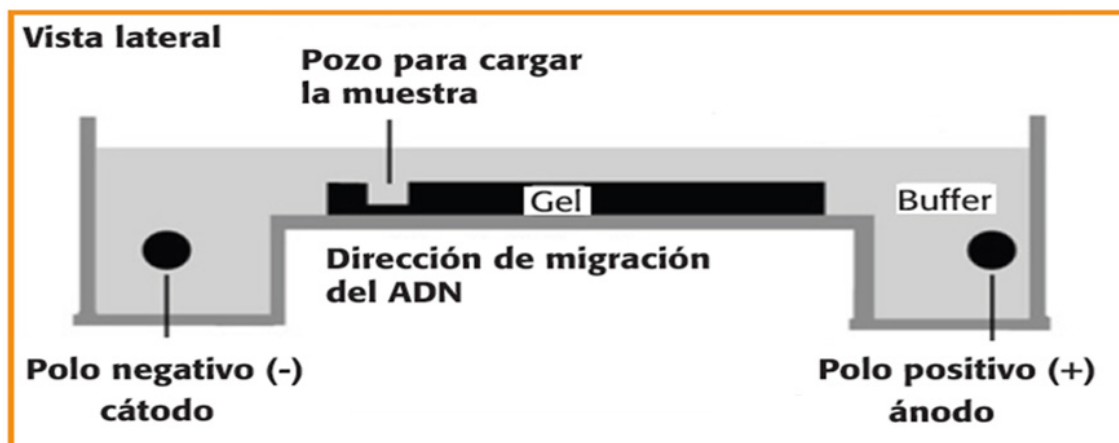


Figura 1. Vista lateral de la cámara de electroforesis para separar ácidos nucleicos en geles de agarosa, en forma vertical. La solución de corrimiento o buffer (TBE 0.5X) debe cubrir totalmente el gel. Las muestras de ADN tienen carga negativa (anión) por lo que migran al polo positivo (ánodo). Tomado del Manual de Laboratorio: Técnicas Básicas de Biología Molecular. UAM.

- La agarosa se pone en el matraz Erlenmeyer de 125 mL y se adiciona lentamente la cantidad calculada del buffer TBE 0.5X. Se agita ligeramente con un movimiento circular y se calienta en el horno de microondas (máximo poder, durante 90 segundos) hasta que quede transparente.
- Se deja enfriar la agarosa hasta que sea soportable al toque con la mano, de lo contrario se dañará la charola. Si se deja enfriar más tiempo, gelificará formando grumos y se deberá volver a calentar en el horno. Se vierte desde una esquina hasta que cubra la superficie de manera homogénea.
- Se puede ver que el gel ha polimerizado completamente cuando se ve translúcido. Para acelerar este proceso se puede poner en refrigeración por 10-20 minutos. Hasta que está completamente gelificado se puede retirar el peine, de lo contrario no se formarán adecuadamente los pozos y el corrimiento será deficiente.
- La solución de corrimiento electroforético (TBE 0.5X) se agrega a los contenedores laterales de la cámara hasta que se cubra completamente el gel. Se recomienda no agregar sobre el gel para que no se deforme (Figura 2).

Tabla 1. Dependiendo del peso molecular aparente del ADN que se va a separar se selecciona la concentración de agarosa. La distancia de migración del ADN es inversa al logaritmo de sus pesos moleculares (cuando es la misma conformación).

Los fragmentos de ADN con menor peso molecular se separan mejor cuando la concentración del gel de es mayor.

Concentración del gel de agarosa (% p/v)	Rango de peso molecular (pb)
0.3	50,000-5,000
0.5	25,000-2,000
0.7	10,000-800
1.0	8,000-500
1.2	5,000-400
1.5	3,000-200
2.0	2,000-100

