



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

MANUAL DE PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA

Revisión 2026-B · Documento Académico Oficial

Actualizado y corregido por:
M.C. Carlos Montejo Dávila

Basado en el manual original de:
Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

Ciudad Juárez, Chihuahua, México — 2026

CRÉDITOS ACADÉMICOS Y REVISIÓN INSTITUCIONAL

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Instituto de Ciencias Biomédicas · Departamento de Ciencias Químico-Biológicas

Programa: Licenciatura en Biotecnología

Asignatura: Laboratorio de Bioquímica Metabólica

Autor del manual original (Rev. 2025): Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

Revisión, corrección pedagógica y adecuación técnica (2026-B): M.C. Carlos Montejo Dávila

Este documento constituye la versión definitiva corregida y validada para su uso en las sesiones prácticas del laboratorio. Queda prohibida su reproducción parcial o total no autorizada fuera del ámbito académico de la UACJ.

Nota de Bioseguridad Institucional:

El trabajo en el laboratorio de Bioquímica Metabólica se rige bajo el Reglamento General de Laboratorios del ICB y las normas de bioseguridad RPBI (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002). La asistencia a las prácticas requiere el uso obligatorio de bata blanca, lentes de seguridad y bitácora de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Práctica 1. Introducción al laboratorio de Bioquímica metabólica.....	5
Práctica 2. Extracción y detección de Biomoléculas.....	7
Práctica 3. Reacciones redox en las biomoléculas.....	11
Práctica 4. Determinación de la actividad de las enzimas y su papel en el metabolismo.....	15
Práctica 5. Degradación de almidón por la α -amilasa de distintas fuentes.....	19
Práctica 6. Transporte celular y preferencia de carbohidratos.....	23
Práctica 7. Cinética del transporte celular de carbohidratos.....	27
Práctica 8. Glucólisis.....	30
Práctica 9. Efecto de moduladores sobre la velocidad de una ruta metabólica.....	35
Práctica 10. Ciclo de Krebs.....	39
Práctica 11. Respiración aerobia.....	43
Práctica 12. Fotosíntesis.....	47
Práctica 13. Extracción y solubilidad de los lípidos.....	52
Práctica 14A. Metabolismo de los lípidos.....	56
Práctica 14B. Detección de cuerpos cetónicos.....	60
Práctica 15. Detección enzimática de urea.....	63

Práctica 1. Introducción al laboratorio de Bioquímica metabólica

◆ RECUADRO DE SEGURIDAD / PRECAUCIÓN

NOTA 2026-B: en los laboratorios de la UACJ la sesión de bioseguridad es un módulo común obligatorio (presentación Bioseguridad_Laboratorio_2026B.pptx). Esta práctica introductoria **se imparte como bioseguridad y no requiere cambios** en esta revisión; se conserva como referencia.

Propósitos

- Repasar los aspectos de seguridad y reglamento del laboratorio
- Conocer la dinámica de realización de las prácticas y su discusión
- Conocer los tipos de experimentos, representación de resultados y técnicas del laboratorio de bioquímica
- Conocer el contenido del manual
- Conocer la forma de elaboración y entrega de reportes
- Conocer el mecanismo de calificación

Introducción

El laboratorio de bioquímica metabólica no solo es un espacio para desarrollar conceptos de manera práctica y desarrollar destrezas técnicas; es también un espacio para reforzar competencias de seguridad e higiene y buenas prácticas de laboratorio, tanto en la manera de analizar, presentar y discutir los resultados, en donde se requieren habilidades matemáticas y analíticas.

Requerimientos

Estos requerimientos son necesarios para la realización de todas las prácticas en los laboratorios de bioquímica de la universidad.

#	Material
1	Reglamento de la UACJ de los laboratorios del ICB
1	Bata de laboratorio
1	Lentes de seguridad
1	Bitácora para laboratorio
1	Calculadora científica

Actividad 1. Reglas de seguridad e higiene

Leer y comprender el reglamento de seguridad e higiene de los laboratorios de prácticas del ICB (disponible en la plataforma del curso y en los tableros del laboratorio).

Actividad 2. Dinámica de las prácticas y mecanismos de evaluación

1. Dar a conocer la forma de llevar a cabo las prácticas y coordinarse para su elaboración en equipos de cuatro integrantes.
2. Dar a conocer los mecanismos de evaluación y entrega de reportes de laboratorio.

Actividad 3. Tipos de experimentos efectuados en el laboratorio de bioquímica

1. Exponer la dinámica general de aplicación del método científico en las prácticas del curso de bioquímica metabólica.
2. Mostrar los equipos del laboratorio (centrífugas, balanzas, cristalería, espectrofotómetros, entre otros): cómo se usan, para qué sirven y qué tipos de datos proporcionan.
3. Enseñar a realizar registros de pasos, procedimientos, resultados y observaciones durante las prácticas.
4. Enseñar los tipos de tendencias de datos habituales en bioquímica (líneas rectas, hipérbolas, exponenciales, entre otras), cómo se analizan y qué información paramétrica proporcionan, así como su incorporación a bitácoras y reportes con paquetes de cómputo adecuados.
5. Enseñar la forma internacional y estándar de reportar resultados en revistas del área bioquímica (por ejemplo, la guía de autores de *Biochemical Journal*).

Práctica 2. Extracción y detección de Biomoléculas

Propósitos

- Aprender un procedimiento general para extraer biomoléculas de diversas matrices biológicas
- Aprender una estrategia metodológica para detectar una biomolécula metabólicamente relevante

Introducción

Contar con un método para la extracción de moléculas biológicas pequeñas (menos de 5000 Da) de la fracción celular soluble es esencial para evaluar y monitorear el estado metabólico de los organismos. Se realiza una extracción acuosa en la que las células se lisan por calor; esta lisis libera el contenido celular, que posteriormente se separa por peso mediante centrifugación. Las biomoléculas solubles se obtienen en la fracción del sobrenadante. Aquí se detectan los carbohidratos reductores y los aminoácidos y aminas libres. El procedimiento también puede emplearse para valorar otras familias de biomoléculas o una específica.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Espátula	100 mL	Amortiguador de acetato de amonio 5 mM pH 8.0
1	Balanza analítica	1	Piseta con agua destilada
1	Vortex (por todo el grupo)	1	Reactivo de Fehling A en gotero
1	Baño maría a 80 °C (para todo el grupo)	1	Reactivo de Fehling B en gotero
1	Baño maría en ebullición (para todo el grupo)	1	Reactivo de ninhidrina en gotero
1	Centrífuga para tubos de 15 mL	1	Glucosa al 1 % en gotero
1	Cubo con hielo	1	L-lisina al 1 % en gotero

#	Material	#	Reactivo
2	Gradillas para tubos		
16	Tubos de ensayo de 10 mL		
3	Vasos de precipitados de 50 mL		
1	Micropipeta de 1000 µL		
1	Pipeta de 2 mL y pro-pipeta		
3	Pipetas Pasteur		
1	Marcador indeleble de punta fina		
1	Platina de calentamiento		
1	Pinzas para tubo de ensayo		
1	Mortero con pistilo		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Sobre de levadura Tradipan® (para todo el semestre)
1	Bolsa de hielo (para todo el grupo)
100 g	Carne molida de res fresca (para todo el grupo)
100 g	Semillas de calabaza, de preferencia sin tostar (para todo el grupo)

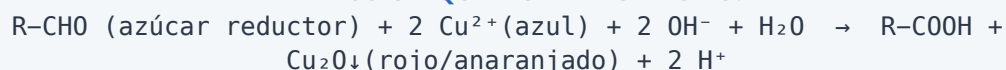
Reacción química que estaremos observando (didáctica)

Lo que percibimos: en esta práctica los extractos de levadura, carne y semilla contienen una mezcla de biomoléculas. Usamos dos reacciones de color para "descubrir" cuáles están presentes.

1. Prueba de Fehling → detecta azúcares reductores

El reactivo de Fehling contiene Cu^{2+} (azul) en medio alcalino. Los azúcares reductores (glucosa, fructosa, maltosa) tienen un grupo aldehído o cetona libre capaz de ceder electrones:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



- **Antes:** solución azul (Cu^{2+} disuelto).
- **Después de hervir:** si hay azúcar reductor, el Cu^{2+} se reduce a Cu^+ y precipita como **Cu_2O rojo ladrillo**.
- **Interpretación:** el viraje de azul → rojo nos dice "aquí hay azúcares reductores". El control positivo (glucosa) siempre da rojo; el negativo no.

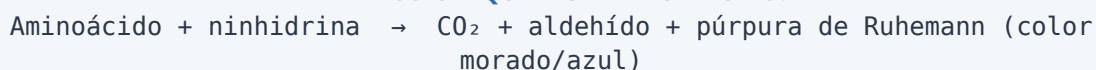
◆ NOTA ACADÉMICA

¿Por qué "reductor"? Porque el azúcar dona electrones (se oxida) y el cobre los acepta (se reduce). No todos los azúcares lo hacen: la sacarosa, por ejemplo, no tiene extremo reductor libre.

2. Prueba de ninhidrina → detecta aminoácidos y aminas libres

La ninhidrina reacciona con el **grupo amino ($-\text{NH}_2$)** libre de aminoácidos. El producto, llamado **púrpura de Ruhemann**, absorbe luz en la zona azul/verde:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



- **Antes:** solución incolora o amarillenta.
- **Después de hervir:** si hay aminoácidos libres, aparece un color **morado**.
- **Interpretación:** amarillo → morado = "hay aminoácidos libres". La prolina/hidroxiprolina son excepción (dan amarillo), pero no esperamos eso en estas muestras.

3. ¿Por qué el baño a 80 °C en la extracción?

El calor **lisis** las células (rompe membranas) y libera el contenido soluble. La centrifugación separa por peso: arriba quedan las biomoléculas solubles (sobrenadante) y abajo los restos celulares. No usamos detergentes ni solventes orgánicos: es una extracción acuosa simple y "suave".

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / FUNDAMENTO

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** (interactomamodular.com) hay guías de biomoléculas (introducción, carbohidratos, aminoácidos y proteínas, isomerías de carbohidratos) para repasar los fundamentos:

<https://interactomamodular.com/assets/guias/biomoleculas-introduccion.pdf>,
<https://interactomamodular.com/assets/guias/biomoleculas-carbohidratos.pdf>,
<https://interactomamodular.com/assets/guias/biomoleculas-aminoacidos-proteinas.pdf>.

Procedimientos

Actividad 1. Extracción de biomoléculas a partir de levadura (Tradipan®)

1. Pesar 5 g de levadura de pan marca Tradipan® y mezclar en un vaso de precipitado con 20 mL de amortiguador de acetato de amonio 5 mM (pH 8.0) precalentado a 80 °C.
2. Dividir el contenido en dos tubos de ensayo de 15 mL, de plástico, asegurando que ambos tengan el mismo peso.
3. Incubar los tubos en baño maría a 80 °C por 10 minutos, agitándolos suavemente cada 2 minutos.
4. Centrifugar a máxima velocidad (3500–6000 rpm) por 10 minutos.

◆ RECUADRO DE SEGURIDAD / PRECAUCIÓN

SEGURIDAD (levadura activada): durante la incubación y especialmente al centrifugar, la levadura puede generar presión interna en el tubo. **Libere la presión abriendo ligeramente la tapa** antes y después de centrifugar para evitar que el tubo se reviente.

5. Recuperar el sobrenadante, decantando el contenido en tubos limpios, secos y previamente rotulados como *extracto de biomoléculas de levadura*.
6. Colocar los tubos en hielo hasta su uso.

Actividad 2. Extracción de biomoléculas a partir de tejido animal (carne de res molida)

1. Pesar 5 g de carne molida de res fresca y mezclar en un vaso de precipitado con 20 mL de amortiguador de acetato de amonio 5 mM (pH 8.0) precalentado a 80 °C.
2. Dividir el contenido en dos tubos de ensayo de 15 mL, de plástico, asegurando que ambos tengan el mismo peso.
3. Incubar los tubos en baño maría a 80 °C por 10 minutos, agitándolos suavemente cada 2 minutos.
4. Centrifugar a máxima velocidad (3500–6000 rpm) por 10 minutos.

5. Recuperar el sobrenadante, decantando en tubos limpios, secos y rotulados como *extracto de biomoléculas de carne*.

6. Colocar los tubos en hielo hasta su uso.

Actividad 3. Extracción de biomoléculas a partir de tejido vegetal (semillas de calabaza sin cocinar)

1. Pesar 5 g de semilla sin cáscara y agregar en un mortero con 20 mL de amortiguador de acetato de amonio 5 mM (pH 8.0) precalentado a 80 °C.

2. Macerar con la ayuda de un pistilo hasta obtener un homogenizado. *(También puede homogenizarse en vaso de precipitado; el mortero se usa para macerar con el buffer a temperatura.)*

3. Dividir el contenido en dos tubos de ensayo de 15 mL, de plástico, asegurando que ambos tengan el mismo peso.

4. Incubar los tubos en baño maría a 80 °C por 10 minutos, agitándolos suavemente cada 2 minutos.

5. Centrifugar a máxima velocidad (3500–6000 rpm) por **10 minutos** *(si la maceración previa fue incompleta, el tiempo puede extenderse hasta 30 minutos)*. En el tubo deben apreciarse tres fases:

- un **precipitado** con los componentes celulares insolubles y de alto peso molecular;
- un **sobrenadante** con los componentes solubles, incluidas las biomoléculas y biomacromoléculas solubles;
- un **floculante** con la fracción lipídica de la semilla.

6. Recuperar el sobrenadante decantando (o con una pipeta Pasteur) en tubos limpios, secos y rotulados como *extracto de biomoléculas de semillas*.

7. Colocar los tubos en hielo hasta su uso.

Actividad 4. Detección de carbohidratos reductores (Fehling)

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota sobre los reactivos de Fehling: el reactivo **Fehling A** (sulfato de cobre en medio ácido) y el **Fehling B** (tartrato de sodio y potasio en medio alcalino) se mezclan para detectar azúcares reductores. **Cada tubo recibe 5 gotas de Fehling A y 5 gotas de Fehling B**, incluidas las muestras problema y los controles.

1. Acomodar cinco tubos de ensayo en una gradilla y pipetear los componentes:

Tubo	Rótulo	Amortiguador de acetato de amonio (mL)	Estándar de glucosa 1 % (mL)	Extracto (mL)	Fehling A	Fehling B
1	Control negativo	1	—	—	5 gotas	5 gotas
2	Control positivo	—	1	—	5 gotas	5 gotas
3	Biomoléculas de levadura	—	—	1	5 gotas	5 gotas
4	Biomoléculas de carne	—	—	1	5 gotas	5 gotas
5	Biomoléculas de semilla	—	—	1	5 gotas	5 gotas

2. Observar los cambios físicos en las muestras.

3. Colocar los tubos en baño maría en ebullición por cinco minutos y, transcurrido el tiempo, con unas pinzas para tubo colocarlos nuevamente en la gradilla, ordenados como se indica en la tabla.

4. Permitir que los tubos se enfríen por cinco minutos a temperatura ambiente y realizar observaciones físicas: color, turbidez, formación de precipitados. **Un cambio de color de azul a rojo indica presencia de azúcares reductores.**

5. Documentar las diferencias, resaltando las intensidades de color respecto a los controles negativo y positivo.

Actividad 5. Detección de aminoácidos libres (ninhidrina)

1. Acomodar otros cinco tubos de ensayo en una gradilla y pipetear los componentes:

Tubo	Rótulo	Amortiguador de acetato de amonio (mL)	Estándar de lisina 1 % (mL)	Extracto (mL)	Ninhidrina
1	Control negativo	1	—	—	5 gotas

Tubo	Rótulo	Amortiguador de acetato de amonio (mL)	Estándar de lisina 1 % (mL)	Extracto (mL)	Ninhidrina
2	Control positivo	—	1	—	5 gotas
3	Biomoléculas de levadura	—	—	1	5 gotas
4	Biomoléculas de carne	—	—	1	5 gotas
5	Biomoléculas de semilla	—	—	1	5 gotas

2. Colocar los tubos en baño maría en ebullición por cinco minutos y, transcurrido el tiempo, con unas pinzas para tubo colocarlos nuevamente en la gradilla.

3. Permitir que los tubos se enfríen por cinco minutos a temperatura ambiente y realizar observaciones físicas: color, turbidez, formación de precipitados. **Un cambio de color de amarillo a morado indica presencia de aminoácidos libres.**

4. Documentar las diferencias, resaltando las intensidades de color respecto a los controles negativo y positivo.

Actividad 6. Discusión

1. Discutir las diferencias entre los resultados de las distintas matrices biológicas.
2. Inferir si las diferencias pueden explicarse por la abundancia de biomoléculas reportadas en la literatura para las matrices analizadas.
3. Discutir cómo puede utilizarse este procedimiento de forma rutinaria en un laboratorio de biotecnología durante la producción de algún biológico de interés comercial y describir o proponer un método para realizar cuantificaciones más precisas.

Práctica 3. Reacciones redox en las biomoléculas

Propósitos

- Aprender un método sencillo para medir reacciones de transferencia de electrones
- Comparar el potencial redox relativo de las biomoléculas

Introducción

Las reacciones redox constituyen un tipo importante de transformaciones químicas que ocurren no solo en las células sino en toda la naturaleza. En estas reacciones, un compuesto con el potencial redox adecuado (agente reductor) le dona electrones a otro que actúa como agente oxidante. En el catabolismo, las biomoléculas que alimentan estas rutas les ceden electrones a otras o a portadores de grupo (NAD(P), FAD, FMN). Los carbohidratos, aminoácidos y lípidos constituyen un grupo importante de biomoléculas que alimentan el catabolismo. En esta práctica se demuestra el potencial reductor directo que tienen estas moléculas mediante una reacción entre estas y un aceptor general llamado azul de metileno. Este indicador pierde el color al recibir electrones y lo recupera cuando se reoxida. El tiempo del cambio y recuperación de color está relacionado directamente con el potencial redox del agente reductor.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Balanza granataria	50 mL	Amortiguador PBS recién preparado y filtrado
1	10 cm de papel parafilm	5 mL	Solución de glucosa al 1 % (p/v)
1	Micropipeta de 1 mL	5 mL	Solución de fructosa al 1 % (p/v)
1	Micropipeta de 200 µL	5 mL	Solución de citrato al 1 % (p/v)
1	Caja de puntas azules y una de amarillas	5 mL	Solución de histidina al 1 % (p/v)
8	Pipetas de 5 mL y propipetas	5 mL	Solución de cisteína al 1 % (p/v)
12	Tubos de ensayo	5 mL	Solución de tirosina al 1 % (p/v)

#	Material	#	Reactivo
1	Gradilla para tubos	10 mL	Solución de azul de metileno en etanol (0.005 g/50 mL de metanol)
1	Vaso de precipitado	5 mL	Estándar de colesterol
2	Pipetas Pasteur	10 mL	Solución de KOH 2 M
		5 g	KOH
		5 g	L-glucosa
		5 g	Almidón
		5 g	Sacarosa

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
100 g	Carne molida fresca (para todo el grupo)
10 mL	Aceite de olivo
1	Huevo de gallina (en caso de que no esté disponible el estándar de colesterol; se recomienda traer uno por equipo)

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota sobre estándares: los reactivos estándar suelen proporcionarse en el laboratorio. El **huevo de gallina** y el **aceite de olivo** sirven para evaluar la capacidad reductora de los lípidos; el huevo es la fuente alternativa del estándar de colesterol, por lo que se recomienda que cada equipo traiga uno por si no hay estándar disponible.

Reacción química que estaremos observando (didáctica)

Lo que percibimos: un ciclo de color que se "apaga" y "prende" dentro del tubo. Ese vaivén es una reacción redox completa y es lo mismo que hacen las células para mover electrones.

El indicador: azul de metileno (AM)

El azul de metileno es un colorante que puede existir en dos formas:

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**



- **Forma azul** = oxidado (aceptó/retiene capacidad de aceptar electrones).
- **Forma incolora** = reducido (ya recibió electrones y un protón).

Lo que pasa paso a paso:

1. La biomolécula (glucosa, fructosa, sacarosa, aminoácido, lípido) actúa como **agente reductor**: le dona electrones al azul de metileno.
2. Al donar electrones, el AM se reduce y **pierde el color** (azul → incoloro).
3. Si agitamos el tubo, entra **O₂ del aire**; el O₂ es un oxidante más fuerte y le quita los electrones al AM reducido, **regresando el color azul**.
4. Al reposar, el O₂ disuelto se consume y el azul desaparece otra vez. Agitar de nuevo → azul otra vez.

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**



¿Qué medimos? El **tiempo** que tarda en perder el color y el número de ciclos que soporta antes de agotarse el donador de electrones. A mayor potencial reductor de la biomolécula (o mayor cantidad), más rápido/ciclos.

¿Por qué el KOH (hidróxido de potasio)?

En la Actividad 1 el KOH mantiene el medio **alcalino**. En condiciones básicas, los azúcares se enolizan más fácilmente y donan electrones con mayor velocidad (mayor poder reductor aparente). Por eso en los tubos con tejido (Actividad 3) no hace falta: la carne tiene enzimas y metabolitos que ya proveen la reducción.

¿Por qué el papel parafilm?

El O₂ es parte de la reacción: si dejamos el tubo abierto, el azul no se apaga (el oxígeno reoxida continuamente). Al sellar, limitamos el O₂ disponible y podemos observar la alternancia. **No tapar con el dedo**: el KOH es corrosivo.

◆ **ASPECTO DIDÁCTICO / FUNDAMENTO**

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** está la guía de **reducción metabólica** con

fundamentos de transferencia de electrones:

<https://interactomamodular.com/assets/guias/practica3-reduccion-metabolica.pdf>.

Procedimiento

Actividad 1. Oxidación de carbohidratos

1. Agregar 0.1 g de hidróxido de potasio en un tubo de ensayo. **Precaución:** el hidróxido es corrosivo.
2. Agregar al tubo 3 mL de agua destilada y 0.1 g de L-glucosa y agitar hasta que se disuelvan los sólidos.
3. Agregar de **5 a 20 µL** de solución de azul de metileno, agitar y observar los cambios en el color.

◆ NOTA ACADÉMICA

Verificación de concentración: el color no debe ser demasiado intenso, de lo contrario tardará más en observarse el cambio. Si el viraje no se ve, ajustar el volumen (más azul de metileno lo hace más visible, pero demasiado impide apreciar el cambio).

4. Tapar el tubo con papel parafilm. El oxígeno está involucrado en la reacción, por lo que es indispensable tapar el tubo. **No tapar con el dedo**, ya que el hidróxido produce quemaduras.
5. El color debe desaparecer en unos segundos; anotar el tiempo que tarda en perder el color y el tiempo que tarda en recuperarse nuevamente, después de agitar el tubo unos segundos.
6. Agitar otra vez el tubo de forma vigorosa para permitir que el aire atrapado en el tubo se disuelva en la solución.
7. El color azul debe regresar debido a la oxidación del azul de metileno y, después de unos 30 s, se debe perder el color porque el oxígeno disuelto se consumió en la reacción. Entre más se agite, más debe durar el color azul.
8. Este fenómeno se puede repetir unos 20 ciclos, hasta que se consuma toda la glucosa.
9. Repetir el procedimiento en otros tubos, usando en uno sacarosa, en otro fructosa y en otro almidón.
10. Comparar los tiempos requeridos para observar los cambios en el color y los ciclos en los que se observa el viraje.

Actividad 2. Oxidación de aminoácidos y lípidos

1. Pipetear los siguientes componentes en cinco tubos, en el orden en que aparecen en las columnas:

Tubo	mL de KOH	μL de azul de metileno	1 mL de estándar
1	2.5	5–20	Histidina
2	2.5	5–20	Cisteína
3	2.5	5–20	Tirosina
4	2.5	5–20	Aceite de olivo
5	2.5	5–20	Colesterol

Control negativo (sin biomolécula): un tubo con 2.5 mL de KOH, 5–20 μL de azul de metileno y **sin estándar** (solo el buffer), para comparar el viraje.

2. Una vez pipeteadas las biomoléculas, medir el tiempo en que tarda en desaparecer y reaparecer el color, de forma similar a lo realizado en la Actividad 1.

3. Comparar y discutir los resultados.

Actividad 3. Efecto de un tejido biológico sobre la reacción redox del azul de metileno

1. Agregar 1 g de tejido muscular (carne molida de res cruda) a cuatro tubos de ensayo.

2. Adicionar 4 mL de amortiguador de fosfatos (PBS 1x) a cada tubo.

3. A uno agregar 1 mL de glucosa, a otro 1 mL de fructosa, a otro 1 mL de solución de citrato de sodio y a otro 1 mL de agua.

4. Incubar la reacción por 10 minutos y agregar después 5–20 μL de azul de metileno y agitar por 10 segundos.

5. Realizar varios ciclos de agitación por 5 minutos o hasta observar cambios en la coloración del azul de metileno y comparar resultados. En estos tubos no se espera una desaparición total del color, ya que la sangre del tejido produce un color de fondo, pero sí se espera un cambio en la intensidad del color.

6. Inferir por qué en estos tubos no es necesario agregar hidróxido de potasio.

Actividad 4. Discusión

1. Discutir las diferencias entre los resultados de las distintas biomoléculas.

2. Inferir por qué en la muestra de tejido biológico se observa un cambio sin necesidad de agregar hidróxido de potasio.

3. Discutir cómo puede utilizarse este procedimiento de forma rutinaria en un laboratorio de biotecnología durante la producción de algún biológico de interés comercial.

Práctica 4. Determinación de la actividad de las enzimas y su papel en el metabolismo

Propósitos

- Aprender a monitorear el curso temporal de una reacción bioquímica
- Aprender una estrategia metodológica para determinar la velocidad inicial de las reacciones
- Aprender a expresar la actividad de las enzimas en unidades internacionales y actividad específica

Introducción

Las reacciones bioquímicas tienen dos aspectos fisicoquímicos importantes: el termodinámico y el cinético. El primero determina si una reacción es favorable energéticamente o no, y el segundo está relacionado con la trayectoria molecular/atómica, que en última instancia influye en la rapidez de la reacción. Prácticamente todas las reacciones biológicas son cinéticamente inaccesibles de manera intrínseca. Los catalizadores biológicos, o enzimas, permiten que estas reacciones sean accesibles en las escalas de tiempo biológicas y que la célula responda de manera eficiente a los cambios celulares inherentes. En esta práctica se compara el efecto de una enzima sobre una reacción que es cinéticamente inaccesible. Se emplea como ejemplo la reacción de hidrólisis de la urea, que es acelerada por la enzima ureasa de semilla de sandía. La práctica consiste en aprender a extraer una enzima de su fuente y después medir su reacción en términos de velocidad inicial. También se valora el efecto de la concentración del sustrato y de la integridad de la enzima, ya que estas son termolábiles.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	100 mL	Urea 0.2 M recién preparada (probar: mezclar urea con el medio de reacción; debe resultar color amarillo, si es rosa la urea está hidrolizada y no funcionará)

#	Material	#	Reactivo
2 g	Semillas de sandía molidas (área bioquímica)	100 mL	Medio de reacción: solución de rojo de fenol 0.032 mM, pH 6.8 en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 mM
5	Tubos de ensayo		
4	Pipetas de 10 mL		
4	Pipetas de 1 mL		
1	Caja de celdas para espectro de 1.5 mL y de 3 mL		
1	Vaso de precipitado de 50 mL		
2	Tubos para centrífuga de 15 mL		
1	Balanza granataria		
1	Vortex		
1	Centrífuga clínica		
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 µL) y puntas		
1	Baño maría a 70 u 80 °C (se puede usar otra temperatura, siempre que produzca agua caliente)		
2	Propipetas verdes		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Bolsa de hielo

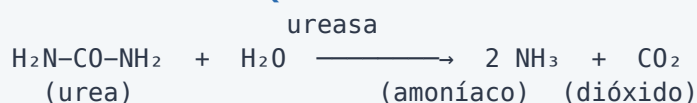
#	Material
5 g	Semillas de sandía (en caso de que no estén disponibles en el laboratorio)
1	Hielera pequeña de unicel
1	Etiquetas de rotulación o masking tape

Reacción química que estaremos observando (didáctica)

Lo que percibimos: un cambio de color de amarillo a rosa que avanza con el tiempo. Ese color nos "cuenta" cuánta urea se está hidrolizando, segundo a segundo, y de ahí sacamos la velocidad de la reacción.

La reacción enzimática (hidrólisis de la urea):

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



El indicador de pH: rojo de fenol

El NH_3 producido se convierte en NH_4^+ al captar un protón del agua, liberando iones OH^- (el medio se vuelve alcalino):

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



El rojo de fenol es un indicador de pH con dos colores:

- **Amarillo** a pH ácido/neutro (≈ 6.8 , donde iniciamos).
- **Rosa/magenta** a pH básico (cuando se acumula OH^-).

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

pH bajo (neutro) $\rightarrow$ amarillo
pH alto (básico) $\rightarrow$ rosa

Lo que estamos midiendo cinéticamente:

1. La reacción comienza al agregar la enzima (extracto de ureasa).
2. La absorbancia a **560 nm** sube conforme el rojo de fenol pasa de amarillo a rosa (más $\text{OH}^- \rightarrow$ más rosa).

3. Velocidad inicial (v_0) = pendiente de la parte lineal de la curva absorbancia vs. tiempo. Es la "rapidez" con la que la enzima convierte sustrato al inicio (cuando hay mucho sustrato y aún no se satura).

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**

$$\text{pendiente} = v_0 = \frac{\text{Absorbancia}_{560 \text{ nm}}}{\text{tiempo (s)}}$$

Actividad 3 — efecto de la concentración de sustrato:

A mayor [urea], mayor v_0 , pero no crece para siempre: la enzima se satura (todos sus sitios activos ocupados). Eso da la curva de **Michaelis-Menten** y de ahí se obtienen los parámetros cinéticos (K_m , V_{max}).

Actividad 4 — efecto de la temperatura (integridad de la enzima):

Al calentar el extracto a 80 °C, la ureasa (proteína) **se desnaturaliza**: pierde su estructura tridimensional y su sitio activo deja de funcionar. Por eso la actividad residual cae drásticamente. Esto demuestra que las enzimas son termolábiles.

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de la ureasa de semilla de sandía

1. Encender los espectrofotómetros y verificar que el baño maría esté listo para usarse en la Actividad 4.
2. Pesar 0.5 g (semillas frescas) o 1.0 g (semillas secas/almacenadas previamente en el laboratorio) de semilla de sandía molida; colocar en un vaso de precipitado pequeño y resuspender con 13 mL de agua destilada.
> 💡 Nota pedagógica sobre la masa de tejido: Extraer 2 g de semilla genera una concentración excesiva de ureasa ("muchísima enzima") que cataliza la reacción a gran velocidad y satura prematuramente la absorbancia en menos de 30 segundos. Reducir la masa a 0.5 g (semilla fresca) o 1.0 g (semilla almacenada) optimiza la actividad enzimática para mantener la reacción en el rango lineal detectable.
3. Dividir el homogenizado en dos tubos de plástico de 15 mL.
4. Centrifugar la muestra a 3500–6000 rpm por un periodo de 10 minutos (equilibrar los tubos por peso). No agitar el tubo para evitar que se resuspenda el precipitado.
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, previamente rotulado como extracto de ureasa, y colocar en hielo.

Actividad 2. Monitoreo de una reacción en presencia y en ausencia de la enzima

1. En dos celdas de espectrofotómetro pipetear lo que se indica en la tabla, excepto el iniciador de la reacción, que debe agregarse una vez que la celda esté en el espectrofotómetro:

Condición	Urea 0.2 M (mL)	Agua destilada (mL)	Medio de reacción (mL)	Iniciador de la reacción (agregar hasta que se vaya a medir)
Sin enzima (<i>blanco</i>)	0.100	0.800	1.0	0.1 mL de agua desionizada
Con enzima	0.100	0.800	1.0	0.1 mL de extracto de la enzima

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota: la celda **sin enzima es el blanco** de la celda con enzima.

2. La reacción se inicia con la adición de 100 μ L de extracto de enzima o agua, y debe pipetearse una vez que la celda esté colocada en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.

3. Agregar la enzima o el agua destilada y agitar con la punta rápidamente por unos tres segundos (usar la punta como agitador); medir la absorbancia a 560 nm cada 10 segundos durante 2 minutos (lecturas a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 s). Se recomienda construir previamente en la bitácora una tabla con los tiempos de reacción en una columna y dejar el espacio en blanco para anotar las absorbancias correspondientes.

4. Graficar el cambio de absorbancia respecto al tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial (pendiente de la parte lineal e inicial de la curva). Adicionalmente puede usarse: $m = (y_2 - y_1)/(x_2 - x_1)$.

5. Regraficar las velocidades obtenidas en condiciones y analizar las diferencias. Puede construirse una gráfica de barras.

Actividad 3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción

1. Pipetear los siguientes componentes en celdas de espectrofotómetro:

Celda	Urea (mM)	Urea 200 mM (μL)	Agua destilada (mL)	Medio de reacción (mL)
1	1	5	0.895	1.0
2	8	40	0.860	1.0
3	16	80	0.820	1.0
4	40	200	0.700	1.0

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota: la columna "Urea (mM)" expresa la concentración final resultante con los volúmenes indicados de la solución madre 200 mM.

- La reacción se inicia con la adición de 100 μL de extracto de enzima, y debe pipetearse una vez que la celda esté colocada en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
- Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 10 segundos por 2 minutos (registrando lecturas a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 s).
- Graficar el cambio de absorbancia respecto al tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial mediante la función =PENDIENTE en Excel.
- Regraficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis gráfico correspondiente para calcular los parámetros cinéticos de la reacción.

Actividad 4. Efecto de la integridad de la enzima sobre la velocidad de reacción

- Pipetear 1 mL de extracto de enzima en un microtubo.
- Incubar a 80 °C por 5 minutos.
- Previamente al tratamiento, preparar una celda para medir la actividad residual de la enzima:

Condición	Urea 0.2 M (mL)	Agua destilada (mL)	Medio de reacción (mL)	Iniciador de la reacción (agregar hasta que se vaya a medir)
Con enzima calentada	0.100	0.800	1.0	0.1 mL de extracto de la enzima calentada

4. La reacción se inicia con la adición de 100 μL de extracto de enzima calentado, y debe pipetearse una vez que la celda esté colocada en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.

5. Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 10 segundos por 2 minutos (registrando lecturas a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 s).

6. Graficar el cambio de absorbancia respecto al tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial.

7. Regraficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis gráfico correspondiente para calcular los parámetros cinéticos de la reacción.

8. Después de dejar enfriar la enzima tratada, volver a medir la actividad como en el ensayo anterior y comparar las velocidades.

Actividad 5. Discusión

1. Comparar la velocidad de la reacción en ausencia y presencia de enzima.

2. Comparar la diferencia de las velocidades en función del grado de saturación de la enzima.

3. Explicar por qué resulta una actividad menor después del tratamiento térmico de la enzima.

Práctica 5. Degradación de almidón por la α -amilasa de distintas fuentes

Propósitos

- Observar la acción enzimática de las enzimas glicósido hidrolasas
- Aprender una técnica analítica para el monitoreo de la hidrólisis de polímeros

Introducción

El catabolismo de biomacromoléculas requiere de un paso de predigestión. El catabolismo de polisacáridos, como el almidón o el glucógeno exógeno, requiere de la actividad de una o varias enzimas glicósido hidrolasas. El aparato digestivo de los animales expresa diversas isoformas, por ejemplo, la salival y la pancreática. Las plantas y semillas vegetales producen amilasa para facilitar el uso y la dinámica del almidón endógeno. En esta práctica se monitorea la actividad amilasa relativa de diversas fuentes, con el objetivo de comparar su abundancia relativa. Se usan dos metodologías para valorar la velocidad de hidrólisis del almidón mediante ensayos discontinuos.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
40	Tubos de ensayo de 10–15 mL	1	Piseta con agua
2	Gradillas para tubos	100 mL	Reactivo DNS
2	Vasos de precipitado de 250 mL	1 equipo	Congelador a -20 °C (refri paletero) o baño de hielo
2	Vasos de precipitado de 100 mL	50 mL	Reactivo de Lugol
1	Mortero con pistilo	100 mL	PBS 1x y 4x
1	Balanza analítica	100 mL	Suspensión de almidón al 2 %
1	Centrífuga para microtubo		
1	Balanza granataria		
1	Probeta de 50 mL		

#	Material	#	Reactivo
6	Tubos cónicos de 50 mL con rosca		
1	Caja de celdas para espectro		
1	Espectrofotómetro		
5 cm	Papel parafilm		
1	Licuada		

Por alumno / para todo el grupo (muestras distribuidas por mesa)

#	Muestra
1	Bolsa de hielo
20 g	Germinado de soya o alfalfa
20 g	Hoja de espinaca fresca o acelga
20 g	Papa
10 mL	Saliva humana (en el momento de la práctica)

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Distribución de muestras por mesa: para evitar el cuello de botella al calentar los tubos de DNS a ebullición, **cada mesa trabaja con 2 muestras** y las demás mesas con las otras 2. Los datos se comparten al final para completar las 4 fuentes.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Colecta de saliva: por equipo, un alumno colecta paulatinamente saliva en un tubo limpio (no escupir directamente sobre la muestra) y se usa solo el volumen necesario. El donador no debe presentar síntomas de enfermedades respiratorias ni riesgo de infección biológica.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Papel parafilm: si falta, solicitarlo a los técnicos de la isla.

Reacción química que estaremos observando (didáctica)

Lo que percibimos: dos señales complementarias. En la serie DNS vemos cómo aparece color rojo/marrón (nacen azúcares reductores). En la serie yodo-Lugol vemos cómo desaparece el color azul-negro (se consume y fragmenta el almidón). Juntas nos cuentan la misma historia metabólica desde dos ángulos complementarios:

La reacción enzimática (hidrólisis del almidón):

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

α -amilasa

almidón (polímero) $\longrightarrow$ dextrinas $\rightarrow$ maltosa $\rightarrow$ glucosa
(se rompen los enlaces glucosídicos α -1,4)

La α -amilasa rompe los enlaces glucosídicos internos del almidón, generando fragmentos de menor peso molecular (dextrinas) y azúcares simples como maltosa y glucosa. Cada enlace hidrolizado libera un extremo reductor nuevo (un carbono anomérico C_1 libre capaz de oxidarse). Ese es el "producto" directo que cuantificamos.

Serie DNS $\rightarrow$ mide lo que se PRODUCE (azúcares reductores):

El reactivo de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, de color amarillo) reacciona estequiométricamente con los extremos reductores en caliente (ebullición) y medio alcalino, reduciéndose a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color marrón/rojo anaranjado):

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

Azúcar reductor (libre) + DNS (amarillo) $\xrightarrow{\text{calor (ebullición)}}$ producto reducido (rojo/marrón)

- La absorbancia se lee a 540 nm.
- Más color rojo = más azúcares reductores liberados = mayor actividad amilasa.
- Es una medida acumulativa con TENDENCIA AL ALZA: la absorbancia sube a través del tiempo ($0 < 5 < 10 < 30 < 45$ min).

Serie yodo-Lugol $\rightarrow$ mide lo que se CONSUME (almidón restante):

El almidón intacto forma un complejo de inclusión de color azul-negro intenso al alojar el yodo (I_2/I_3^-) en el interior de la hélice de la amilosa. Cuando la amilasa degrada el polímero, la estructura helicoidal se destruye y el complejo ya no puede formarse:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

Almidón intacto + I_2 (yodo-Lugol) $\rightarrow$ complejo azul-negro (absorbancia a 580 nm)

Almidón degradado + I_2 (yodo-Lugol) $\rightarrow$ NO forma complejo (color claro/ámbar)

- La absorbancia se lee a 580 nm.
- Menos color azul = menos almidón intacto = mayor grado de hidrólisis enzimática.
- Es una medida decreciente con TENDENCIA A LA BAJA: la absorbancia baja a través del tiempo ($0 > 5 > 10 > 30 > 45$ min).

¿Por qué frenado en frío (-20°C) en la serie Lugol?

Para garantizar la seguridad de los alumnos y evitar el uso de ácidos corrosivos peligrosos (como HCl 2 M), la reacción enzimática de la serie Lugol se detiene de forma limpia y eficaz mediante choque térmico en frío (introduciendo los tubos al congelador palettero a -20 °C o baño de hielo profundo) inmediatamente después de tomar la alícuota correspondiente.

¿Por qué ebullición en la serie DNS?

El calentamiento a ebullición (~100 °C) durante 1 a 5 minutos cumple una doble función esencial: aporta la energía de activación necesaria para que el reactivo DNS desarrolle el cromógeno rojizo con los azúcares reductores, y desnaturaliza irreversiblemente la amilasa, congelando la cinética en el tiempo exacto del muestreo.

◆ ALERTA DE LABORATORIO — ¡NO CONFUNDIR LOS TRES AMBIENTES TÉRMICOS!

1. Baño maría a 37 °C (Cinética enzimática activa): Es donde ocurre la hidrólisis biológica. Aquí la amilasa está viva. ¡NUNCA lles a hervir los extractos ni los tubos de reacción antes de incubar a 37 °C, pues destruirías la enzima!
2. Baño maría a ebullición ~100 °C (Revelado de color DNS): Es EXCLUSIVO para los tubos de la serie DNS que ya recibieron su alícuota de muestra. No meter nada más aquí.
3. Congelador palettero a -20 °C / Baño de hielo (Frenado Lugol): Es para detener en frío la hidrólisis de las alícuotas con Lugol inmediatamente después de cada tiempo.
4. Inicio del cronómetro (t = 0 min): El tiempo de reacción inicia Estrictamente en el momento exacto en que se añade el almidón al tubo atemperado a 37 °C.

Relación entre series (para interpretar resultados):

► RESUMEN DIDÁCTICO DE TENDENCIAS:

Tiempo de incubación →	Tiempo de incubación →
DNS (540 nm) / AUMENTO de color / (más azúcares)	Lugol (580 nm) \ DISMINUCIÓN de color \ (menos almidón)
Mayor absorbancia a 540 nm = mayor actividad amilasa	Menor absorbancia a 580 nm = mayor avance de hidrólisis

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de proteínas solubles

1. Encender el espectrofotómetro para estabilizar la lámpara y alistar el baño maría a 37 °C (para la reacción) y el baño maría a ebullición (para el revelado de DNS).
2. Extraer las proteínas solubles de las 4 muestras a emplear: hojas de espinaca o acelga; germinado de soya o alfalfa; papa; y saliva humana.
3. Pesar 10 g de tejido vegetal y homogenizar en un mortero en presencia de 40 mL de amortiguador PBS. Para agilizar el proceso, puede emplearse la licuadora del laboratorio para preparar el homogenizado de todas las muestras y repartirlo equitativamente. Pasar por un colador para eliminar residuos fibrosos.
4. Decantar la fracción líquida en tubos cónicos de 15 mL y centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.