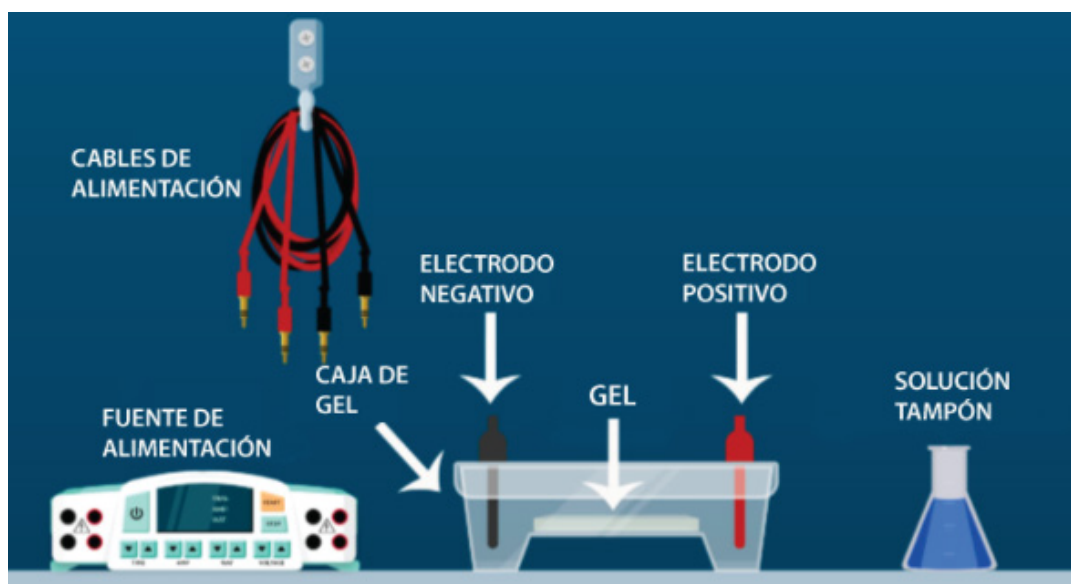


Figura 2. Cámara de electroforesis y fuente de poder usadas para separar fragmentos de ADN en geles de agarosa. La solución amortiguadora o tampón usada es TBE 0.5X. Tomado de Labxchange.

<https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:f4e1d795.html:1>

B. Preparación de la muestra para electroforesis

1. Se recomienda utilizar 1 µg del ADN proporcionado por el profesorado. Agregar 2 µL de solución de carga para ADN (6X) y el volumen recomendado del GelRed® o GelGreen® (Figura 3). Volumen máximo depende del tamaño de los pozos del gel, formados con el "peine". Se recomienda que no exceda 12 µL.
2. Antes de depositar la muestra en el pozo del gel, se recomienda lavar cada pozo pipeteando repetidamente sobre éste 150 µL de la misma solución de corrimiento (TBE 0.5X), usando la micropipeta de 100 a 200 µL (punta amarilla).
3. Las muestras se depositan en el gel con la micropipeta de 1-20 µL (punta blanca) tomando todo el volumen. Se recomienda sujetar firmemente la micropipeta con la mano dominante, apoyando el codo sobre la mesa, mientras la otra mano controla los movimientos de la mano con la micropipeta (Figura 4 y vídeo: <https://www.youtube.com/watch?v=NL1usCc0n38>). OBSERVACIÓN: Si la punta de la micropipeta tiene aire puede ocasionar que las burbujas saquen la muestra del pozo. Lo mismo sucederá si la muestra contiene etanol.
4. Se sugiere seguir la siguiente ubicación de las muestras: carril número 1, marcador de peso molecular para ADN; carril 2, de ser posible, dejarlo vacío; carriles subsecuentes, las muestras de acuerdo con la relación establecida previamente. Se recomienda que el proceso de depósito de muestras no sea mayor a 15 minutos, ya que éstas difunden en todas direcciones y se pueden juntar las de 2 carriles.
5. Una vez depositadas las muestras, se coloca la tapa de la cámara de electroforesis y se conectan los extremos de los electrodos a la fuente de poder. Es importante asegurar que no se cambien la polaridad (positivo con positivo [rojo] y negativo con negativo [negro]), ya que las muestras migrarán a la inversa y se saldrán del gel en unos minutos. La potencia dependerá del tamaño de la cámara (5V por centímetro lineal de electrodo a electrodo). Usualmente el voltaje usado es de 75 V para minicámaras de 15 cm.

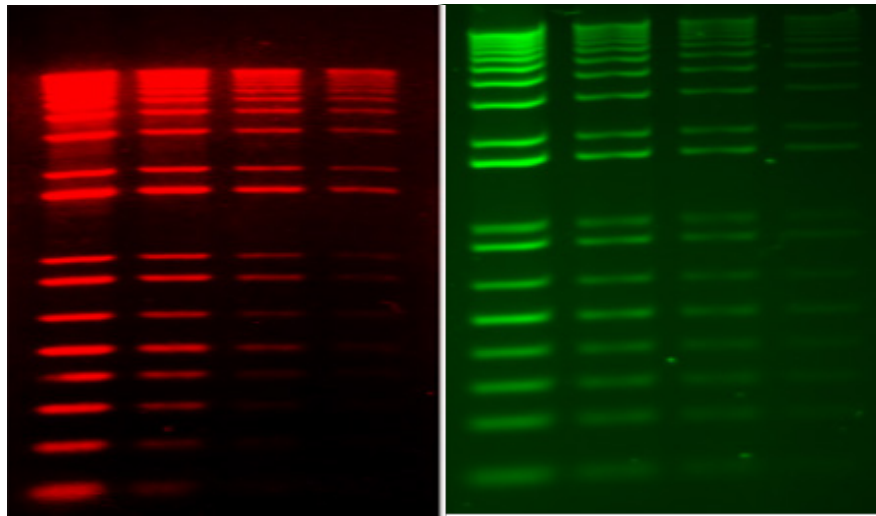


Figura 3. Geles de agarosa separando ADN de diversos pesos moleculares, teñidos con GelRed (izquierda) o GelGreen (derecha). Los fragmentos más pesados están cerca de los pozos y los de menor tamaño en el borde del gel. Para cada tinción se requiere un filtro diferente (Modificado de Biotium: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>).

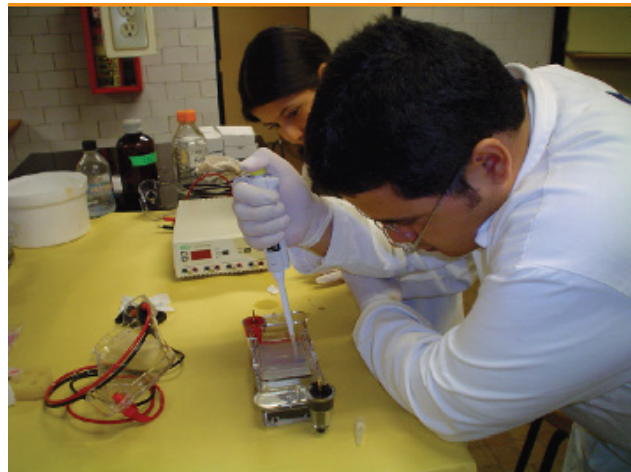


Figura 4. Para depositar las muestras de ADN en los pozos del gel de agarosa se debe apoyar el codo del brazo que tiene la micropipeta. La mano del brazo opuesto servirá para controlar los movimientos, sujetando el codo o la muñeca. Tomado del Manual de Prácticas: Técnicas Básicas de Biología Molecular. UAM.

C. Visualización del ADN

1. Apagar la fuente de poder una vez que haya terminado el tiempo de corrimiento electroforético. Éste depende del tamaño de la cámara y se deja hasta que el colorante más ligero (azul de bromofenol; 220 pb) alcance las 3 cuartas partes del gel, aproximadamente 45 minutos. El xileno de cianol (3030 pb) es más pesado y se verá en la parte superior.
2. Desconectar la fuente de poder y abrir la tapar para sacar el gel. Se debe tomar la charola donde está el gel de tal manera que no se mueva por un lado y se caiga.
3. Depositar el gel en el fotodocumentador (analizador de imágenes) para ácidos nucleicos del Laboratorio Divisional de Biología Molecular, DCBS, UAMI. Se debe utilizar el filtro adecuado con base en el colorante utilizado. En caso de que se utilice un transiluminador, se debe usar el equipo de protección adecuado (careta, gafas de protección, guantes, etc.)
4. Capturar la imagen procurando que esté enfocada y que las bandas se vean nítidas. Se recomienda guardar la imagen en formato jpg o tif.
5. El peso molecular aparente de las muestras se calcula mediante comparación con el marcador de peso molecular. En caso de hacerlo en el transiluminador hay que poner una regla de plástico para medir la distancia de corrimiento.
6. El gel se tira en el contenedor destinado para el desecho de los geles teñidos. **Nunca utilizar bromuro de etidio para teñirlo.**

Resultados

1. Primero se debe determinar si el corrimiento electroforético es adecuado, por lo que se debe comparar la imagen obtenida con las imágenes de la Figura 5, para determinar los posibles problemas que se presentaron en el procedimiento.
2. Con base en la distancia que presenta cada banda del marcador de peso molecular, medido mediante el fotodocumentador, se puede determinar el peso molecular aparente de las muestras (Figura 6).