5. Decantar el sobrenadante (extracto enzimático soluble) en tubos perfectamente rotulados según la matriz y mantenerlos en hielo.

◆ **NOTA ACADÉMICA — AJUSTE DE VOLUMEN A LA MITAD (OPCIÓN PARA AHORRAR EXTRACTO):**

Si el rendimiento de extracto enzimático es limitado o para ahorrar reactivos, NO es necesario preparar más muestra. Se pueden ajustar todos los volúmenes del experimento al 50% respetando estrictamente las proporciones:

- Escala Estándar (100%): 4.0 mL extracto + 2.0 mL PBS 4x + 2.0 mL almidón 2% (Vol. total = 8.0 mL). Alícuotas: 1.0 mL para DNS (+ 1.0 mL DNS) y 0.25 mL para Lugol.
- Escala Reducida (50%): 2.0 mL extracto + 1.0 mL PBS 4x + 1.0 mL almidón 2% (Vol. total = 4.0 mL). Alícuotas: 0.5 mL para DNS (+ 0.5 mL DNS) y 0.25 mL para Lugol.

Actividad 2. Ensayo de actividad por aparición de moléculas con extremos reductores (serie DNS)

◆ **NOTA ACADÉMICA — TRABAJO EN PARALELO:**

Las actividades 2 (DNS) y 3 (Lugol) se llevan a cabo en paralelo a partir de los mismos tubos de reacción incubando a 37 °C. Rotulen perfectamente todas las gradillas y tubos antes de comenzar.

1. Preparación de la gradilla de revelado DNS (tubos de parada):

Colocar en una gradilla los tubos de ensayo para la serie DNS rotulados por muestra y tiempo (5 muestras × 5 tiempos: 0, 5, 10, 30 y 45 min). Pipetear con anticipación 1.0 mL de reactivo DNS en cada uno de estos tubos y conservarlos a temperatura ambiente.

2. Preparación de los tubos de reacción enzimática (Gradilla a 37 °C):

En otra gradilla, colocar 5 tubos de ensayo rotulados para cada muestra biológica y el Control Negativo. Pipetear los extractos y el amortiguador PBS 4x según la siguiente tabla (NO agregar aún el almidón):

Tubo	Condición / Muestra	Extracto o Agua	PBS 4x	Almidón al 2 % (a t = 0)	Vol. Total
1	Germinado (soya o alfalfa)	4.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	8.0 mL
2	Hojas (espinaca o acelga)	4.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	8.0 mL
3	Papa	4.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	8.0 mL
4	Saliva humana (diluida)	4.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	8.0 mL
5	Control Negativo (Blanco)	4.0 mL (Agua o PBS)	2.0 mL	2.0 mL	8.0 mL

3. Pre-atemperación e inicio de la cinética (Tiempo cero):

Colocar los 5 tubos de reacción con [Extracto + PBS 4x] en el baño maría a 37 °C durante 2 a 3 minutos para estabilizar la temperatura.

¡INICIO DEL CRONÓMETRO!: Añadir los 2.0 mL de suspensión de almidón al 2 % a cada tubo en el baño de 37 °C, mezclar suavemente por inversión y disparar el cronómetro (t = 0 min). Inmediatamente, tomar una alícuota de 1.0 mL de cada tubo y transferirla a su respectivo tubo con 1.0 mL de DNS (tiempo 0). El medio alcalino del DNS detiene la amilasa al instante.

4. Muestreo periódico a lo largo del tiempo:

Mantener los tubos de reacción incubando a 37 °C, agitándolos suavemente cada minuto. A los tiempos de 5, 10, 30 y 45 minutos, retirar una alícuota de 1.0 mL de cada reacción y transferirla a su tubo correspondiente de la gradilla DNS.

5. Revelado de color a ebullición:

Una vez que los tubos de la serie DNS han recibido su alícuota, colocarlos en el baño maría a ebullición (~100 °C) durante 1 a 5 minutos, hasta observar el viraje de color (de amarillo hacia anaranjado/marrón). Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente.

6. Lectura espectrofotométrica a 540 nm:

Transferir un volumen máximo de 2.0 mL a la celdilla de lectura (para no derramar el líquido en el equipo) y medir la absorbancia a 540 nm.

◆ NOTA ACADÉMICA — BLANCO Y CALIBRACIÓN (540 nm):

Blanco (540 nm): calibrar a cero con el tubo del Control Negativo a t = 0 min (o un tubo con 1.0 mL de agua + 1.0 mL de reactivo DNS hervido). El uso correcto del espectrofotómetro se encuentra indicado en la guía de operación del laboratorio.

Actividad 3. Ensayo de actividad por desaparición de almidón (serie yodo-Lugol)

1. Preparación de la gradilla de revelado Lugol:

Colocar en una gradilla una matriz de tubos rotulados para la serie Lugol (0, 5, 10, 30 y 45 min). Pipetear en cada tubo 0.25 mL de reactivo de Yodo-Lugol y 1.0 mL de agua destilada o PBS para facilitar el volumen de lectura.

2. Toma de alícuotas en paralelo:

A partir de los mismos tubos de incubación a 37 °C de la Actividad 2, tomar una alícuota de 0.25 mL a cada tiempo (0, 5, 10, 30 y 45 min) y transferirla al tubo correspondiente con Lugol.

3. Parada de reacción por choque térmico en frío (-20 °C):

Inmediatamente después de recibir la alícuota, introducir los tubos en el congelador palettero a -20 °C (o baño de hielo profundo). La baja temperatura inactiva de inmediato la amilasa, estabilizando el complejo almidón-yodo de forma 100% segura sin usar ácidos corrosivos.

4. Lectura espectrofotométrica a 580 nm:

Transferir máximo 2.0 mL a la celdilla y leer la absorbancia a 580 nm. En esta serie se registrará una disminución progresiva de la absorbancia con el tiempo conforme el almidón se degrada.

◆ **NOTA ACADÉMICA — BLANCO EN SERIE LUGOL (580 nm):**

Blanco (580 nm): calibrar a cero con un tubo que contenga únicamente agua destilada y reactivo de Lugol (sin almidón), o con la muestra del Control Negativo.

Matriz de rotulación y organización de tubos (para ambas series):

Muestra / Condición	t = 0 min	t = 5 min	t = 10 min	t = 30 min	t = 45 min
Tubo 1: Germinado	Tubo G-0	Tubo G-5	Tubo G-10	Tubo G-30	Tubo G-45
Tubo 2: Hojas	Tubo H-0	Tubo H-5	Tubo H-10	Tubo H-30	Tubo H-45
Tubo 3: Papa	Tubo P-0	Tubo P-5	Tubo P-10	Tubo P-30	Tubo P-45
Tubo 4: Saliva	Tubo S-0	Tubo S-5	Tubo S-10	Tubo S-30	Tubo S-45
Tubo 5: Control Negativo	Tubo CN-0	Tubo CN-5	Tubo CN-10	Tubo CN-30	Tubo CN-45

Esquema de referencia del flujo de trabajo:

► **FLUJO METODOLÓGICO RESUMIDO:**

Tubos de reacción a 37 °C: [Extracto + PBS 4x] —atemperar 3 min—> agregar Almidón 2% (inicia t = 0)

├─ Cada tiempo (0, 5, 10, 30, 45 min): tomar 1.0 mL —> + 1.0 mL DNS —> Hervir 1-5 min —> Leer 540 nm (▲ SUBE)

└─ Cada tiempo (0, 5, 10, 30, 45 min): tomar 0.25 mL —> + Lugol —> Frío (-20 °C) —> Leer 580 nm (▼ BAJA)

Actividad 4. Análisis de resultados

1. Graficar los valores de absorbancia frente a los tiempos de incubación para cada una de las muestras en ambas series (DNS a 540 nm y Lugol a 580 nm).
2. Calcular las pendientes de las curvas cinéticas lineales, que representan las velocidades de hidrólisis y las actividades enzimáticas aparentes.
3. Construir una gráfica comparativa de la actividad específica de cada fuente biológica (germinados, hojas, papa y saliva), corregida por gramo de tejido o mililitro de muestra.

Práctica 6. Transporte celular y preferencia de carbohidratos

Propósitos

- Observar el transporte de carbohidratos a través de la membrana plasmática de levaduras

- Aprender a medir la preferencia metabólica de un nutriente

Introducción

El metabolismo de los carbohidratos requiere primero que estos sean transportados al citoplasma. El transporte de monosacáridos reductores requiere de las proteínas GluT. Los disacáridos y oligosacáridos requieren de un paso de hidrólisis inicial para su posterior transporte. En esta práctica se mide la velocidad relativa de transporte de diversos monosacáridos y disacáridos en la levadura. Aunque la preferencia de las macromoléculas por sus ligandos se mide con una constante de especificidad, aquí la velocidad de transporte se asume relacionada con la velocidad de transporte de los distintos carbohidratos a concentración fija; es decir, el cociente entre la velocidad de transporte y la concentración del carbohidrato es un parámetro aparentemente relacionado con la especificidad.

Qué se estudia (didáctica)

La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) transporta azúcares a través de su membrana plasmática mediante proteínas transportadoras (GluT). Si la levadura transporta más rápido un azúcar, significa que lo prefiere como fuente de carbono. Aquí comparamos esa preferencia de forma relativa.

¿Qué azúcares se usan y son transportables?

Azúcar	Tipo	¿Transportable?
Glucosa	Monosacárido	✓ Sí, directo (transportador GluT)
Fructosa	Monosacárido	✓ Sí
Arabinosa	Monosacárido (pentosa)	Limitado — no es el sustrato preferido
Maltosa	Disacárido	Requiere hidrólisis previa (o transporte del disacárido)
Lactosa	Disacárido	✗ La levadura de pan casi no la usa
Agua	Control negativo	— (línea base)

El ensayo DNS (detección indirecta del transporte):

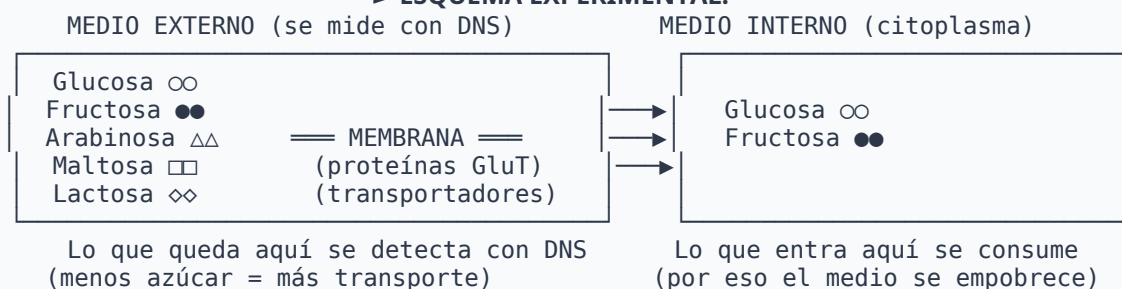
El azúcar que queda **fuera** de las células (en el medio) se mide con DNS a 540 nm:

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**

Levadura + azúcar → (incubación 30 min) → si el azúcar ENTRA a la célula,
su concentración EN EL MEDIO baja

[Azúcar fuera] T0 > [Azúcar fuera] T30 → hubo transporte

DNS + azúcar restante → color rojo (540 nm)
menos color = más azúcar transportado = mayor actividad de transporte

Representación del transporte a través de la membrana:► **ESQUEMA EXPERIMENTAL:**

Interpretación clave: la velocidad de transporte relativa $\approx$ preferencia metabólica. A mayor velocidad de entrada de un azúcar, mayor es su preferencia. La diferencia de absorbancia DNS entre T0 y T30 nos da esa velocidad relativa.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
6	Pipetas de 10 mL	100 mL	PBS 1x
1	Varilla de vidrio	100 mL	Reactivo de dinitrosalicilato (DNS)
5	Pipetas Pasteur de plástico	1	Piseta con agua destilada
25	Microtubos de 1.5 mL	25 mL	Solución de glucosa 15 mM
1	Micropipeta de 100 a 1000 μ L	25 mL	Solución de fructosa 15 mM
1	Caja de puntas azules	25 mL	Solución de arabinosa 15 mM

#	Material	#	Reactivo
1	Centrífuga clínica	25 mL	Solución de maltosa 15 mM
1	Microcentrífuga para microtubos	25 mL	Solución de lactosa 15 mM
3	Gradillas para microtubo (unicel)	1	Sacarosa en sólido (alimentación de la levadura)
1	Espectrofotómetro		
1	Caja de celdas de plástico para espectro		
2	Tubos cónicos		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Bolsa de hielo
1	Sobre de levadura Tradipan®

Preparación rápida de levadura (aplica a P6 y P7)

◆ NOTA ACADÉMICA

La preparación de células es el **mayor cuello de botella** de estas prácticas (solo hay 2 horas de clase). Estrategias para ganar tiempo:

Estrategia	Cómo
Preparar células antes	El maestro (o un equipo designado) deja listos los paquetes celulares lavados antes de la sesión, conservados en PBS a 4 °C en hielera. En clase solo se atemperan.
Trabajo por estaciones	Mientras un integrante hace los lavados, otros rotulan tubos, preparan las soluciones de azúcar y alistan el DNS.

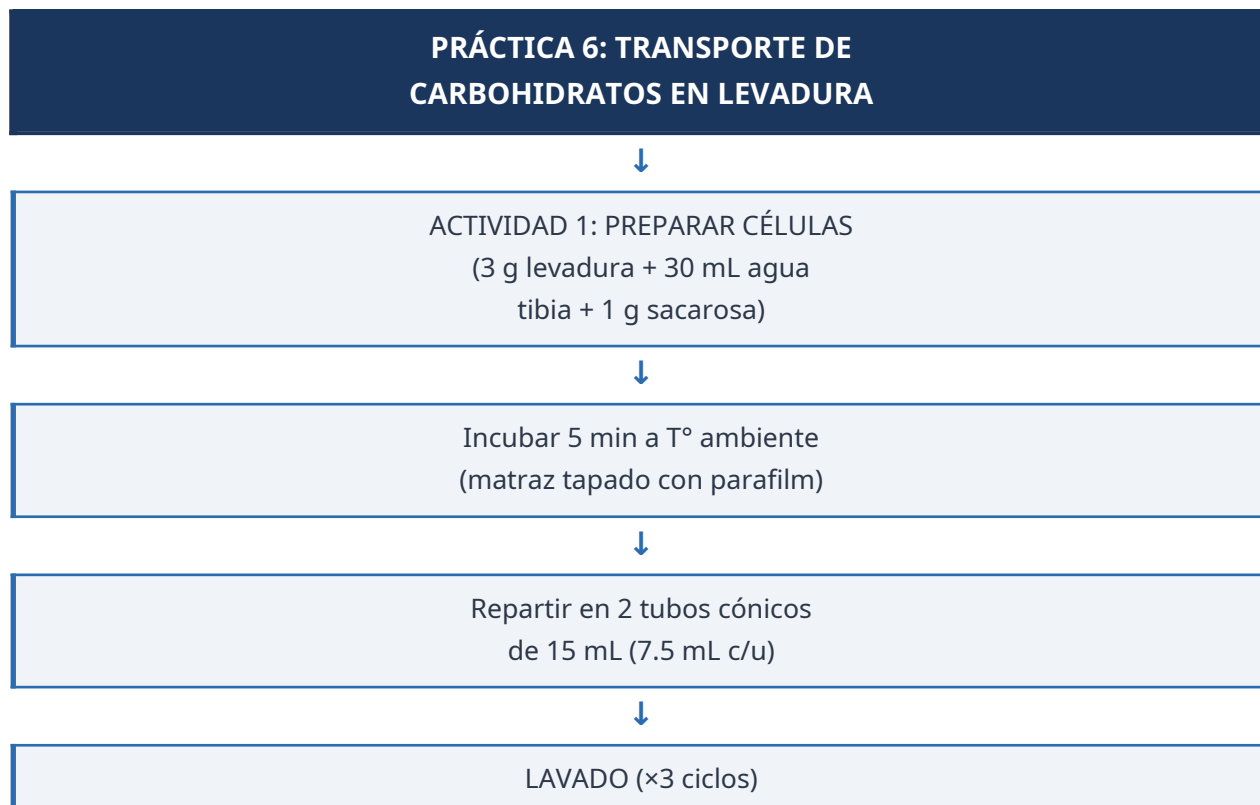
Estrategia	Cómo
Reducir lavados	Si el tiempo apremia, 2 lavados bien hechos suelen bastar (siempre que se elimine el azúcar extracelular).
Soluciones alistadas	El maestro prepara con anticipación las soluciones de azúcar (15 mM o 10 mM), el PBS y el DNS.
Incubación inicial corta	La activación de la levadura con sacarosa puede hacerse mientras se pesan y preparan los demás materiales.

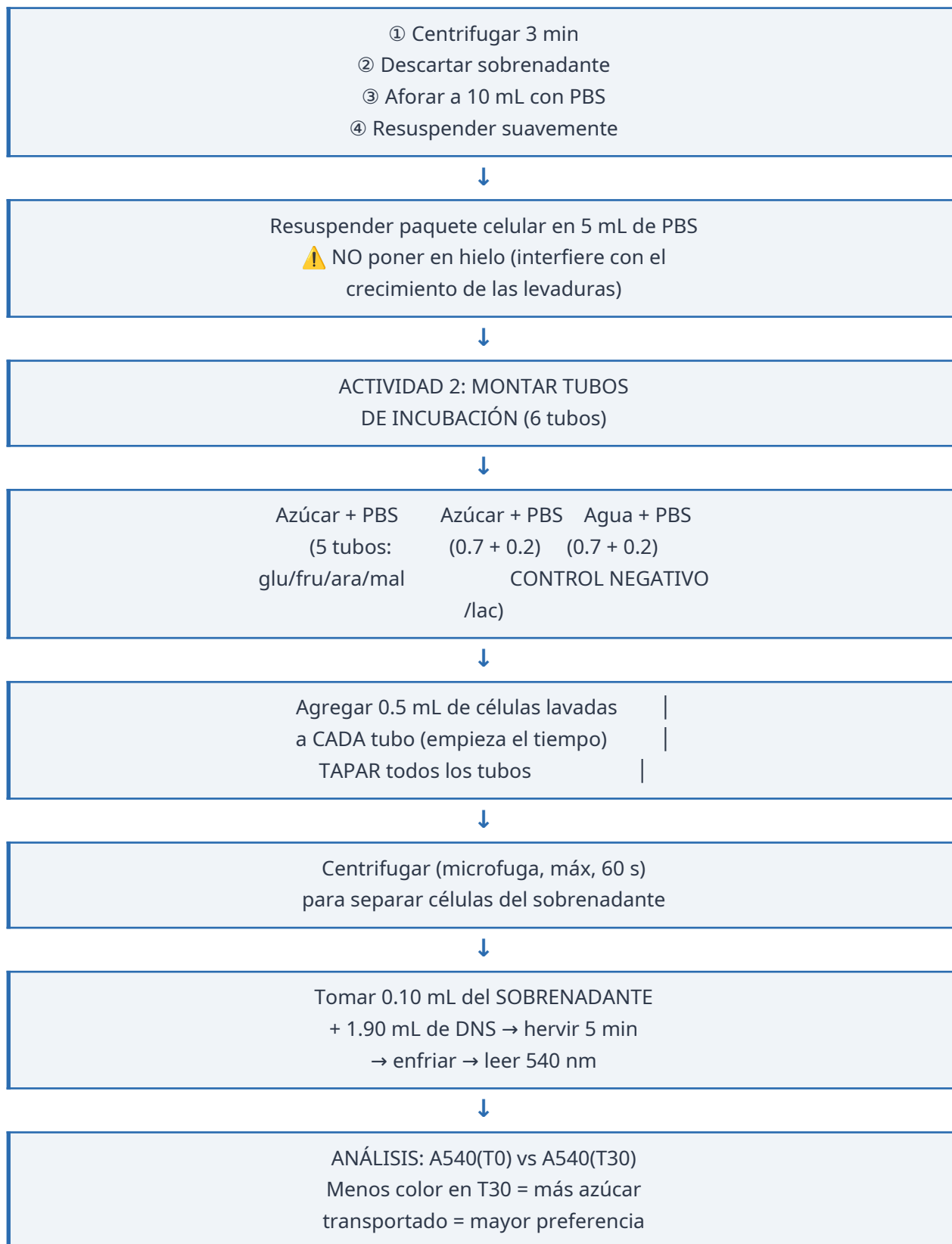
◆ **NOTA ACADÉMICA**

Células frescas: las levaduras deben estar metabólicamente activas. Si se conservaron en frío, atemperar a temperatura ambiente antes de usarlas. NO ponerlas en hielo durante el ensayo.