Análisis de resultados

1. Analizar el corrimiento electroforético en el gel de agarosa. Si la imagen del gel no corresponde con el "gel ideal" se deberá señalar los posibles errores que se cometieron, cómo se observan los errores y qué se recomienda para evitarlos.
2. Discutir el peso molecular aparente obtenido para cada banda (muestra) y decir si corresponde a lo esperado (según su peso molecular en pares de bases).
3. Discutir cómo se puede determinar el peso molecular cuando no se tiene el marcador de peso molecular y fundamentar la respuesta.

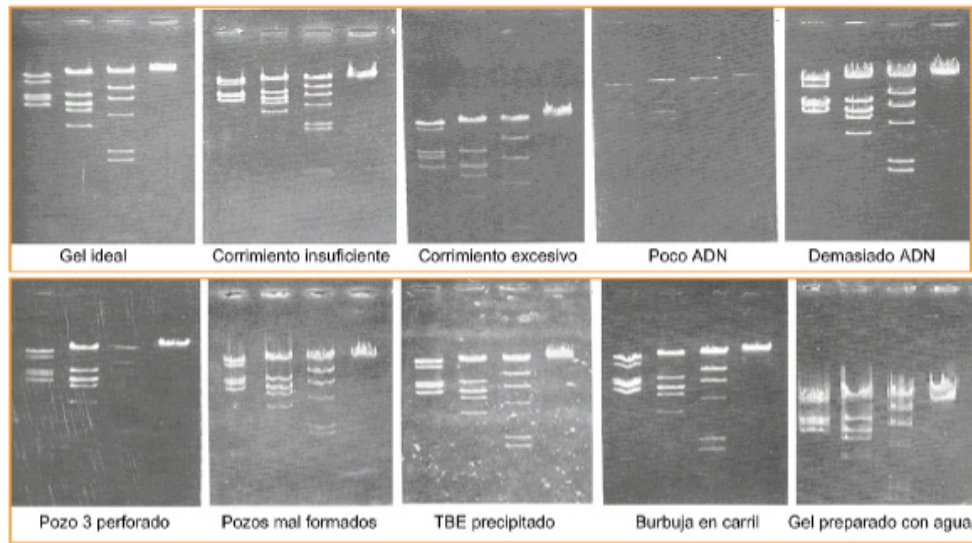


Figura 5. Ejemplos de algunos de los problemas que se presentan al realizar la electroforesis de ADN en geles de agarosa. (Modificado de Micklos *et al.*, 2003).

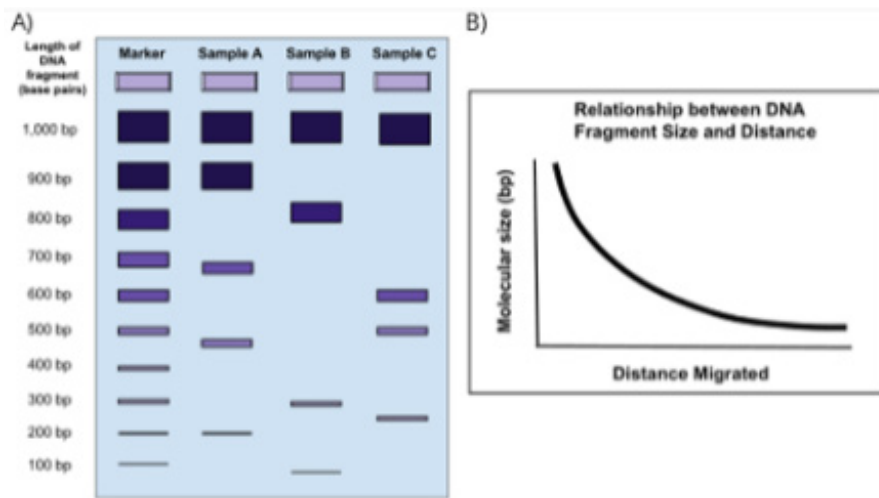


Figura 6. Relación entre la distancia recorrida del fragmento de ADN y la distancia de migración (<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/agarose-gel-electrophoresis-how-it-works-and-its-uses-358161>).