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO





Procedimiento

Actividad 1. Preparación de las células de levadura

1. Pesar 3 g de levadura Tradipan® y mezclar en un matraz con 30 mL de agua tibia a 30 °C; adicionar 1.0 g de sacarosa.
2. Incubar a temperatura ambiente la mezcla por 5 minutos, tapando el matraz con parafilm.
3. Pipetear 15 mL de la suspensión de levaduras en dos tubos cónicos de 15 mL con tapa.
4. Centrifugar los tubos a máxima velocidad por 3 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y descartarlo.
6. Aforar los tubos hasta la marca de 10 mL con PBS.
7. Resuspender el paquete celular con la ayuda de una pipeta Pasteur o por inversión suave del tubo cinco veces, o hasta que las células se mezclen completamente.
8. **Repetir los pasos 4 a 7 hasta completar un total de 3 lavados.** Los lavados son esenciales para eliminar el exceso de azúcares extracelulares; si no se hacen adecuadamente, la práctica no funcionará.
9. Finalmente, resuspender el paquete celular en 5 mL de PBS y usarlo en la Actividad 2. **Estas células no deben ponerse en hielo**, ya que las bajas temperaturas interfieren con el crecimiento de las levaduras.

Actividad 2. Determinación de la preferencia de carbohidratos como fuente de carbono en levadura

1. Pipetear lo siguiente en 6 microtubos, perfectamente rotulados como tubos de incubación y según el azúcar que contienen:

Tubo	D-azúcar (isómero D) y volumen	PBS
1	Arabinosa 0.7 mL	0.20 mL
2	Lactosa 0.7 mL	0.20 mL
3	Fructosa 0.7 mL	0.20 mL
4	Glucosa 0.7 mL	0.20 mL
5	Maltosa 0.7 mL	0.20 mL
6 (control negativo)	Agua 0.7 mL	0.20 mL

◆ NOTA ACADÉMICA

El tubo 6 (**agua**) es el **control negativo**: no tiene azúcar, por lo que no debe haber transporte ni cambio de color. Sirve para comparar y detectar cualquier señal de fondo.

2. Agregar **0.5 mL de células lavadas** y **tapar los tubos**. Una vez agregadas las células, empieza a contar el tiempo del periodo de incubación. En este experimento se tomarán muestras del proceso en dos tiempos: al tiempo cero y después de 30 minutos. Estos tubos de incubación sirven para tomar alícuotas del cultivo a diferentes tiempos.
3. Agitar rápidamente por inversión suave, colocar de nuevo en la gradilla y **mantener los tubos cerrados** durante la incubación (evita evaporación y contaminación).
4. **Cosecha al tiempo cero (T0)**: tomar una muestra de 0.4 mL de cada tubo y pipetear en otro microtubo, previamente marcado según el azúcar y como *tiempo cero (T0)*. Estos son los tubos de cosecha celular.
5. Colocar los tubos de cosecha en hielo para bloquear el transporte de los azúcares.
6. Centrifugar rápidamente los tubos de cosecha del T0 en microcentrífuga a máxima velocidad por 60 segundos y recuperar el **sobrenadante** en otro tubo, rotulado según el azúcar que corresponda y como sobrenadante del T0.
7. Tomar del sobrenadante resultante una muestra de **0.10 mL** y colocar en un tubo de ensayo, previamente marcado como corresponda y conteniendo **1.90 mL de reactivo DNS**.
8. Colocar los tubos del tiempo cero en baño maría a ebullición por 5 minutos, permitir que las muestras se enfríen y leer absorbancia a **540 nm**. Si la intensidad de color es muy alta, realizar las diluciones correspondientes para poder medir la absorbancia.
9. Transcurridos **30 minutos** en los tubos de incubación, repetir los pasos 4 al 8 usando series de tubos nuevos, previamente rotulados como **T30** (tiempo 30 min).

Actividad 3. Análisis de los resultados

1. La disminución de intensidad de color de la reacción de DNS es indicativa de transporte del azúcar del exterior al interior celular.
2. Con las absorbancias, construir una gráfica de barras a t_0 y t_{30} , considerando los factores de dilución en los cálculos.
3. Calcular la velocidad relativa del transporte por la diferencia de absorbancia entre los tiempos y dividir entre 30; esta es la velocidad de transporte en cambio de densidad óptica por minuto. Corregir este factor empleando el coeficiente de extinción molar del reactivo de DNS reducido.

4. Determinar en cuáles de los tratamientos se observa el cambio más grande para inferir cuál es el azúcar que la levadura prefiere.

Práctica 7. Cinética del transporte celular de carbohidratos

Propósitos

- Observar la velocidad de transporte de carbohidratos a través de la membrana plasmática de levaduras
- Aprender a medir el efecto de la concentración de un sustrato sobre la actividad biológica de un transportador de membrana

Introducción

La presente es una **continuación de la Práctica 6**. Ahora se mide la velocidad de transporte de **distintas concentraciones de glucosa** en levaduras, usando el mismo ensayo DNS y la misma preparación celular. A partir del análisis del curso temporal obtenido se puede inferir el orden de reacción que el transporte sigue.

◆ NOTA ACADÉMICA

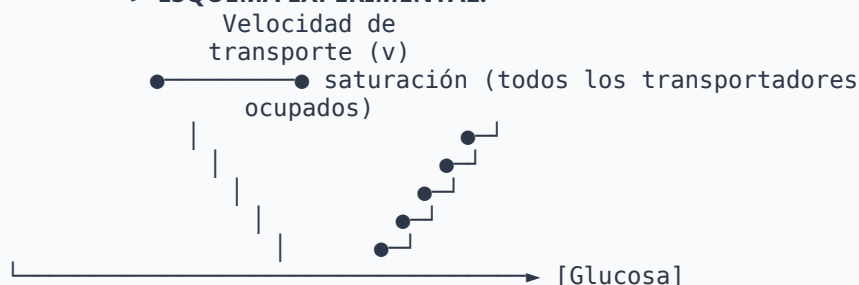
Relación con la Práctica 6: la P6 comparó la preferencia entre azúcares distintos a concentración fija. Aquí nos centramos en **un solo azúcar (glucosa)** y variamos su concentración para construir una curva de transporte. Por eso la solución madre de glucosa es de 10 mM (en la P6 era 15 mM porque se comparaban azúcares a la misma concentración). Las prácticas pueden reportarse en conjunto (misma cinética de transporte), aunque se ejecutan en semanas distintas.

Qué se estudia (didáctica)

El transporte como proceso saturable:

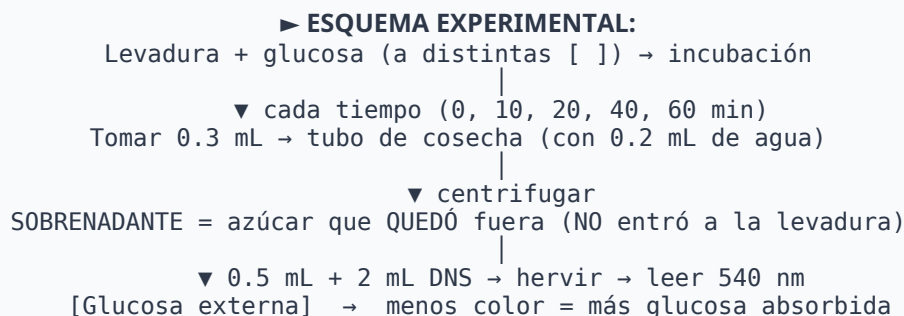
Igual que una enzima se satura con sustrato, el transportador de glucosa (GluT) de la membrana de la levadura también se satura: a baja concentración, casi toda la glucosa disponible entra; al subir la concentración, los transportadores se van ocupando y la velocidad deja de crecer.

► ESQUEMA EXPERIMENTAL:



- Si la velocidad **no depende** de la concentración → transportadores saturados (orden 0).
- Si la velocidad **crece** con la concentración y luego se aplanan → curva tipo Michaelis-Menten (saturación del transportador).
- El objetivo es **inferir el orden de reacción** del transporte con los datos experimentales.

Lo que medimos (ensayo DNS):



◆ NOTA ACADÉMICA

Aclaración del agua pre-cargada (0.2 mL): el microtubo de cosecha trae 0.2 mL de agua destilada antes de recibir los 0.3 mL de muestra (total 0.5 mL). Esta agua (1) garantiza que haya **sobrenadante suficiente** para tomar la alícuota después de centrifugar, (2) **estandariza la dilución** entre todas las muestras y tiempos, y (3) nos permite medir con el DNS el azúcar que **queda en el medio**; por diferencia con el inicial, sabemos cuánto **absorbió la levadura**.

Preparación rápida de levadura (aplica a P6 y P7)

◆ NOTA ACADÉMICA

La preparación de células es el **mayor cuello de botella** de estas prácticas (solo hay 2 horas de clase). Estrategias para ganar tiempo:

Estrategia	Cómo
Preparar células antes	El maestro (o un equipo designado) deja listos los paquetes celulares lavados antes de la sesión, conservados en PBS a 4 °C en hielera. En clase solo se atemperan.
Trabajo por estaciones	Mientras un integrante hace los lavados, otros rotulan tubos, preparan las soluciones de azúcar y alistan el DNS.

Estrategia	Cómo
Reducir lavados	Si el tiempo apremia, 2 lavados bien hechos suelen bastar (siempre que se elimine el azúcar extracelular).
Soluciones alistadas	El maestro prepara con anticipación las soluciones de azúcar (15 mM o 10 mM), el PBS y el DNS.
Incubación inicial corta	La activación de la levadura con sacarosa puede hacerse mientras se pesan y preparan los demás materiales.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Células frescas: las levaduras deben estar metabólicamente activas. Si se conservaron en frío, atemperar a temperatura ambiente antes de usarlas. NO ponerlas en hielo durante el ensayo.

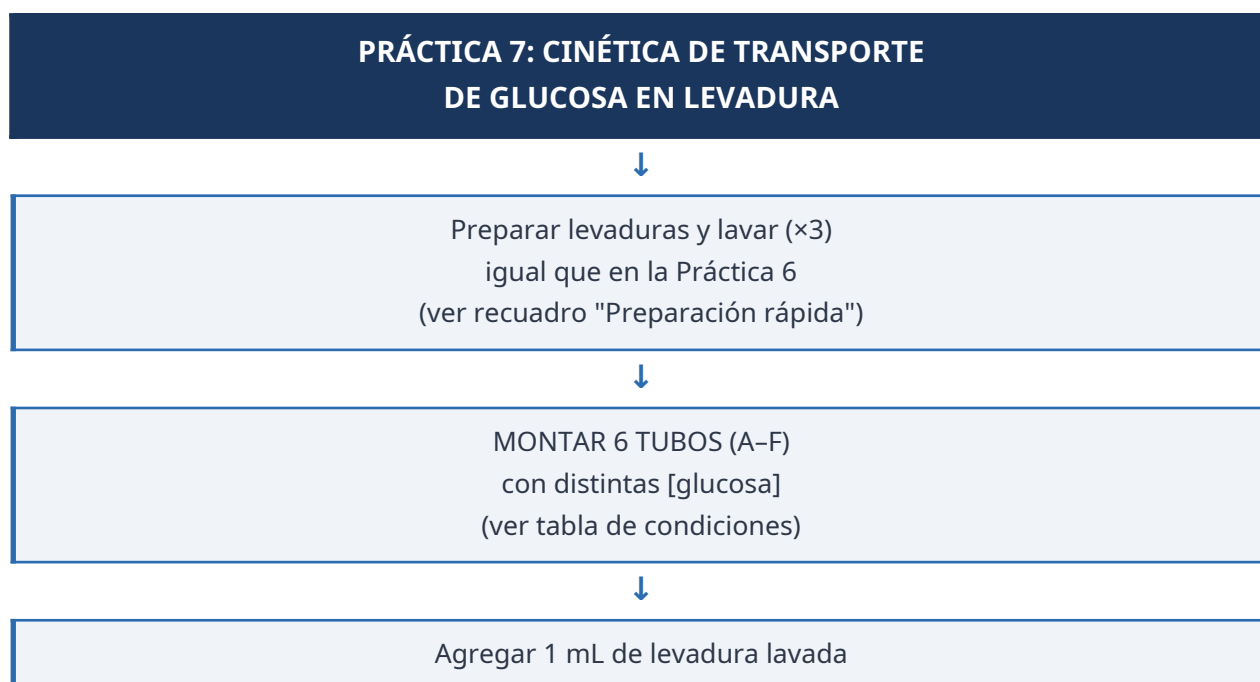
Requerimientos por equipo

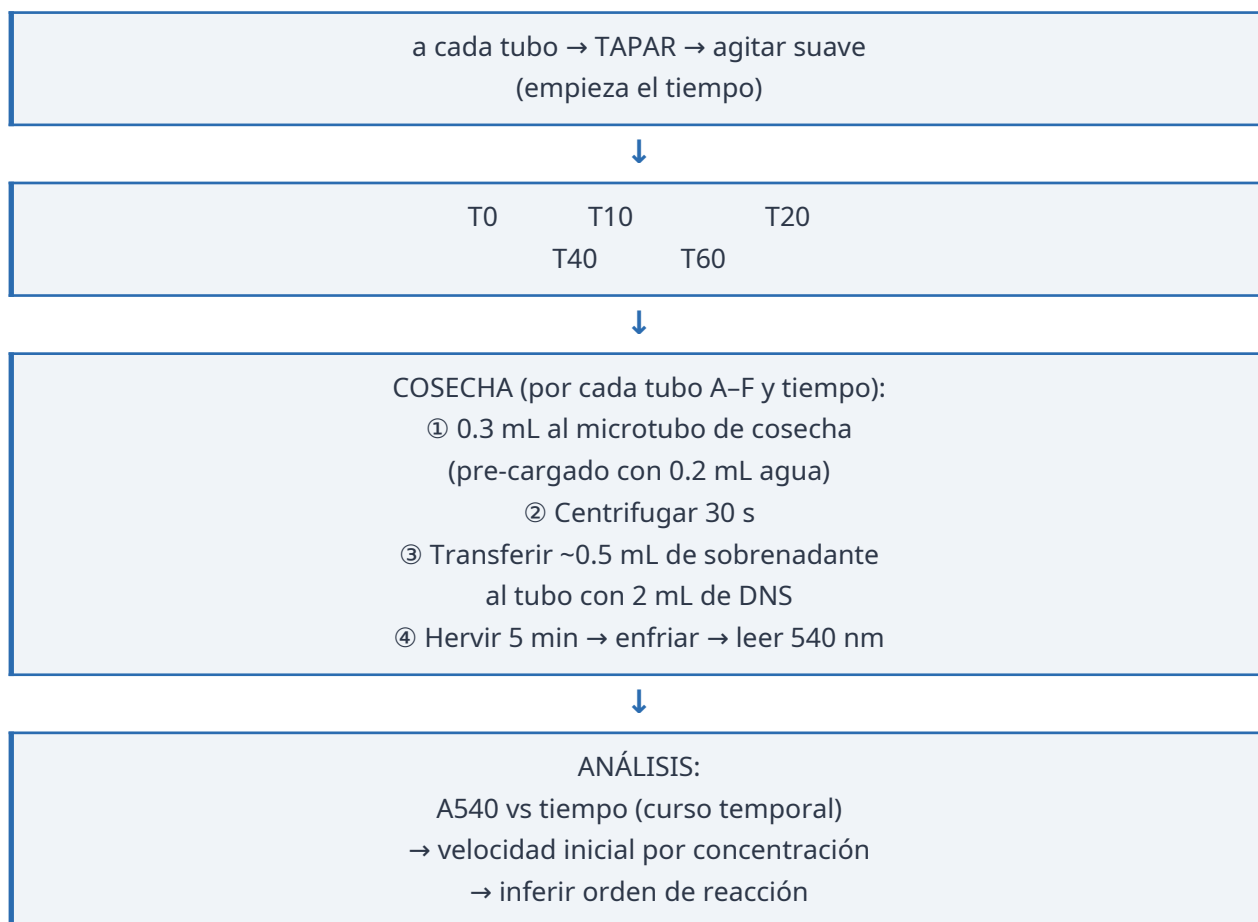
#	Material	#	Reactivo
4	Pipetas de 10 mL	100 mL	PBS 1x
4	Propipetas	100 mL	Dinitrosalicilato (DNS)
2	Vasos de precipitado de 50 mL	1	Piseta con agua destilada
1	Varilla de vidrio	25 mL	Solución de glucosa 25 mM
5	Pipetas Pasteur de plástico		
25	Microtubos de 1.5 mL		
1	Micropipeta de 100 a 1000 µL		
1	Caja de puntas azules		
1	Centrífuga clínica		

#	Material	#	Reactivo
1	Microcentrífuga para microtubos		
3	Gradillas para microtubo (unicel)		
1	Espectrofotómetro		
1	Caja de celdas de plástico para espectro		
15	Tubos de ensayo		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Bolsa de hielo
1	Sobre de levadura Tradipan®

Diagrama de flujo profesional**► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO**



Procedimiento

Actividad 1. Cinética del transporte de la glucosa

1. Preparar las levaduras y realizar **tres lavados** tal como en la Práctica 6 (ver recuadro de preparación rápida).

2. Pipetear los siguientes volúmenes en seis tubos de centrífuga:

# Tubo	Condición	Vol. glucosa 10 mM	Vol. agua destilada	[Glucosa] final (en 2.5 mL)
A (control negativo)	Agua	—	1.5 mL	0 mM
B	Glucosa	1.5 mL	—	6 mM
C	Glucosa diluida	1.0 mL	0.5 mL	4 mM
D	Glucosa diluida	0.75 mL	0.75 mL	3 mM
E	Glucosa diluida	0.5 mL	1.0 mL	2 mM

# Tubo	Condición	Vol. glucosa 10 mM	Vol. agua destilada	[Glucosa] final (en 2.5 mL)
F	Glucosa diluida	0.2 mL	1.3 mL	0.8 mM

◆ NOTA ACADÉMICA

Concentración final: cada tubo recibe después 1 mL de levadura (total 2.5 mL). La columna "[Glucosa] final" indica la concentración que queda en el medio tras mezclar, calculada como $(10 \text{ mM} \times \text{volumen de glucosa}) \div 2.5 \text{ mL}$. Es lo que se grafica en el eje X. El tubo A (solo agua) es el **control negativo**.

3. Pipetear **1 mL de levaduras lavadas** en los seis tubos.
4. Tapar los tubos y agitar rápidamente por inversión suave (empieza el tiempo de incubación).
5. **Cosecha al tiempo cero (T0):** tomar una muestra de **0.3 mL** de cada tubo y colocarla en un microtubo de cosecha, previamente marcado con el nombre de la muestra (A, B, C...) y T0. Estos microtubos de cosecha deben tener **previamente 0.2 mL de agua destilada** (total 0.5 mL; ver aclaración didáctica).
6. Centrifugar rápidamente a máxima velocidad por **30 segundos**.
7. Transferir la mayor parte del **sobrenadante** ($\approx 0.4\text{--}0.5 \text{ mL}$) a un tubo de ensayo, previamente marcado como corresponda y conteniendo **2 mL de reactivo DNS**.
8. Al finalizar cada tiempo de incubación (**10, 20, 40 y 60 minutos**), repetir el proceso de los pasos 5 a 7 en otros tubos, marcados correctamente como T10, T20, T40 y T60 respectivamente.
9. Colocar los tubos en baño maría a ebullición por **5 minutos**, permitir que las muestras se enfríen y leer la absorbancia a **540 nm**.

◆ NOTA ACADÉMICA

Blanco (540 nm): calibrar a cero con el tubo A (control negativo) de cada tiempo, o con un tubo de DNS sin muestra.

Actividad 2. Análisis de los resultados

1. La disminución de intensidad de color de la reacción de DNS es indicativa de transporte del azúcar del exterior al interior celular.
2. Con las absorbancias, construir una gráfica de dos variables del **curso temporal** del transporte (absorbancia vs. tiempo) y realizar el análisis de velocidad inicial.

- 3.** Graficar la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa para observar la saturación del transportador.
- 4.** Proponer un mecanismo de transporte de acuerdo con lo observado (orden 0 vs. saturable/Michaelis-Menten).

Práctica 8. Glucólisis

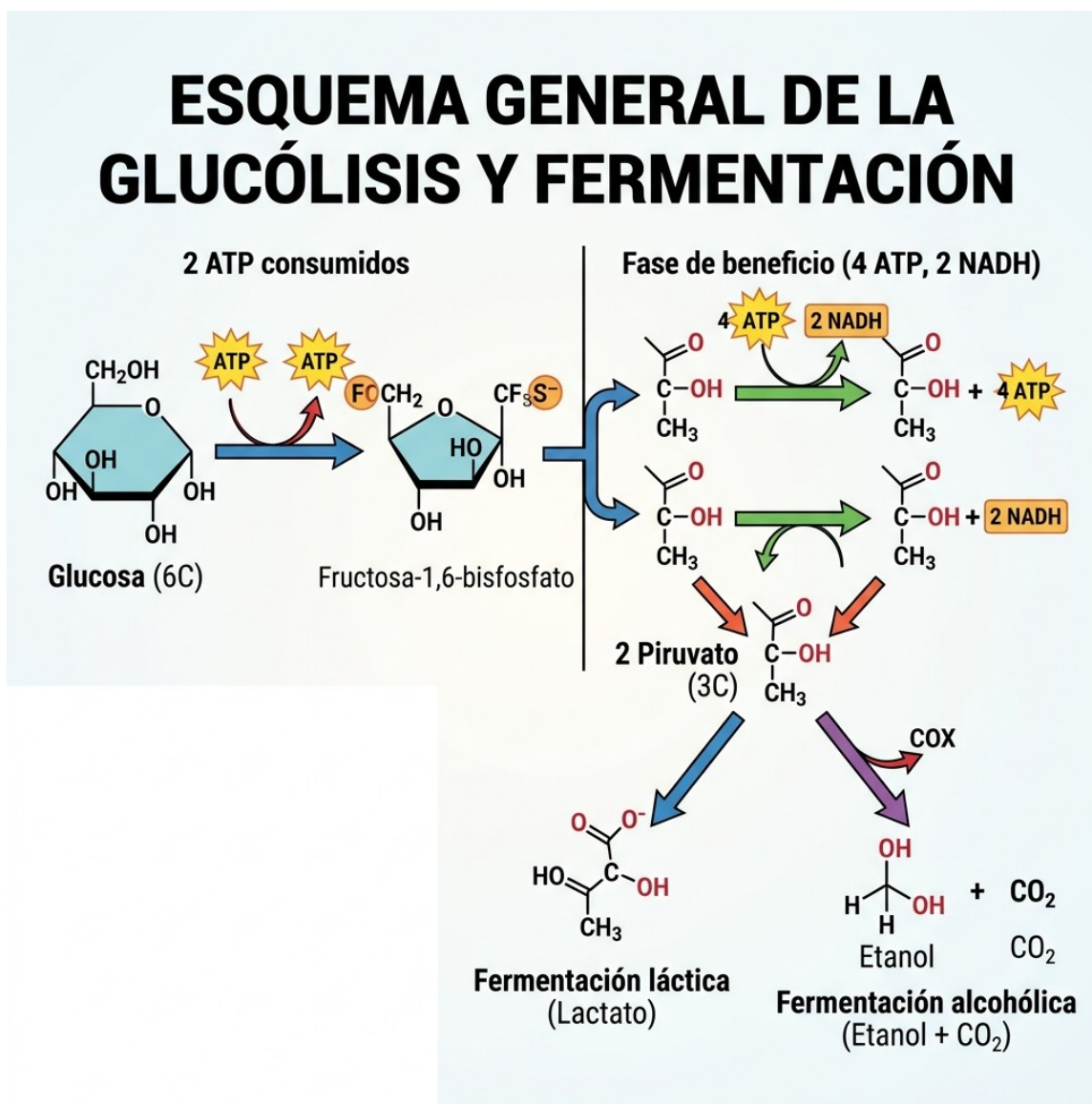


Figura 8.1. Esquema general de la ruta glucolítica y fermentación en levaduras.

Propósitos

- Observar el fenómeno de la glucólisis
- Conocer técnicas rápidas para estudiar la glucólisis

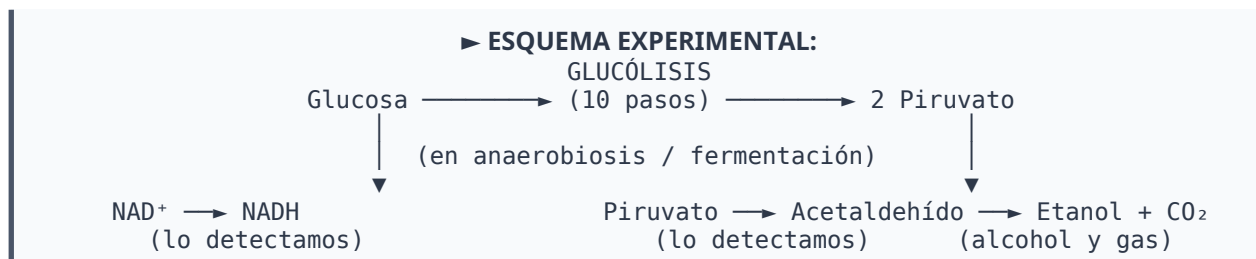
Introducción

La glucólisis, o ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, constituye una ruta central de transformación de azúcares en la mayoría de los organismos biológicos. Aunque uno de los azúcares que por excelencia alimentan esta ruta es la L-glucosa, también se pueden procesar otros, como la fructosa (que proviene de la hidrólisis de la sacarosa) y la galactosa

(que proviene de la hidrólisis de la lactosa). En esta práctica se evalúa el progreso de la ruta usando tres carbohidratos distintos, monitoreando diversos productos directos o indirectos del flujo glicolítico en levadura.

Qué se estudia y dónde se conecta cada medición (didáctica)

La glucólisis en la levadura (fermentación alcohólica):



¿Dónde se liga cada medición de la práctica?

Medición	Dónde se genera en la ruta	Qué detecta
CO₂ / burbujas (espuma)	En la descarboxilación del piruvato → acetaldehído (fermentación alcohólica)	Liberación de CO ₂ , indicador de fermentación activa
Piruvato (2,4-DNPH / Brady)	Producto final de la glucólisis (antes de la fermentación)	Cetoácidos: si hay piruvato acumulado, la glucólisis corrió pero la fermentación no lo consumió todo
Intermediarios oxidables (dicromato)	Azúcares/intermediarios con grupos reductores (alcoholes, aldehídos)	Oxidación general de compuestos orgánicos reducidos
NAD(P)H / FADH₂ (NBT)	En la fase de pago de la glucólisis (1,3-BPG → G3P) y en rutas redox	Equivalentes reductores generados durante la ruta
Alcohol (nitrato cérico)	Etanol final de la fermentación alcohólica	Alcoholes primarios acumulados
Acidificación (rojo de fenol / pH)	Ácidos orgánicos producidos como subproductos	Baja de pH del medio por actividad metabólica

Interpretación por azúcar:

- **Glucosa** → entra directo a glucólisis → más productos esperados.
- **Sacarosa** → requiere hidrólisis previa (glucosa + fructosa), luego ambos fermentan.

- **Lactosa** → la levadura de pan la degrada pobremente → pocos productos esperados.

◆ NOTA ACADÉMICA

Limitaciones del ensayo (léelo, importante): como el material se obtiene por **macerado + clarificación por centrifugación**, algunos productos quedan diluidos y **varios resultados se aprecian poco o casi nada** en el tiempo de clase. En particular, la **acumulación de alcohol** y la **detección de NAD(P)H** requieren mayor concentración de muestra para dar señales claras; no esperen virajes intensos en esas dos pruebas. Es un resultado esperable, no un error del equipo.

◆ NOTA ACADÉMICA

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** están las guías de **glucólisis y fermentación** y de **monitoreo de la glucólisis**, con los resultados esperados y la interpretación de las pruebas: <https://interactomamodular.com/assets/guias/practica8-glucolisis-fermentacion.pdf>, <https://interactomamodular.com/assets/guias/monitoreo-glucolisis.pdf>, <https://interactomamodular.com/assets/guias/practica11-fermentacion-etanol.pdf>.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
4	Pipetas de 10 mL	100 mL	Glucosa al 5 %
1	Pipeta de 5 mL	100 mL	Sacarosa al 5 %
3	Pipetas Pasteur	100 mL	Lactosa al 5 %
1	Parrilla de calentamiento	50 mL	Dicromato de potasio al 10 % en medio ácido (ácido sulfúrico al 5 %). Oxidante y corrosivo
2	Vasos de precipitado de 250 mL	5 mL	Piruvato de sodio o ácido pirúvico 1 mM
1	Piseta con agua	20 mL	Reactivo de Brady en gotero (preparar el mismo día: ver abajo)

#	Material	#	Reactivo
20	Tubos de ensayo	1	Gotero con reactivo de nitrato cérico amoniacal al 40 % en ácido nítrico concentrado. Peligroso, leer hoja de seguridad
2	Gradillas para tubos de ensayo	1	Gotero con rojo de fenol 0.032 mM
1	Pinzas para tubo	1	Gotero con nitroazul de tetrazolio (NBT) 0.1 % (fresco, en agua MQ o inyectable; no almacenar más de un mes)
1	Tiras reactivas para pH o papel tornasol azul y rosa	250 mL	Amortiguador de cultivo (ver preparación abajo)

Preparación de reactivos (maestro/técnicos):

Reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina): (A) disolver 0.6 g de 2,4-DNPH en ~3 mL de H_2SO_4 concentrado; (B) mezclar 4 mL de agua destilada con 14 mL de etanol puro; (C) verter (A) en (B) agitando en platina; colocar en gotero. Preparar el mismo día de uso.

Amortiguador de cultivo (desgasificado): hervir 250 mL de agua destilada por 10 minutos para retirar el oxígeno disuelto; cerrar herméticamente en un matraz con taparroscas; agregar 0.5 g de fosfato de potasio dibásico (el pH resultante debe oscilar entre 7 y 8). El agua desgasificada y el cierre hermético **mantienen la anaerobiosis** necesaria para la fermentación (ver condición "tapado").

Mapa de tubos (trabajar con 17 tubos en total)

Cada tubo se incubaba igual (2 mL azúcar + 5 mL levadura, tapado, 50 min) y después se revela con un reactivo distinto. **No son réplicas:** son experimentos distintos por azúcar.

Nº tubo	Muestra	Prueba que se le hace	Reactivo de revelado
1	Sacarosa	Piruvato (cetoácidos)	2,4-DNPH (Brady)

Nº tubo	Muestra	Prueba que se le hace	Reactivo de revelado
2	Sacarosa	Oxidación de intermediarios	Dicromato de potasio
3	Sacarosa	NAD(P)H / FADH ₂	Nitroazul de tetrazolio (NBT)
4	Sacarosa	Alcohol	Nitrato cérico amoniacal
5	Sacarosa	Acidificación	Rojo de fenol + pH
6	Lactosa	Piruvato (cetoácidos)	2,4-DNPH (Brady)
7	Lactosa	Oxidación de intermediarios	Dicromato de potasio
8	Lactosa	NAD(P)H / FADH ₂	Nitroazul de tetrazolio (NBT)
9	Lactosa	Alcohol	Nitrato cérico amoniacal
10	Lactosa	Acidificación	Rojo de fenol + pH
11	Glucosa	Piruvato (cetoácidos)	2,4-DNPH (Brady)
12	Glucosa	Oxidación de intermediarios	Dicromato de potasio
13	Glucosa	NAD(P)H / FADH ₂	Nitroazul de tetrazolio (NBT)
14	Glucosa	Alcohol	Nitrato cérico amoniacal
15	Glucosa	Acidificación	Rojo de fenol + pH
C1	Sin azúcar (control)	Referencia basal de CO ₂	— (solo espuma)
C2	Sin azúcar (control)	Referencia basal de CO ₂	— (solo espuma)

Total: 17 tubos (15 con azúcar + 2 controles).

Cómo repartir según el número de equipos:

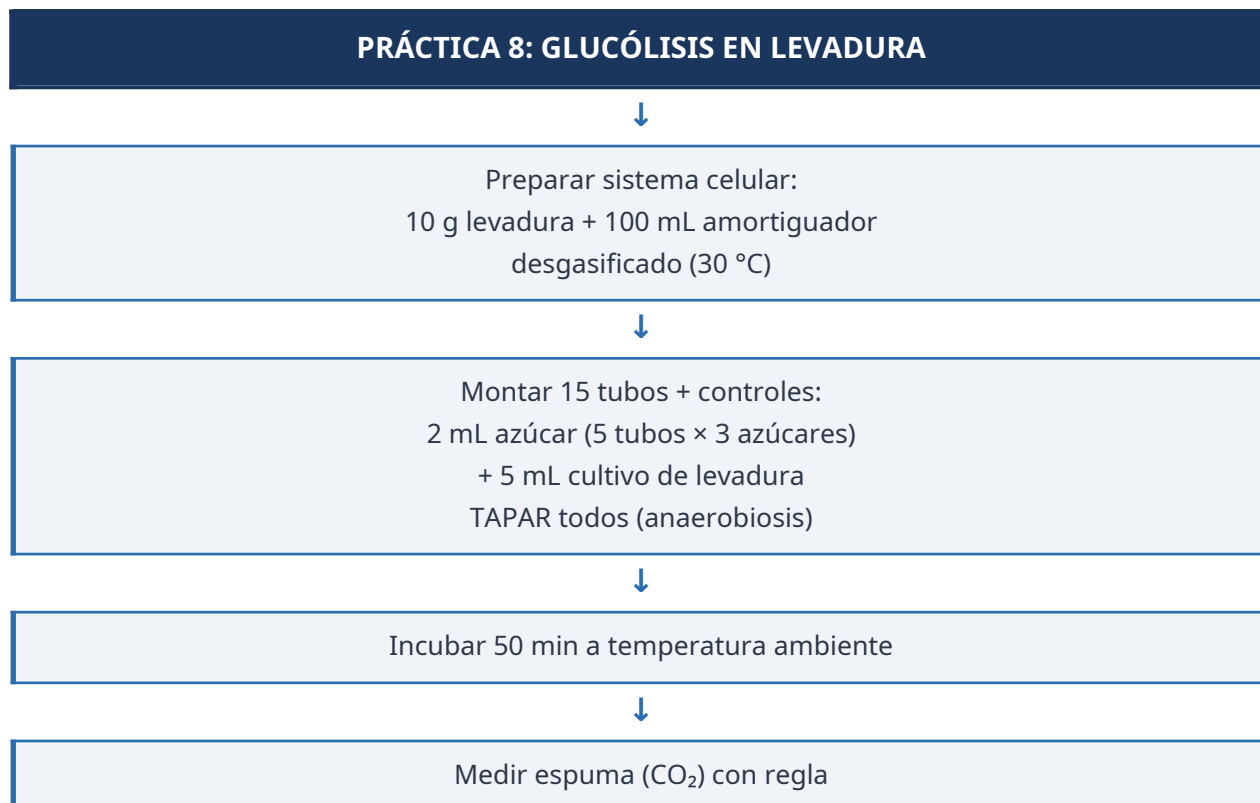
Equipos	Reparto recomendado
3 equipos	Cada equipo hace un azúcar completo (5 tubos) + los controles los mide quien termine primero.
4-6 equipos	Repartir por prueba: a cada equipo le toca 1-2 pruebas y la aplica a los 3 azúcares (p. ej., equipo A: piruvato en tubos 1, 6, 11; equipo B: oxidación en 2, 7, 12; etc.). Al final se comparten los resultados.
2 equipos	Un equipo hace sacarosa + glucosa, otro hace lactosa + controles.

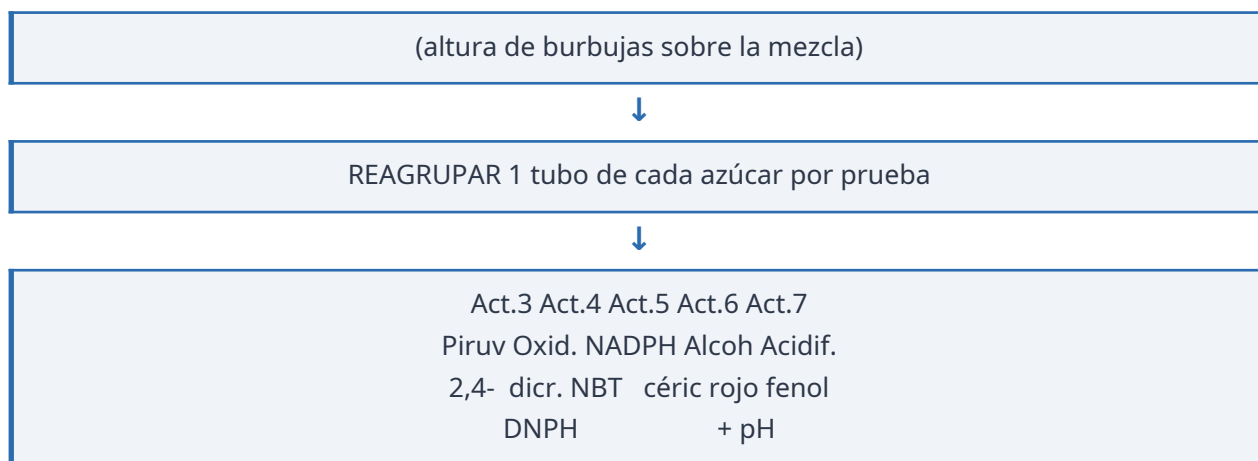
◆ NOTA ACADÉMICA

Al final del laboratorio, todos los equipos comparten sus resultados en una tabla común para comparar los 3 azúcares en las 5 pruebas.

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO





Procedimiento

Actividad 1. Preparación del sistema celular

1. Pesar **10 g de levadura Tradipan®** y mezclar con 100 mL de amortiguador de cultivo desgasificado, previamente atemperado a 30 °C.
2. Preparar y pipetear los siguientes componentes en tubos **rotulados**, de acuerdo con la tabla. Para cada azúcar se destinan **5 tubos, uno para cada prueba** (piruvato, oxidación, NAD(P)H, alcohol y acidificación):

Tubo	Sacarosa 5 % (mL)	Lactosa 5 % (mL)	Glucosa 5 % (mL)	Cultivo de levadura (mL)	Condición
1	2	—	—	5	tapado (anaerobiosis)
2	2	—	—	5	tapado
3	2	—	—	5	tapado
4	2	—	—	5	tapado
5	2	—	—	5	tapado
6	—	2	—	5	tapado
7	—	2	—	5	tapado
8	—	2	—	5	tapado
9	—	2	—	5	tapado
10	—	2	—	5	tapado

Tubo	Sacarosa 5 % (mL)	Lactosa 5 % (mL)	Glucosa 5 % (mL)	Cultivo de levadura (mL)	Condición
11	—	—	2	5	tapado
12	—	—	2	5	tapado
13	—	—	2	5	tapado
14	—	—	2	5	tapado
15	—	—	2	5	tapado
C1 (control)	—	—	—	5	tapado
C2 (control)	—	—	—	5	tapado

◆ NOTA ACADÉMICA

¿Por qué 5 tubos por azúcar? Cada tubo se incuba igual (2 mL azúcar + 5 mL levadura, 50 min), pero después **cada uno se revela con un reactivo distinto** para detectar un producto diferente: tubo 1/6/11 → piruvato; 2/7/12 → oxidación; 3/8/13 → NAD(P)H; 4/9/14 → alcohol; 5/10/15 → acidificación. No son repeticiones del mismo experimento: son **5 experimentos distintos por azúcar**.

◆ NOTA ACADÉMICA

Sobre "tapado": todos los tubos se cierran con papel parafilm o tapón de goma para crear **anaerobiosis** (ausencia de O₂), condición que favorece la fermentación alcohólica. Los tubos **C1 y C2 son controles negativos** (solo levadura, sin azúcar): sirven para medir la espuma/CO₂ basal de la levadura y comparar.

3. Incubar los tubos a temperatura ambiente por un periodo de **50 minutos**.

4. Transcurrido el tiempo, realizar **las** siguientes actividades.

Actividad 2. Medición del contenido de gas producido

1. Con la ayuda de una regla, medir la **altura de las burbujas/espuma** formadas dentro de cada tubo, desde el borde de la mezcla.

2. La formación de espuma está relacionada con la liberación de **CO₂**, que a su vez está relacionada con el metabolismo del piruvato, producto final de la glucólisis.

3. Calcular el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento (los tubos C1 y C2 sirven como referencia basal) y comparar los resultados. Se puede realizar algún análisis de significancia estadística apropiado.

Reagrupamiento de tubos para las pruebas:

Enseguida se realizarán **cinco pruebas** diferentes a cada tratamiento con los tres azúcares (1 tubo de cada azúcar por prueba). Reagrupar así:

Prueba	Tubos (uno por azúcar)	Prueba	Tubos (uno por azúcar)
Act. 3 Piruvato	1, 6, 11	Act. 6 Alcohol	4, 9, 14
Act. 4 Oxidación	2, 7, 12	Act. 7 Acidificación	5, 10, 15
Act. 5 NAD(P)H	3, 8, 13		

Actividad 3. Identificación de cetoácidos (piruvato) por 2,4-DNPH (reactivo de Brady)

1. Tomar los tubos de los diferentes tratamientos destinados a esta prueba (tubos 1, 6 y 11), que contienen los 7 mL de la mezcla, y colocarlos en una gradilla.
2. Agregar **3 mL del reactivo de Brady** y dejar reposar por 5 minutos.
3. **Control positivo:** en un tubo aparte, colocar 3 mL del reactivo de Brady + 1 mL de piruvato 1 mM + 3 mL de agua destilada (total 7 mL, igual que las muestras).
4. La aparición de un **precipitado marrón** es indicativo de la presencia de piruvato y/o cetoácidos.

Actividad 4. Oxidación de intermediarios

1. A los tubos correspondientes (2, 7 y 12), agregar **2 mL de solución de dicromato de potasio al 10 %**.
2. Calentar a ebullición por 5 minutos.
3. El cambio de coloración de **naranja a morado** es indicativo de la oxidación de alcoholes y aldehídos (compuestos orgánicos reducidos presentes en la mezcla). **Este cambio de color es el criterio objetivo; el olor es secundario.**
4. (Opcional) Olfatear los tubos antes de agregar el dicromato y después de haberlos hervido (esperar a que estén atemperados antes de oler); un olor a frutas puede indicar compuestos volátiles, pero no sustituye la lectura de color.

Actividad 5. Detección de nucleótidos reducidos: FADH₂ y NAD(P)H

1. Calentar a ebullición por 2 minutos los tubos que corresponden a esta prueba (3, 8 y 13).

2. Colocar **10 gotas** del reactivo de nitroazul de tetrazolio (NBT).
3. La aparición de un precipitado de color **negro o azul intenso** es indicativo de transferencia de electrones de los nucleótidos reducidos producidos en la glucólisis al colorante.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Nota: en los tiempos de clase, esta señal suele ser débil (el macerado diluye los equivalentes reductores). Si apenas se insinúa, es un resultado esperable.