Conclusiones

Al realizar las conclusiones se recomienda:

1. Los factores que se deben tomar en cuenta para que la separación de los fragmentos de ADN sea exitosa: pureza del ADN, peso molecular, conformación (circular o linear), concentración del gel de agarosa, voltaje de corrimiento, concentración iónica, pH y temperatura del buffer de corrimiento.
2. Señalar los problemas que se presentaron en el desarrollo de esta práctica, en comparación con los reportados en la literatura.
3. Dar recomendaciones de lo que se debe hacer y lo que no para que se obtengan los resultados deseados.

Bibliografía

- Ausbel FM (Ed.). Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology. 2nd Edition. John Wiley & Sons, NY, USA. 2022.
- Avitia M, Aréchaga E, Bravo de la Garza AE, González de la Rosa CH, Le Borgne S. Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular. Editorial UAM, Unidad Cuajimalpa, DCNI, México. 2019. <http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/999/1/Manual%20de%20pr%C3%A1cticas%20de%20laboratorio%20de%20Biolog%C3%ADa.pdf>
- Brown TA. Essential Molecular Biology: A Practical Approach. Oxford Academic, Oxford. 2023. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199636426.001.0001>.
- Damián-Matsumura P, González-Núñez L, López-Yáñez L, Espino Rivera NY. Manual de Prácticas de Laboratorio. Técnicas básicas de Biología Molecular. Editorial UAM, Unidad Iztapalapa, DCBS, México. 2013. http://148.206.53.210/omp_cbs/index.php/cbs/catalog/book/38.
- Micklos DA, Freyer GA, Crotty DA. DNA Science. 4a. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 2009. https://archive.org/details/isbn_2900879696367

Páginas web.

- Agarose Gel Electrophoresis of DNA.
<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>.
- Beginning Molecular Biology Laboratory Manual.
<http://umbc7.umbc.edu/~jwolf/method1.html>.
- Biotium: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>.
- Cell and Molecular Biology Online – Protocols.
<http://www.cellbio.com/protocols.html>.
- Electroforesis en geles de agarosa, <https://www.youtube.com/watch?v=NL1usCc0n38>.
- Métodos y técnicas de Biología Molecular I.
http://mendel.ugr.es/seg/Docencia/programas/genmol/genetica_molecular_alcala2.html.
- Molecular Biology Procedures. Chisholm Lab, Northwestern University Medical School, EUA.
http://dicty.northwestern.edu/Chis_Lab/Lab%20Manual/molecular_biology.htm.

Cuestionario previo

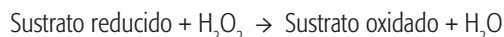
1. Describe cuál es el fundamento general de la electroforesis y cuáles son las características específicas de la separación de ácidos nucleicos en geles de agarosa, identificando la fase móvil y la estacionaria.
2. Realiza un cuadro comparativo donde se compare las diferencias entre el uso de geles de agarosa y de poliacrilamida, tomando en cuenta el tipo de ácidos nucleicos que se separan, la resolución, los tipos de cámaras y las precauciones de cada una.
3. Discute lo que podría suceder si se utiliza agua en lugar del buffer (tampón) TBE para el corrimiento electroforético.
4. Describe la forma en la cual se puede utilizar la Inteligencia Artificial (IA) para determinar el peso molecular de un fragmento de ADN y analizar los resultados de la electroforesis en geles de agarosa.
5. Obtén una imagen de la electroforesis en geles de agarosa, donde se separó ADN, explicando el resultado de forma sencilla y lo más detallado posible.

Práctica 10

Actividad enzimática de las peroxidasas

Introducción

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.



Se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos. De manera general, estas enzimas se denominan hemoproteínas, debido a que las peroxidasas de las plantas son glicoproteínas que contienen el grupo prostético hemo. Debido a que la actividad de las peroxidasas puede medirse fácilmente con sencillas reacciones cromogénicas, es utilizada como una enzima modelo en el estudio de estructura de proteínas, reacciones y función de otras enzimas, además de tener diversas aplicaciones biotecnológicas. Particularmente, el rábano picante (*Armoracia rusticana*) es la mayor fuente de peroxidasa (HRP, por sus siglas en inglés *horseradish peroxidase*) y es ampliamente utilizada en diferentes determinaciones entre las que se incluyen inmunoensayos enzimáticos utilizados tanto para el diagnóstico clínico como en la investigación y en la detoxificación de compuestos fenólicos de aguas residuales. Esta enzima tiene un peso de 40 kDa y su pH óptimo de acción se encuentra entre 5 y 7.