Actividad 6. Acumulación de alcohol

1. A los tubos que corresponden a esta prueba (4, 9 y 14), colocar **10 gotas** de solución de nitrato cérico amoniacal.
2. Observar los cambios en el color de las mezclas.
3. Calentar a ebullición por cinco minutos.
4. La aparición de un **color rojo** es indicativa de la presencia de alcoholes primarios. La prueba puede ser positiva antes de calentar los tubos.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Nota: en los tiempos de clase esta señal puede ser débil o nula, porque la concentración de etanol acumulado en el macerado es baja. Si no se observa un rojo intenso, es esperable; registren lo que vean.

Actividad 7. Acidificación del medio

1. Medir el **pH** con tiras reactivas a los tubos que corresponden a esta prueba (5, 10 y 15).
2. Colocar **3 gotas** de solución de rojo de fenol.
3. Observar los cambios en el color de las mezclas.
4. Un color **amarillo o rojo** es indicativo de una acidificación del medio, producto de la actividad glicolítica.

Práctica 9. Efecto de moduladores sobre la velocidad de una ruta metabólica

Propósitos

- Valorar el efecto de la presencia de moduladores de la glucólisis sobre su flujo
- Observar efectos antagonistas empleando distintos metabolitos

Introducción

En el catabolismo existe una jerarquía para el procesamiento de diversos nutrientes. En esta práctica se evalúa la glucólisis en levadura en presencia de catabólicos que alimentan otras rutas. Una alteración en la velocidad de la glucólisis en presencia de intermediarios de otras rutas es indicativo de una **represión catabólica**: la célula "prefiere" ciertos nutrientes y modifica la velocidad de la glucólisis en consecuencia.

Qué se estudia (didáctica)

La represión catabólica:

Cuando una célula tiene disponible más de un nutriente, no los metaboliza todos a la misma velocidad: **prioriza**. La glucosa suele ser la fuente preferida. Si la levadura "siente" otros metabolitos (succinato, citrato, lactosa, glicerol), puede ralentizar o modificar la velocidad de la glucólisis. Aquí medimos esa velocidad en 8 condiciones para ver qué hace cada modulador.

¿Cómo se mide la velocidad de la glucólisis? → por acidificación

Durante la glucólisis, la levadura produce ácidos orgánicos y el medio se acidifica. El **rojo de fenol** es un indicador de pH:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

pH neutro (7) → rojo/anaranjado
pH ácido (acidificación) → amarillo

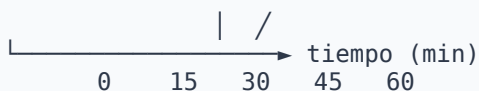
La lectura a **570 nm** sigue el cambio de color: conforme el medio se acidifica, la absorbancia a 570 nm cambia. La **rapidez con la que cambia la absorbancia** es proporcional a la velocidad de la glucólisis.

► ESQUEMA EXPERIMENTAL:

Absorbancia 570 nm

tubo sin acidificar (color estable)

← pendiente = velocidad de glucólisis (acidificación)



¿Por qué se mide cada uno de estos moduladores? — el "idioma" que la célula lee:

Cada modulador es una **señal química** que la célula "lee" para decidir si la glucólisis debe ir rápido o lento. No todos significan lo mismo:

Modulador	¿Qué le dice a la célula?	Señal que representa
Citrato	"Ya hay combustible para el ciclo de Krebs"	Intermediario del siguiente proceso (Krebs)
Succinato	"El ciclo de Krebs ya está recibiendo material"	Intermediario del siguiente proceso (Krebs)
Lactosa	"Hay otro azúcar disponible por fuera"	Fuente de carbono alternativa (disacárido)
Glicerol	"Hay otra fuente de carbono (lípidos) disponible"	Fuente de carbono alternativa
Ninguno (control)	—	Referencia basal (solo glucosa)

◆ NOTA ACADÉMICA

La intuición que recuerdas es correcta: el **citrato y el succinato** "avisan" que el ciclo de Krebs (el proceso de ENSEGUIDA después de la glucólisis) ya tiene material → la célula puede frenar la entrada de glucosa porque "no necesita más combustible para el siguiente paso". Esto es una **inhibición por retroalimentación (feedback)**: el producto/abundancia del siguiente proceso frena el proceso anterior.

Tipos de regulación que podemos observar en este experimento:

Tipo de regulación	Mecanismo	Moduladores del experimento	¿Cómo lo vemos en la gráfica?
1. Inhibición por retroalimentación (feedback)	El intermediario del proceso de enfrente (Krebs) avisa que ya hay material → la glucólisis se frena	Citrato, Succinato	Pendiente del curso temporal menor que el control

Tipo de regulación	Mecanismo	Moduladores del experimento	¿Cómo lo vemos en la gráfica?
2. Represión catabólica / preferencia de sustrato	La célula tiene otra fuente de carbono y "elige" cuál usar, ajustando la glucólisis	Lactosa, Glicerol	Pendiente distinta (menor o igual) según si compite o no
3. Control por disponibilidad de sustrato	Sin glucosa, la glucólisis no tiene su principal entrada	Tubo 7 (sin glucosa)	Pendiente muy baja o casi plana

¿Cómo los dividimos al interpretar?

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

GRUPO A – Señal de "siguiente proceso con material" (feedback)

→ Citrato (tubo 3), Succinato (tubo 2)

→ Si frenan la glucólisis = inhibición por retroalimentación.

GRUPO B – Señal de "fuente alternativa de carbono" (represión catabólica)

→ Lactosa (tubo 4), Glicerol (tubo 5)

→ Si modifican la velocidad = compiten / reordenan preferencias.

GRUPO C – Combinaciones y controles

→ Tubo 6 (citrato+glicerol): ¿efecto sinérgico o antagónico?

→ Tubo 7 (sin glucosa): control negativo, ¿qué pasa sin sustrato?

→ Tubo 8 (succinato+citrato): ¿doble señal de Krebs?

→ Tubo 1 (solo glucosa): control de referencia.

Cómo se compara (método):

◆ NOTA ACADÉMICA

Para cada tubo, se calcula la pendiente de la parte lineal del curso temporal (velocidad de acidificación). Se compara contra el **tubo 1 (control)**:

◆ NOTA ACADÉMICA

- **Pendiente menor** → el modulador **inhibe** la glucólisis.

◆ NOTA ACADÉMICA

- **Pendiente similar** → el modulador **no la afecta** (o la célula lo ignora).

◆ **NOTA ACADÉMICA**

- **Pendiente mayor** → el modulador **estimula** la glucólisis.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
8	Tubos de ensayo	100 mL	Glucosa 20 mM
8	Celdas para espectro	100 mL	Succinato 20 mM a pH 7.0
1	Espectrofotómetro	100 mL	Citrato de sodio 20 mM a pH 7.0
2	Pipetas de 10 mL	100 mL	Lactosa 20 mM
2	Pipetas de 5 mL	100 mL	Glicerol o glicerina
1	Vaso de precipitado	100 mL	PBS diluido 1:100 con agua
		50 mL	Rojo de fenol 0.032 mM
		500 mL	Cultivo de levadura

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Sobre de levadura Tradipan®

Mapa de tubos (8 tubos)

Cada tubo se prepara según la tabla; el volumen total es de 4.0 mL. Se agregan 1 mL de cultivo de levadura a cada uno y se monitorea a 570 nm.

N°	Glucosa 20 mM (mL)	Succinato 20 mM (mL)	Citrato 20 mM (mL)	Lactosa 20 mM (mL)	Glicerol (mL)	PBS diluido (mL)	Agua (mL)	Rojo de fenol (mL)	Total
1 (control)	0.5	0	0	0	0	1	2.4	0.1	4.0
2	0.5	0.5	0	0	0	1	1.9	0.1	4.0
3	0.5	0	1	0	0	1	1.4	0.1	4.0
4	0.5	0	0	1	0	1	1.4	0.1	4.0
5	0.5	0	0	0	1	1	1.4	0.1	4.0
6	0.5	0	1	0	1	1	0.4	0.1	4.0
7 (control negativo)	0	0	1	1	1	1	0	0.1	4.1*
8	0.5	0.5	1	0	0	1	1.0	0.1	4.1*

◆ NOTA ACADÉMICA

El tubo 7 es el **control negativo** (sin glucosa): sirve para ver cuánto acidifica la levadura sin su sustrato principal. El tubo 1 es el **control positivo de referencia** (solo glucosa).

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota: los tubos 7 y 8 suman 4.1 mL en el manual original; se mantienen los volúmenes indicados (el exceso de 0.1 mL no afecta la señal). Si se desea volumen exacto de 4.0 mL, restar 0.1 mL de agua en cada uno.*

Cómo repartir según el número de equipos:

Equipos	Reparto recomendado
8 equipos	Cada equipo toma 1 tubo y lo monitorea.
4 equipos	Cada equipo toma 2 tubos (p. ej., equipo A: tubos 1 y 8; B: 2 y 7; C: 3 y 6; D: 4 y 5).

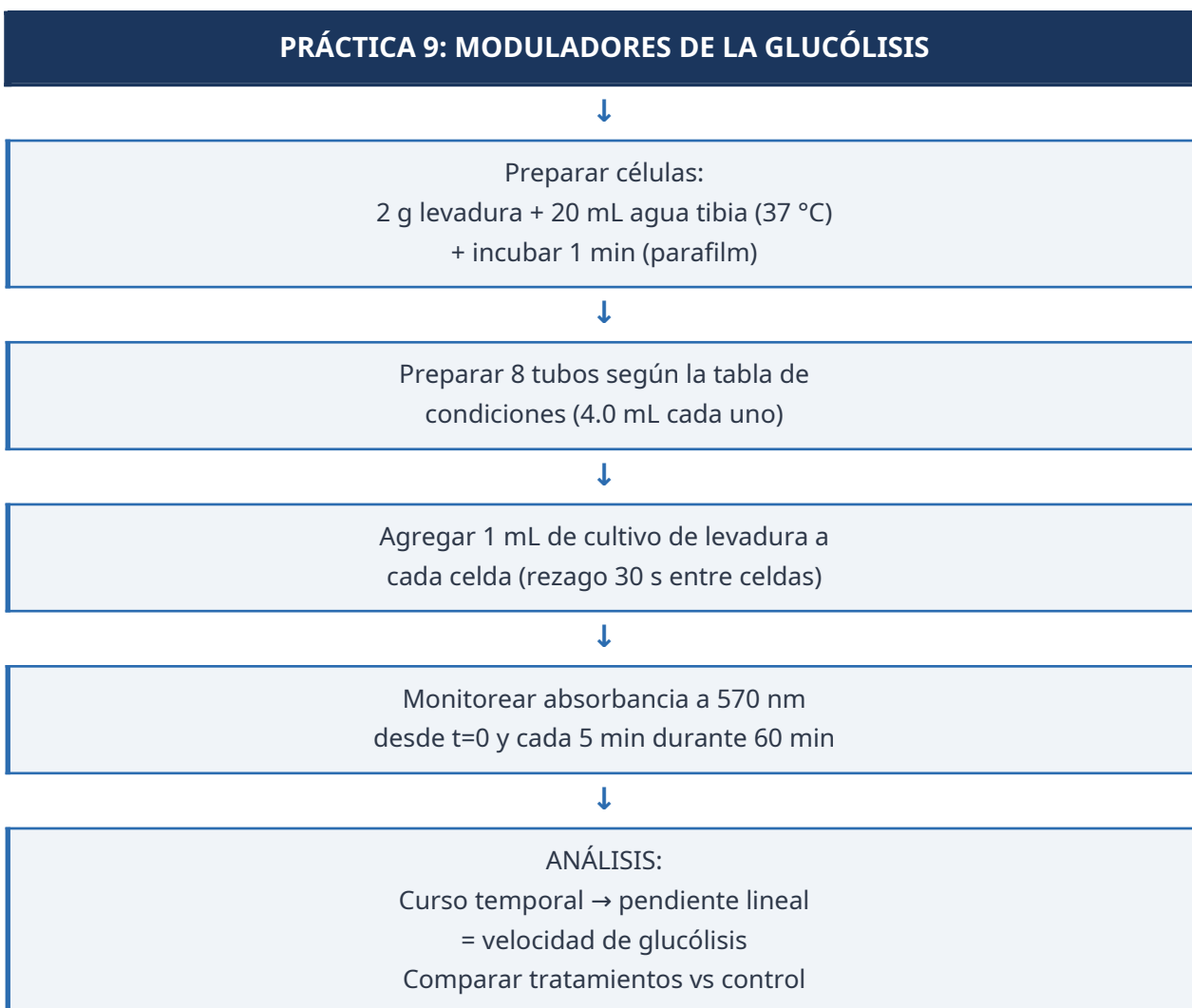
Equipos	Reparto recomendado
2-3 equipos	Repartir los 8 tubos equitativamente y compartir los datos.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Al final, todos comparten los cursos temporales para construir la gráfica conjunta de las 8 condiciones.

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO



Procedimiento

Actividad 1. Preparación de las células

1. Pesar **2 g de levadura Tradipan®** y mezclar con 20 mL de agua tibia a 37 °C.
2. Incubar a temperatura ambiente la mezcla por 1 minuto, tapando el matraz con parafilm.
3. Pipetear los componentes en 8 tubos de ensayo de acuerdo con la tabla de condiciones (ver Mapa de tubos).
4. Agregar **1 mL de cultivo de levaduras** a 8 celdas marcadas igual que los tubos y mezclar perfectamente. Dejar un rezago de **30 segundos** entre la adición del cultivo a cada celda, para tener suficiente tiempo de medir las absorbancias.

Actividad 2. Monitoreo de la rapidez de la glucólisis

1. Incubar las celdas a temperatura ambiente y monitorear el cambio de absorbancia a **570 nm** desde el tiempo 0 y cada 5 minutos, durante 60 minutos.
2. Esta actividad debe realizarse cerca del espectrofotómetro.
3. **Uso del equipo:** hacer el blanco/autocero una sola vez al inicio (con la celda control); después no es necesario repetirlo: solo cambiar cada celda según corresponda la lectura y registrar.

Actividad 3. Análisis de los resultados

1. Construir gráficos de dos variables de los **cursos temporales** de la glucólisis (absorbancia a 570 nm vs. tiempo), que reflejan la acidificación del medio.
2. Calcular la **velocidad del estado estacionario** de la glucólisis: es la **pendiente de la parte lineal** de cada curso temporal:

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**

$$\text{velocidad} = \Delta \text{absorbancia} / \Delta \text{tiempo} \quad (\text{en la zona lineal de la curva})$$

3. Valorar si hay cambios entre los tratamientos comparando las pendientes de cada tubo contra la del control (tubo 1). Una pendiente menor indica represión catabólica.

Práctica 10. Ciclo de Krebs

ESQUEMA GENERAL DEL CICLO DE KREBS

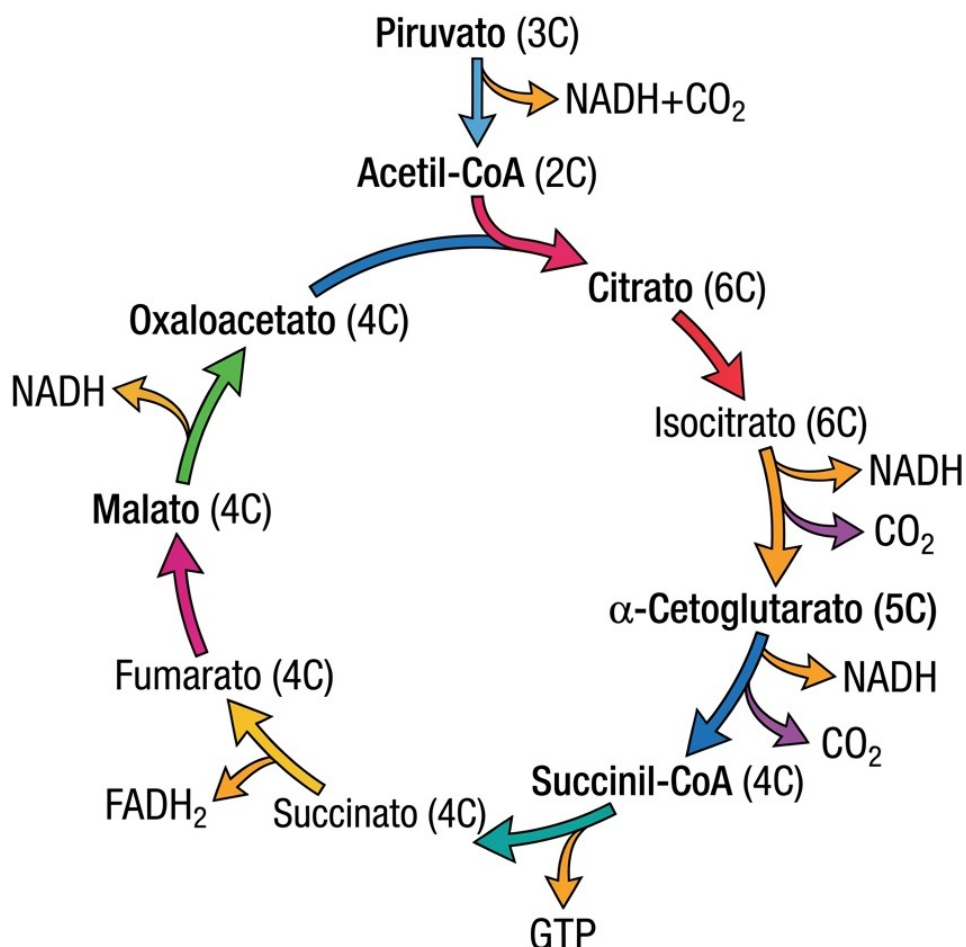


Figura 10.1. Esquema general de las reacciones del Ciclo de Krebs y descarboxilación oxidativa.

Propósitos

- Evaluar la rapidez con la que se efectúa el ciclo de Krebs empleando distintos alimentadores del ciclo

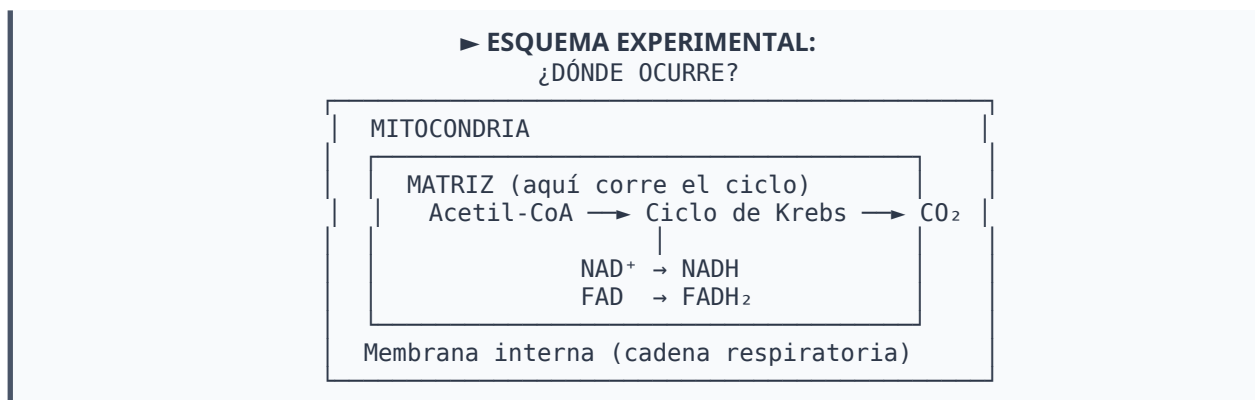
Introducción

El ciclo de Krebs es una ruta esencial y convergente en el metabolismo de azúcares, lípidos y aminoácidos. En esta práctica se aprenderá un método general y sencillo para evaluar el flujo de esta ruta en diversas fuentes biológicas, así como en presencia de diversos nutrientes.

Qué se estudia: el ciclo de Krebs de forma práctica (didáctica)

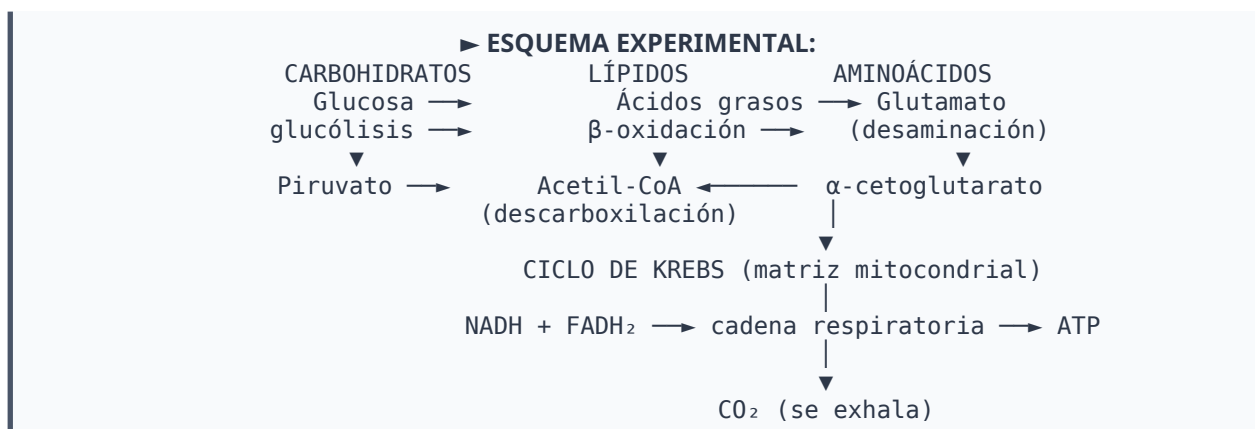
¿Qué es el ciclo de Krebs y dónde ocurre?

El ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico, TCA) es una serie de reacciones que **oxidar completamente** los carbonos del acetil-CoA hasta CO_2 , liberando electrones de alta energía. Ocurre en la **matriz mitocondrial** de las células eucariotas (el "interior" de la mitocondria). Estos electrones se almacenan en **NADH y FADH_2** , que después alimentan la cadena respiratoria (donde se genera la mayor parte del ATP).



¿Cómo se liga con otros procesos metabólicos?

El ciclo de Krebs es el "cruce de caminos" del metabolismo. Todo converge hacia él:



Cada alimentador entra al ciclo por un punto distinto:

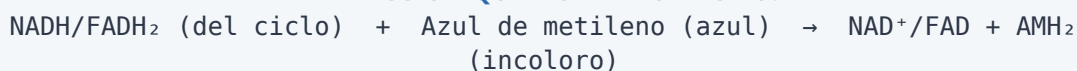
Alimentador	Cómo entra al ciclo	Ruta previa
Succinato	Directo al paso 6 (succinato deshidrogenasa, produce FADH_2)	Ya está en el ciclo

Alimentador	Cómo entra al ciclo	Ruta previa
Citrato	Directo al paso 1 (primer sustrato)	Se forma de acetil-CoA + oxaloacetato
Piruvato	→ Acetil-CoA → se une a oxaloacetato	Glucólisis
Glutamato	→ α -cetoglutarato (paso 4)	Aminoácidos
Glucosa	→ glucólisis → piruvato → Acetil-CoA	Carbohidratos
Fosfato (control)	No alimenta el ciclo	—

¿Cómo medimos la actividad del ciclo? → decoloración del azul de metileno

El ciclo produce **FADH₂** y **NADH** (equivalentes reductores). El **azul de metileno** (azul) acepta electrones de ellos y se reduce a su forma **incolora**:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



Más rápido se decolora el tubo = más equivalentes reductores = ciclo más activo

Resultados esperados:

Alimentador	Señal esperada (velocidad de decoloración)
Succinato	Rápida — entra directo al paso que produce FADH ₂
Citrato	Rápida — entra directo al inicio del ciclo
Piruvato	Rápida — requiere 1 paso para convertirse a acetil-CoA
Glutamato	Rápida — entra directo como α -cetoglutarato
Glucosa	Media — necesita la glucólisis completa primero
Fosfato (control)	Lenta o nula — no alimenta el ciclo

¿Qué tejidos se usan y qué esperar?

Tejido	Letra	Actividad esperada
Carne de res molida	C	Media (tejido muscular, mitocondrias presentes)
Hígado	H	Alta (órgano con mucha densidad mitocondrial)
Germinado de frijol	F	Media/baja (tejido vegetal)

◆ NOTA ACADÉMICA

OJO con el tejido vegetal (frijol): si se dejan los tubos por mucho tiempo (~48 h), los **fenoles y catalasas** propios del tejido vegetal pueden reducir el azul de metileno **lentamente por sí solos**, sin que sea actividad del ciclo de Krebs. Por eso es clave medir los tiempos dentro de la sesión y comparar contra el control. Este posible artefacto no debe confundirse con actividad del ciclo.

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / FUNDAMENTO

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** está la guía del **ciclo de Krebs** (Krebs cycle lab) con el fundamento y la interpretación del ensayo:
<https://interactomamodular.com/assets/guias/krebs-cycle-lab.pdf>.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
20	Tubos de ensayo	1	Azul de metileno 0.05 % en metanol, en gotero
7	Pipetas de 5 mL	20 mL	Ácido succínico 50 mM (0.118 g en 20 mL de agua)
1	Propipeta	20 mL	Glutamato de sodio 50 mM
3	Pipetas Pasteur	20 mL	Ácido cítrico 50 mM (0.19 g en 20 mL de agua)

#	Material	#	Reactivo
1	Espátula pequeña	20 mL	Ácido pirúvico 50 mM (0.134 g en 20 mL de agua)
100 g	Carne de res recién molida e hígado	20 mL	Glucosa 50 mM (0.18 g en 20 mL de agua)
1	Navaja de un filo (para picar la carne/hígado)	50 mL	PBS fresco y filtrado
5-10	Frijoles germinados		
3	Micropipetas de diferentes volúmenes y puntas		
1	Cronómetro		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
5	Semillas de frijol germinadas, molidas o trituradas en mortero o licuadora. Para obtener el germinado: incubar 4 días previos a la práctica, 5-10 frijoles frescos sobre un algodón humedecido con agua
50 g	Carne molida fresca
50 g	Hígado triturado fresco

◆ NOTA ACADÉMICA

Preparación del ácido cítrico: para 50 mM en 20 mL se requieren **~0.19 g** de ácido cítrico (peso molecular ≈ 192). El valor de 0.118 g del manual original estaba mal (corresponde al succinato, PM ≈ 118).

Mapa de tubos (18 tubos: 3 tejidos × 6 tratamientos)

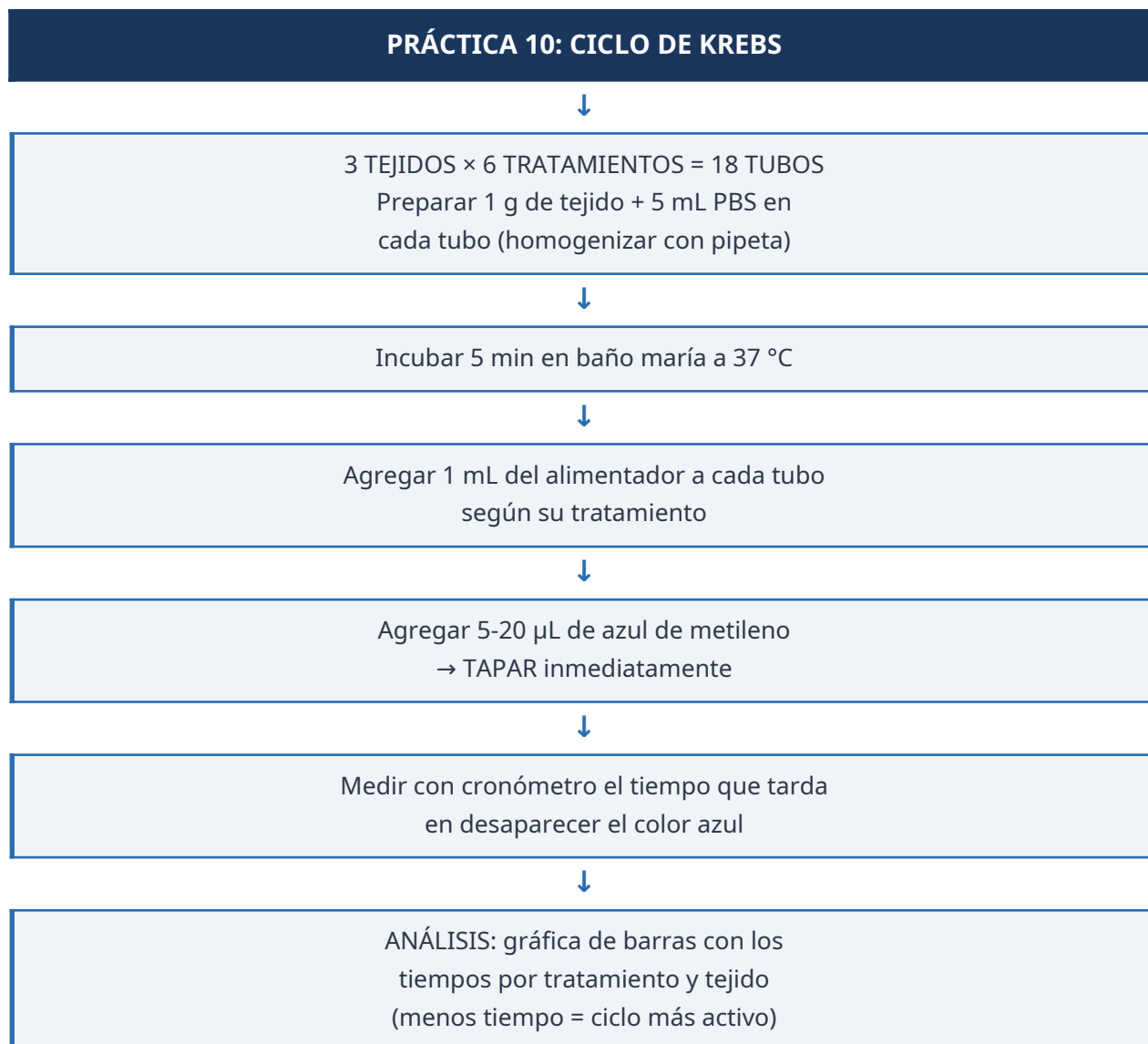
Tubo	Tejido (1 g)	Tratamiento (alimentador, 1 mL)	Rótulo
1C	Carne	Ácido succínico	1C
2C	Carne	Glutamato de sodio	2C
3C	Carne	Ácido cítrico	3C
4C	Carne	Ácido pirúvico	4C
5C	Carne	Glucosa	5C
6C	Carne	Control (fosfato)	6C
1H	Hígado	Ácido succínico	1H
2H	Hígado	Glutamato de sodio	2H
3H	Hígado	Ácido cítrico	3H
4H	Hígado	Ácido pirúvico	4H
5H	Hígado	Glucosa	5H
6H	Hígado	Control (fosfato)	6H
1F	Frijol	Ácido succínico	1F
2F	Frijol	Glutamato de sodio	2F
3F	Frijol	Ácido cítrico	3F
4F	Frijol	Ácido pirúvico	4F
5F	Frijol	Glucosa	5F
6F	Frijol	Control (fosfato)	6F

◆ NOTA ACADÉMICA

La letra del rótulo indica el tejido: **C** = carne, **H** = hígado, **F** = frijol (germinado). El tratamiento 6 (fosfato) es el **control negativo**: el fosfato no alimenta el ciclo y sirve para medir la decoloración basal del tejido.

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO



Procedimiento

Actividad 1. Preparación del extracto celular

1. A seis tubos previamente rotulados como se indica en la tabla, agregar **1 g de tejido de carne recién molida** (tratamientos 1C-6C).
2. Agregar a los tubos **5 mL de amortiguador PBS** y homogenizar con la ayuda de una pipeta Pasteur.

3. Preparar de forma similar homogenizados en otra serie de seis tubos, pero emplear ahora **1 g de tejido hepático** en cada tubo. Rotular de forma similar, pero usando la letra **H** después del número (1H-6H).
4. Finalmente, preparar otra serie de tubos usando ahora **1 g de germinado de frijol** macerado en mortero y usar la letra **F** en los rótulos (1F-6F).
5. Incubar todos los tubos por lo menos **cinco minutos en baño maría a 37 °C**.

Actividad 2. Medición de la velocidad de producción de $\text{FADH}_2/\text{NADH}$ (equivalentes reductores)

1. Agregar **1 mL del alimentador correspondiente** a cada tubo según su tratamiento (succinato, glutamato, citrato, piruvato o glucosa; en los tubos de control 6X se agrega fosfato o simplemente no se agrega alimentador) y agitar rápidamente.
2. Agregar **de 5 a 20 μL de azul de metileno** y agitar vigorosamente el tubo.

◆ NOTA ACADÉMICA

Concentración y volumen del indicador: es clave enfocarse en la **concentración del stock a usar** (0.05 % en metanol) y **no pasarse del volumen** indicado: si el color de la mezcla es demasiado intenso, tardará mucho en cambiar y no se apreciará el viraje. Recuerda que el tejido macerado (especialmente hígado, por la sangre) ya aporta color de fondo a la mezcla. Si aun así el color resulta muy intenso, diluir el reactivo de azul de metileno 1:10 antes de usarlo.

3. Tapar los tubos inmediatamente con un tapón de hule o papel parafilm.
4. Medir con un cronómetro el **tiempo que tarda en desaparecer o cambiar el color azul**.

Actividad 3. Análisis de los resultados

1. Construir **gráficas de barras** empleando los valores de los tiempos de cambio de coloración.
2. Comparar los tiempos entre tratamientos y discutir de acuerdo con la teoría de la literatura.

Práctica 11. Respiración aerobia

Propósitos

- Evaluar la rapidez con la que se consume el oxígeno en un sistema biológico (semillas germinadas)

Introducción

La respiración celular es un proceso biológico que le permitió a la vida evolucionar a niveles superiores de complejidad y adaptación versátil a cambios del ambiente. Contar con un método de monitoreo de este importante proceso es esencial para el estudio y la comprensión del metabolismo y el acoplamiento de rutas. Aunque muy básico y sencillo, el procedimiento que se usa en esta práctica sirve para monitorear el proceso, midiendo el oxígeno consumido por el aparato respiratorio de un sistema vegetal con alta demanda de energía. Esta estrategia se ha empleado, aunque con diferencias y con implementaciones mucho más sofisticadas, para estudios más profundos e integrales en campos de la fisiología y la medicina.

Qué se estudia (didáctica)

Un sistema semi-cerrado con semillas:

Dentro de un tubo sellado (respirómetro) colocamos semillas con distinta actividad metabólica. La idea es ver **cuánto oxígeno consume cada sistema** en un tiempo fijo.

Tubo	Contenido	Metabolismo aerobio
1	Semillas germinadas (15)	Alto — las raíces del germinado son el tejido con mayor demanda de O ₂
2	Semillas sin germinar (15) + perlas	Muy bajo — la semilla latente casi no respira
3	Solo perlas de vidrio	Nulo — material inerte (control)

◆ NOTA ACADÉMICA

Punto clave: las **raíces del germinado** son la parte metabólicamente más demandante de oxígeno, por eso el tubo 1 debería consumir más O₂. Las semillas sin germinar están "dormidas" y apenas respiran. Las perlas (o rocas) no tienen metabolismo: son el control de referencia.

¿Por qué se igualan los volúmenes con perlas?

Los 3 tubos deben tener **el mismo volumen de material sólido** para que la comparación sea justa. Como las semillas ocupan volumen, se compensa con perlas de vidrio en los tubos que tienen menos semillas. Para saber cuánto volumen ocupan las semillas, se miden por **desplazamiento de agua** (se sumergen en una probeta y se ve cuánto sube el nivel).

¿Por qué el KOH está dentro del tubo? (clave del respirómetro)

El respirómetro mide consumo de O_2 por **cambio de presión**. Pero la respiración produce CO_2 , que compensaría el oxígeno consumido y anularía el efecto:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

1. Las semillas RESPIRAN: consumen O_2 Y producen CO_2
 O_2 (consumido) → gas que sale de la atmósfera del tubo
 CO_2 (producido) → gas que entra a la atmósfera del tubo
 → si ambos ocurrieran, la presión no cambiaría y no mediríamos nada.
2. El KOH 2 M ABSORBE el CO_2 :
 $CO_2 + 2 KOH \rightarrow K_2CO_3$ (carbonato de potasio) + H_2O
 → el CO_2 producido ya no se acumula en el tubo.
3. Resultado: solo se pierde O_2 sin que se reemplace por CO_2
 → la presión dentro del tubo BAJA.
4. Como el tubo está sumergido en agua (semi-cerrado), la presión baja "jala" agua hacia la pipeta del tapón.
5. Más agua que entra a la pipeta = más O_2 consumido = más respiración.

► ESQUEMA EXPERIMENTAL:



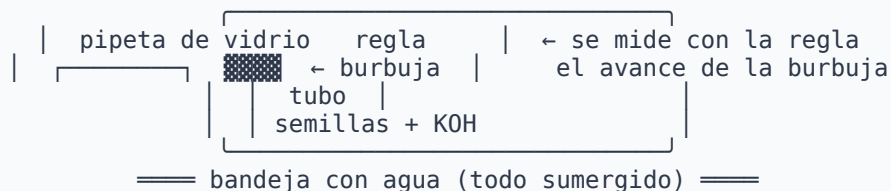
Cómo se ve y cómo se mide (montaje real):

- Se usan **tubos largos** con una **pipeta de vidrio** insertada en el tapón de hule.
- Todo el sistema (tubo + pipeta) queda **sumergido en el agua** de la bandeja, de forma horizontal, con solo la punta externa de la pipeta apoyada en el borde.
- Dentro de la pipeta de vidrio se forma una **burbuja de aire** en la punta. Al consumirse el O_2 , la presión baja y la **burbuja "crece" hacia adentro** (el agua avanza por la pipeta).

- Se mide con una **regla** la entrada del agua (el avance de la burbuja) desde la posición inicial. Cada 5 minutos se registra cuánto avanzó.

► **ESQUEMA EXPERIMENTAL:**

Vista real del respirómetro (en la bandeja con agua):



El reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT) — medición complementaria:

Al final, se macera el material vegetal y se agrega NBT. Este reactivo acepta electrones de las **deshidrogenasas respiratorias** (enzimas que siguen activas en el tejido) y se reduce a un compuesto **azul oscuro/negro**. Más color = más actividad de deshidrogenasas = más respiración previa.

◆ **ASPECTO DIDÁCTICO / FUNDAMENTO**

Paciencia con el NBT: el desarrollo de la coloración puede **tardar un poco**; obsérvese con cuidado y no se descarte la muestra si aún no cambia. Se puede preparar el macerado con tiempo y macerar bien el tejido para facilitar la reacción.

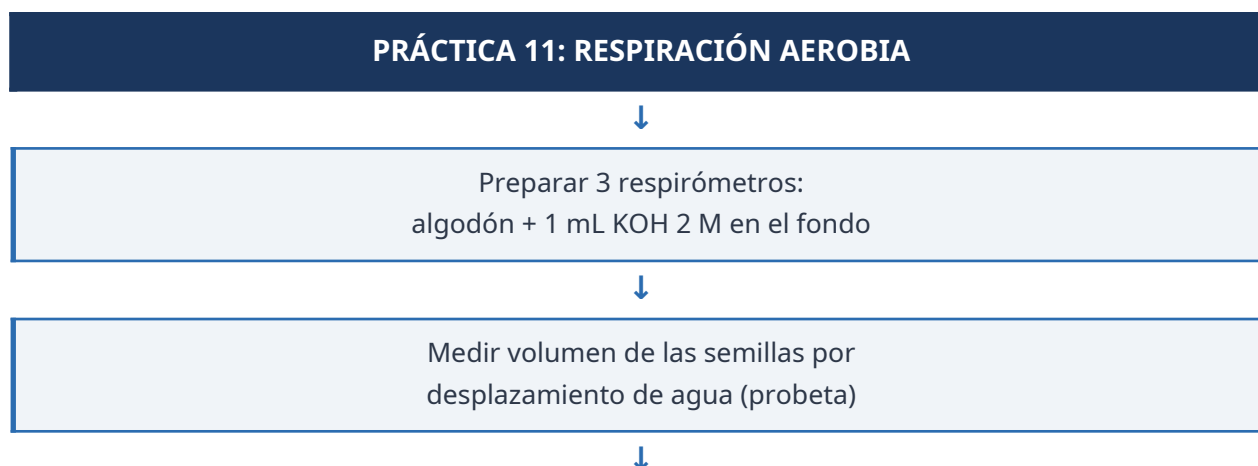
Requerimientos por equipo

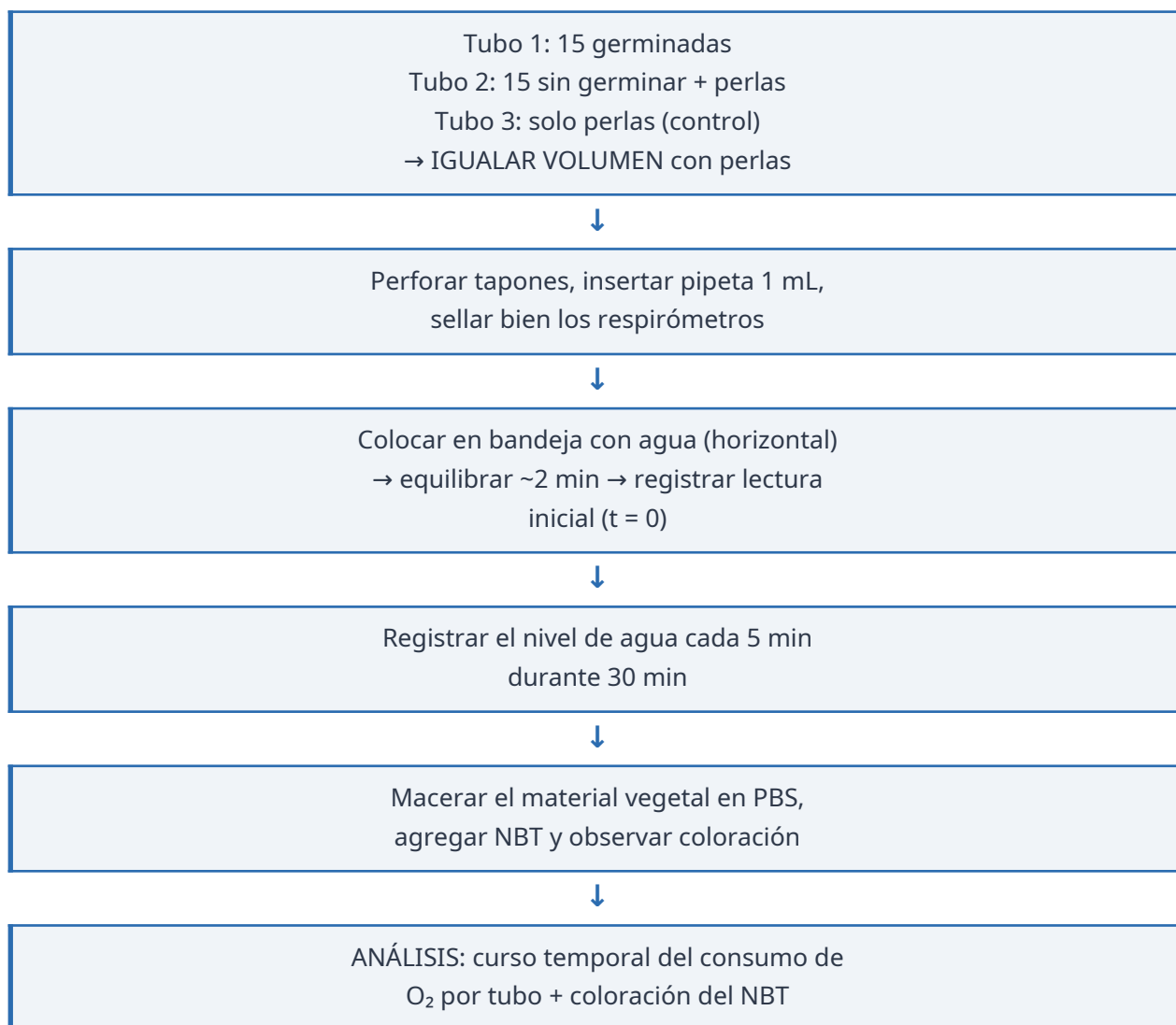
#	Material	#	Reactivo
3	Tubos de ensayo grandes y anchos, de fondo plano	1	Piseta con agua destilada
1	Gradilla	20 mL	Solución de nitroazul de tetrazolio (NBT)
1	Probeta de 100 mL	20 mL	KOH 2 M
1	Vaso de precipitado de 100 mL	50 mL	PBS 1x
15	Semillas de frijol germinadas		
15	Semillas de frijol sin germinar		