La actividad enzimática de las peroxidasas se puede medir de manera relativamente sencilla utilizando como sustrato guaya-col debido a que esta molécula tiene una estructura parecida a la de los sustratos endógenos de la enzima. Este es un método de detección sencillo debido a que cuando la enzima reacciona con el sustrato, el último es transformado en productos coloridos los cuales se leen en un espectrofotómetro lo cual permite visualizar directamente la actividad de la enzima mediante la cuantificación de la concentración del producto.

Objetivos

Que al finalizar la práctica el alumnado sea capaz de analizar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las peroxidasas obtenidas del rábano.

Actividades

- Obtener el extracto que contiene a las peroxidasas a partir de un macerado de rábano.
- Medir la actividad enzimática de las peroxidasas de células vegetales utilizando el espectrofotómetro.
- Utilizar un amortiguador a pH 8.5 para evaluar el efecto del pH en la actividad enzimática de las peroxidasas.
- Incubar el extracto enzimático en hielo y a 60 °C para verificar el efecto de la temperatura en la actividad de las peroxidasas.
- Evaluar cualitativamente el efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 mortero pequeño
- 2 tubos para centrífuga
- Micropipeta de 100 µL con sus puntas correspondientes
- Micropipeta de 20 µL con sus puntas correspondientes
- 3 celdas para espectrofotómetro
- 3 tubos de ensayo
- 1 caja de Petri
- Pinzas de disección
- 1 centrífuga

- 1 espectrofotómetro
- 1 parrilla de calentamiento

Material proporcionado por los alumnos

- Una botella de 100 mL de peróxido de hidrógeno
- 3 rábanos frescos
- Guayacol (ampolleta de solución inyectable de 100 mg de Guayacol)
- Una hoja para bisturí nueva o cortador de precisión ("cutter")

Reactivos

- Fosfato de sodio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico anhidro

Soluciones

- Amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.6
- Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.6
- Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8.5

Procedimiento experimental

A. Obtención de la enzima

1. Cortar 1 gr de rábano sin cáscara.
2. Fragmentar en pedazos más pequeños la muestra de rábano y colocar en un mortero pequeño.
3. Adicionar con 5.0 mL del amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.6 frío y macerar el tejido.
4. En un tubo de centrifuga, colocar el macerado.
5. Centrifugar durante 20 minutos a 4000 rpm. Es muy importante recordar la necesidad de equilibrar con un tubo con agua.
6. En un tubo de ensayo limpio, colocar el sobrenadante el cual es el extracto enzimático con el que se realizarán los siguientes pasos, y ponerlo en baño de hielo.

B. Medición de la actividad enzimática

1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 475 nm.
2. En una celda para espectrofotómetro, colocar 1 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.6. Esta solución será utilizada como blanco, es decir con este tubo ajustar el espectrofotómetro a una absorbancia de cero.
3. Adicionar a un tubo de ensayo: 4.5 mL del amortiguador de fosfato 50 mM a pH 6.6, 5 µL de la solución de guayacol y 100 µL del extracto enzimático (sobrenadante). Mezclar perfectamente en vórtex.
4. Colocar esta mezcla en una celda para espectrofotómetro.
5. Adicionar 50 µL de peróxido de hidrógeno al 3 %. Mezclar rápidamente en el vórtex y leer inmediatamente la absorbancia. Este es el tiempo cero.
6. Medir durante 5-10 minutos, dependiendo de la velocidad de la reacción, la absorbancia anotando los valores registrados cada 20 segundos.

C. Efecto del pH en la actividad enzimática

1. En una celda para espectrofotómetro, adicionar 1 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 8.5. Esta solución será utilizada como blanco, es decir con este tubo ajustar el espectrofotómetro a una absorbancia de cero.
2. En un tubo de ensayo, adicionar a 4.5 mL del amortiguador de fosfato 50 mM a pH 8.5, 5 µL de la solución de guayacol y 100 µL del extracto enzimático (sobrenadante). Agitar perfectamente en el vórtex. Colocar esta mezcla en una celda para espectrofotómetro.
3. Adicionar 50 µL de peróxido de hidrógeno al 3 %. Mezclar rápidamente y leer inmediatamente en el espectrofotómetro. Este es el tiempo cero.
4. Medir durante 5 minutos la absorbancia anotando los valores registrados cada 20 segundos.

D. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

1. Tomar una alícuota de 0.5 mL del extracto enzimático y calentarlo en baño maría con agua hirviendo, más de 90 °C durante 5 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
2. En una celda para espectrofotómetro adicionar 1 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.6. Esta solución será utilizada como blanco.
3. En un tubo de ensayo, adicionar a 4.5 mL del amortiguador de fosfato 50 mM a pH 6.6, 5 µL de la solución de guayacol y 100 µL del extracto enzimático del punto 1. Agitar en vórtex. Colocar esta mezcla en una celda para espectrofotómetro.
4. Adicionar 50 µL de peróxido de hidrógeno al 3%. Mezclar rápidamente y leer inmediatamente la absorbancia. Este es el tiempo cero.
5. Medir durante 5 minutos la absorbancia anotando los valores registrados cada 20 segundos.

E. Efecto de la temperatura en la actividad de la peroxidasa

1. Cortar tres cuadros del rábano sin cáscara de aproximadamente 1 cm por lado y con un grosor de aproximadamente 0.5 cm, ser cuidadosos con la navaja.
2. Adicionar en 3 tubos de ensayo 2.5 mL del amortiguador de fosfato 50 mM a pH 6.6.
3. Colocar a cada uno de los tubos un cuadro del rábano.
4. Colocar un tubo de ensayo con el amortiguador y el rábano en un vaso de precipitados con agua entre 80-90 °C durante 10 minutos.
5. Poner otro tubo en baño de hielo durante 10 minutos, anotar la temperatura.
6. Dejar el otro tubo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Transcurrido el tiempo sacar con unas pinzas los cuadros de rábano y colocarlos sobre una caja de Petri, cuidar que quede bien identificadas cada una de las muestras.
8. Adicionar cuidadosamente a cada una de las muestras de rábano 0.5 mL de peróxido de hidrógeno.
9. Anotar sus observaciones.

Resultados

1. Calcular la concentración del sustrato (guayacol).
2. Completar la tabla con los valores obtenidos:

Tiempo (seg)	Absorbancia (475 nm)		
	Amortiguador pH 6.6	Amortiguador pH 8.5	Incubación a 60 °C
0			
20			
40			
60			
80			
100			
120			
140			
160			
180			
200			
220			
240			
260			
280			
300			

3. Elaborar una gráfica con los datos de la tabla. Variable independiente tiempo, variable dependiente absorbancia.
4. Describir la acción de la peroxidasa de rábano después de colocar fragmentos de este a diferentes temperaturas

Análisis de resultados

1. Comparar la gráfica generada con los valores de absorbancia a pH 6.6 con las gráficas obtenidas con los datos de absorbancias a pH 8.5 y cuando se incubó el extracto a 60 °C.
2. Comentar si existen diferencias entre las tres gráficas, explicar a que se deben estas.

Conclusiones

Generadas por alumnos, de acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Callen JC. Biología celular: de las moléculas a los organismos. 1ª edición. Editorial CECSA. México. 2000.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42: 462-468. 2001
- Jiménez I, Rodríguez L. Manual de prácticas de Estructura y función celular II. Universidad Autónoma Metropolitana. Primera edición. 2011.
- Mathews C, Van Holde K, Ahern K. Bioquímica. 3ª edición. Editorial Addison Wesley. España. 2002.
- Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 65: 249-259. 2004.
- Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin. Struct. Biol.* 2:388-393. 1992.

Cuestionario previo

1. ¿Al interior de las células, dónde se encuentran las peroxidasas?
2. Esquematizar una reacción enzimática catalizada por las peroxidasas
3. Mencionar un método donde se utilicen las peroxidasas en investigación o aplicación clínica.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186,
Col. Leyes de Reforma 1ª Sección, Alcaldía Iztapalapa
C.P. 09310, CDMX.