#	Material	#	Reactivo
20	Perlas de vidrio o canicas pequeñas		
3	Pipetas de 1 mL		
3	Tapones de hule para los tubos anchos, con un agujero que quepa la pipeta de 1 mL		
10 cm	Papel parafilm		
1	Bandeja de plástico larga (o charola desechable para hornear, ~45 cm)		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
20	Frijoles recién germinados (obtenidos igual que en la práctica anterior)
30	Perlas de ebullición de vidrio o canicas pequeñas

Diagrama de flujo profesional**► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO**



Procedimiento

Actividad 1. Preparación de los respirómetros

1. A tres tubos de ensayo grandes de boca ancha, colocar en el fondo 1 g de algodón y agregar 1 mL de hidróxido de potasio 2 M.
2. **Colocar** otra porción de 0.2 g de algodón sobre la primera capa.
3. A uno de los tubos, agregar **15 semillas de frijol germinado** (se obtienen de forma similar a la práctica anterior). Previamente, en una probeta de 100 mL, agregar 50 mL de agua destilada e introducir las 15 semillas germinadas para **registrar el volumen que ocupan** (por desplazamiento de agua).
4. Preparar **15 semillas de frijol no germinado** e introducirlas en una probeta con 50 mL de agua para **igualar el volumen del material** con el del tubo anterior; agregar

perlas de vidrio según lo que falte. Posteriormente, colocar los frijoles y las perlas secas en el **tubo 2**.

5. Para el **tubo 3**, poner la cantidad de perlas de vidrio que iguale el volumen de los otros dos tubos, empleando el mismo sistema de medición del volumen con la probeta conteniendo 50 mL de agua.

6. Para elaborar las tapas de los respirómetros, perforar tres tapones de hule con un sacabocados adecuado e introducir, por uno o dos centímetros, una **pipeta de 1 mL**, con mucho cuidado y de manera que quede bien sellado el orificio.

7. Tapar con estos tapones los respirómetros y colocarlos **de forma horizontal** sobre una bandeja larga con suficiente agua para cubrir completamente los respirómetros y las pipetas. **No introducir completamente la pipeta**; dejar reposar aproximadamente **2 minutos para que se equilibre la temperatura** antes de realizar las mediciones. En este paso, la punta externa de la pipeta puede recargarse en el borde de la bandeja.

8. (*Referencia opcional*) Ver el siguiente video para que esta actividad quede más clara: https://www.youtube.com/watch?v=oL7C9_3biZQ (respirómetro de semillas, respiración celular).

Actividad 2. Medición de la velocidad de consumo de oxígeno

1. Con cronómetro y bitácora a la mano, colocar de forma horizontal los respirómetros en la bandeja y permitir que se equilibren los volúmenes por un periodo de **dos minutos**.

2. Un poco de agua va a entrar a la pipeta. **Registrar hasta dónde entró el agua como lectura inicial ($t = 0$)**.

3. Enseguida, **cada cinco minutos durante media hora**, registrar los cambios en la marca de agua de la pipeta. **Entre más agua entre, más oxígeno se está consumiendo**.

4. Transcurridos los 30 minutos, sacar los respirómetros de la bandeja y recuperar el material vegetal y las esferas de vidrio de los tubos.

5. Macerar el material vegetal en mortero con la ayuda de 20 mL de PBS y verter 5 mL del líquido resultante en tubos de ensayo.

6. Agregar a los tubos **5 gotas de reactivo de nitroazul de tetrazolio** y observar las diferencias en el color. *La coloración puede tardar en desarrollarse: observar con paciencia y macerar bien el tejido.*

Actividad 3. Análisis de los resultados

1. Construir gráficos de los **cursos temporales** del consumo de oxígeno y analizar las diferencias entre los tratamientos.

2. Correlacionar los cursos temporales con los cambios en la coloración del indicador.

Práctica 12. Fotosíntesis

ESQUEMA DE LA FOTOSÍNTESIS

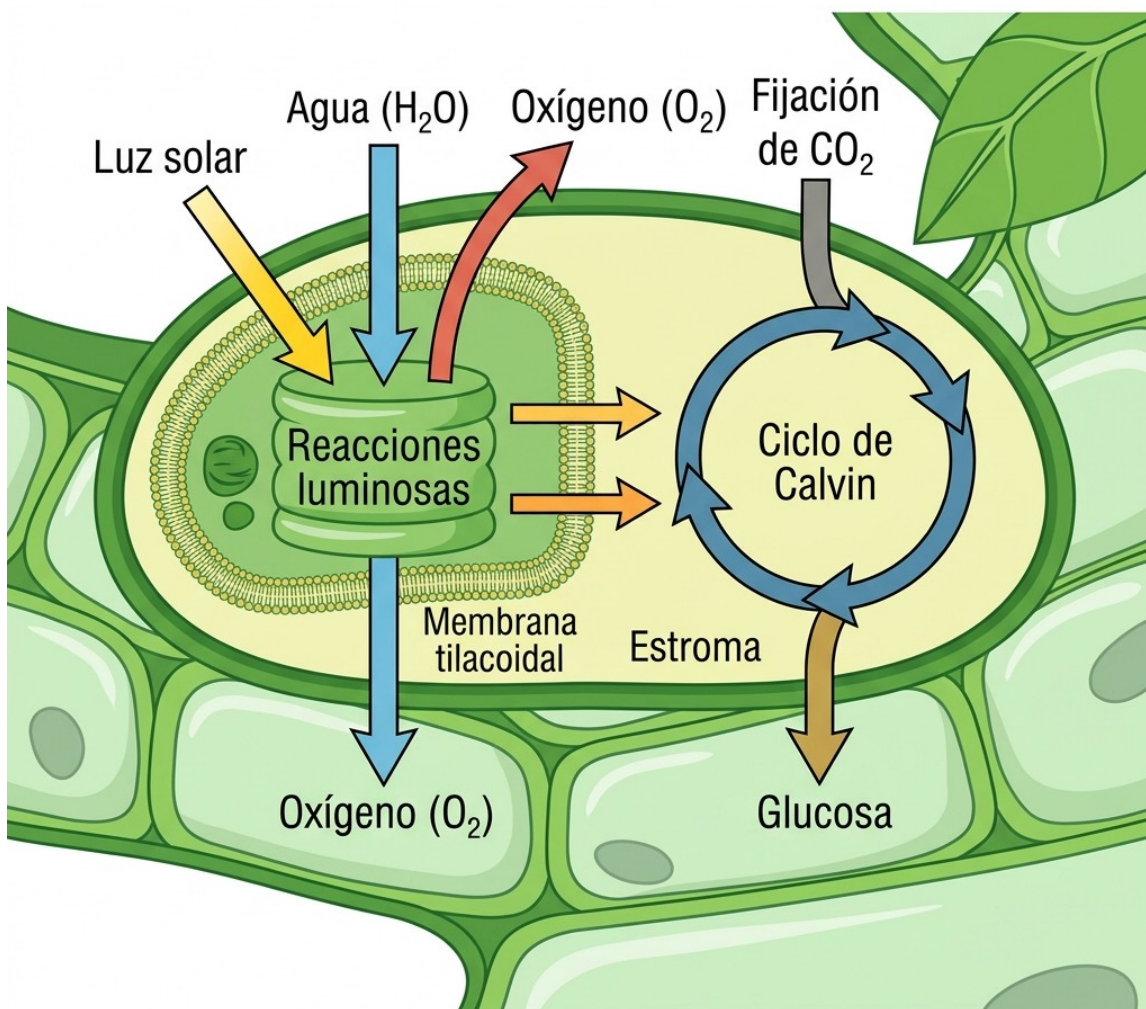


Figura 12.1. Esquema integrador de la fotosíntesis (fase luminosa y Ciclo de Calvin en español).

◆ NOTA ACADÉMICA

Importante — dos versiones de esta práctica:

◆ NOTA ACADÉMICA

- **Versión original (discos de espinaca):** conservada al final de esta sección como práctica ligada, según el manual de referencia.

◆ NOTA ACADÉMICA

- **Versión alternativa mejorada (algas filamentosas):** la que se desarrolla a continuación. El Dr. Ángel sugirió ubicarla como práctica alternativa (puede ir al final o casi al final del manual); los técnicos y el comité evaluador decidirán su posición final. Ambas versiones están ligadas desde aquí.

◆ NOTA ACADÉMICA

La alternativa con algas resuelve el problema de la original (inviabile en el tiempo de clase). **Nota del Dr. Ángel Díaz Sánchez, autor del manual.**

Propósitos

- Evaluar la fotosíntesis en organismos vivos mediante la observación de burbujas de O₂
- Conocer una técnica sencilla para monitorear la fotosíntesis en cultivo

Introducción

La fotosíntesis es un proceso bioquímico complejo en el que se produce el oxígeno que los organismos aerobios requieren para la respiración, y se genera la biomasa que alimenta a los heterótrofos. Aunque complejo, se han diseñado diversas estrategias para monitorear el proceso. Esta práctica usa **algas filamentosas** (de cuerpos de agua del Parque Central) cultivadas en medio de agar: la actividad fotosintética produce O₂, que queda **atrapado como burbujas visibles en la matriz de agar** — una señal macroscópica directa y cuantificable de la fotosíntesis oxigénica.

◆ NOTA ACADÉMICA

¿Por qué la versión alternativa y no la de discos de espinaca? La práctica original (discos de espinaca perforados que flotan) es **inviabile en el tiempo de clase**: requiere remojar la espinaca 2 h antes, cortar 100 discos, infiltrarlos al vacío y medir 6-7 tratamientos de 10-30 min cada uno (total 2.5-4 h de medición activa). Además, los focos de colores dan poca intensidad y los discos tardan mucho en flotar o nunca lo hacen. La versión de algas resuelve esto: el trabajo activo en clase es de ~60-90 min y el seguimiento es diferido (una semana). La versión original corregida se conserva al final de esta sección.

Qué se estudia (didáctica)

La fotosíntesis en dos fases — ¿qué es cada una y qué produce?

	FASE LUMINOSA	FASE OSCURA (Ciclo de Calvin)
¿Dónde ocurre?	En las membranas de los tilacoides (dentro del cloroplasto)	En el estroma del cloroplasto (el fluido que rodea a los tilacoides)
¿Necesita luz?	Sí — los fotones excitan el Fotosistema II	No directamente — usa los productos de la fase luminosa
¿Qué ocurre?	Fotólisis del agua: $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$	Fijación del CO_2 y su reducción hasta glucosa
¿Qué produce?	O_2 (se libera), ATP y NADPH (energía y poder reductor)	Glucosa (carbohidratos) usando ATP y NADPH
Dónde en planta	Cloroplastos de las células del mesófilo	Estroma del mismo cloroplasto
Dónde en alga	Cloroplasto (p. ej., cloroplasto helicoidal de <i>Spirogyra</i>)	Estroma del cloroplasto
Dónde en Spirulina	Membranas tilacoidales libres en el citoplasma (es procariota, sin cloroplasto definido)	Citoplasma (enzimas de Calvin libres)

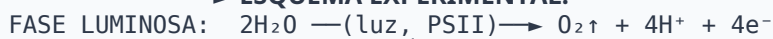
Lo común entre planta, alga y Spirulina: todas usan **clorofila** (a) para captar luz, rompen agua en la fase luminosa y liberan O_2 , y fijan CO_2 en la fase oscura para hacer azúcares. La diferencia es el "contenedor": planta y alga lo hacen dentro de cloroplastos (orgánulos con doble membrana); Spirulina lo hace en tilacoides libres en el citoplasma, porque es una bacteria (procariota).

Dato evolutivo interesante (Spirulina / cianobacterias):

◆ NOTA ACADÉMICA

Las cianobacterias (como *Arthrospira*, la "Spirulina") son organismos **procariotas antiquísimos** — se estima que existen desde hace unos 2,000 a 3,000 millones de años, según inferencias de fósiles y relojes moleculares. Son los **ancestros de los plastidios**: se piensa que hace ~1,500 millones de años, una cianobacteria ancestral fue englobada por una célula eucariota y estableció una **simbiosis** que dio origen al cloroplasto actual de plantas y algas. Hoy las cianobacterias viven libres o en simbiosis (por ejemplo, con hongos en líquenes), ayudando a generar azúcares vía fotosíntesis a cambio de protección y nutrientes.

Lo que medimos: las burbujas de O_2

► **ESQUEMA EXPERIMENTAL:**

O_2 difunde al agar → se forman microburbujas → crecen → visibles

Más burbujas = más fotólisis del agua = más actividad del Fotosistema II

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Las burbujas son sensibles al movimiento: al observar o medir, **evitar agitar/mover la placa** para no desprender las burbujas del agar y falsear el conteo.

¿Qué es el PPFD? Es la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (400-700 nm) en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Es la medida fisiológicamente correcta de la luz (no los lux, que miden percepción humana). Se mide con una app del celular (Photone u equivalente) colocando el sensor sobre el agar.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** está la guía de **fotosíntesis con algas** (cultivo y seguimiento) que corresponde a esta versión alternativa:

<https://interactomamodular.com/assets/guias/fotosintesis-algas-cultivo.html>. La versión original (discos de espinaca) tiene su guía en <https://interactomamodular.com/assets/guias/practical12-fotosintesis.pdf>.

⚙️ Modalidad de ejecución

Modalidad	Cómo
En el laboratorio V310 (preferida)	Se montan las placas en paralelo bajo focos especiales para plantas (luz fotosintética PAR) durante la sesión. Se dejan corriendo una semana y se mide el crecimiento según la intensidad de iluminación, incluidas las placas tapadas con aluminio.
Para llevar a casa	Se entregan cajas Petri ya listas (agar preparado) a cada equipo. En casa se exponen a luz LED o luz solar , a distintas distancias/longitudes de onda para tener distintos lux fotosintéticos, medidos con la app del celular. El alumno registra diariamente y trae resultados la siguiente semana.

◆ NOTA ACADÉMICA

En ambas modalidades el seguimiento es de **7-14 días** (ver tabla de registro diario). La observación de morfología se hace con microscopio óptico y estereoscopio.

Requerimientos por equipo

#	Material	Especificación	Función
16	Placas Petri	Plástico desechable, 60×15 mm	Cultivo individual por tratamiento (8 combinaciones × 2 réplicas)
1	Matraz Erlenmeyer	Vidrio borosilicato, 250 mL	Preparación y calentamiento del medio
2.5 g	Agar Aldrich Fine Powder	Grado analítico, alta claridad	Agente solidificante
1.5 mL	Fertilizante PISUMMA	Líquido inorgánico NPK 5-10-5 + micro	Fuente de nutrientes (dosis estándar)
(opc.) 3.0 mL	Fertilizante PISUMMA	Para el nivel enriquecido del factor A	Fuente de nutrientes (dosis enriquecida)
1	Potenciómetro	Calibrado antes de uso	Control de pH (paso crítico)
1-2	Lámparas PAR	Luz blanca fría, espectro fotosintéticamente activo	Irradiancia para VAR 1 y VAR 2
c/n	Papel aluminio	Estándar doméstico	Bloqueo total de luz (control negativo)
c/n	Parafilm / Micropore	Cinta de sellado	Prevenir deshidratación
1	Microscopio óptico + estereoscopio	10× y 40×	Observación morfológica

#	Material	Especificación	Función
1	App de celular (Photone)	iOS/Android, calibrada en $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	Medición de PPFD

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
c/n	Filamentos de alga del Parque Central (recolectar antes de la sesión)
1	Teléfono con app de medición de PPFD

Diseño factorial (16 placas)

Diseño **2 × 4**: Factor A = concentración de PISUMMA (1.5 mL y 3.0 mL por 200 mL); Factor B = nivel de luz (alta, media, baja, oscuridad). Con 2 réplicas por combinación = **16 placas**.

Placa	PISUMMA/200 mL	Tratamiento de luz	PPFD ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Réplica
P01	1.5 mL	Alta	_____	R1
P02	1.5 mL	Alta	_____	R2
P03	1.5 mL	Media	_____	R1
P04	1.5 mL	Media	_____	R2
P05	1.5 mL	Baja	_____	R1
P06	1.5 mL	Baja	_____	R2
P07	1.5 mL	Oscuridad	≈ 0	R1
P08	1.5 mL	Oscuridad	≈ 0	R2
P09	3.0 mL	Alta	_____	R1
P10	3.0 mL	Alta	_____	R2
P11	3.0 mL	Media	_____	R1
P12	3.0 mL	Media	_____	R2
P13	3.0 mL	Baja	_____	R1

Placa	PISUMMA/200 mL	Tratamiento de luz	PPFD ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Réplica
P14	3.0 mL	Baja	_____	R2
P15	3.0 mL	Oscuridad	≈ 0	R1
P16	3.0 mL	Oscuridad	≈ 0	R2

Cómo repartir según el número de equipos:

Equipos	Reparto
4 equipos	Cada equipo toma 4 placas (una combinación de luz completa $\times$ 1 réplica)
8 equipos	Cada equipo toma 2 placas (misma combinación, ambas réplicas R1 y R2)
2 equipos	Cada equipo toma 8 placas (todo el factor A de una dosis)

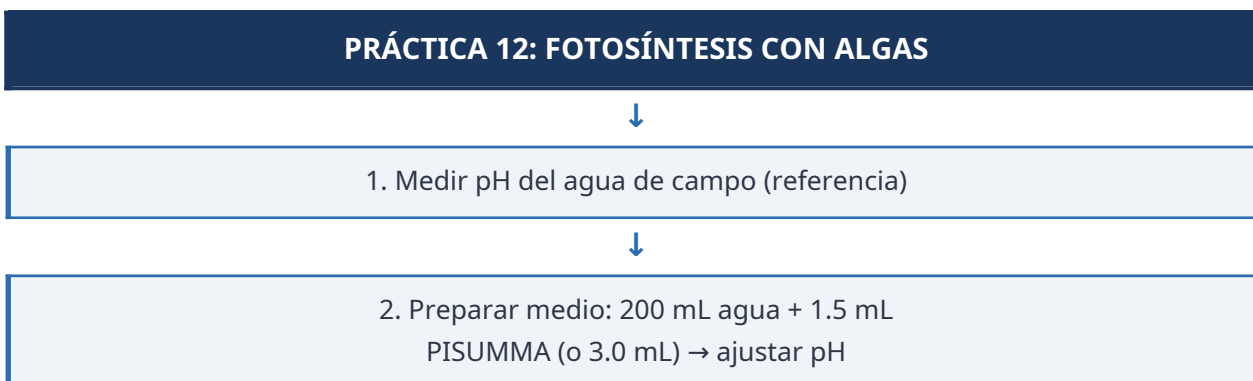
◆ NOTA ACADÉMICA

Registro de PPFD: antes de inocular cada placa, medir el PPFD con la app colocando el sensor sobre la superficie del agar y anotarlo en la tabla.

Registro diario (por placa): burbujas visibles/ cm^2 (estimado), cobertura del filamento (%), coloración (verde intensa / pálida / amarilla / parda), presencia de contaminantes (sí/no). Observar a la misma hora cada día. Las 16 placas se registran (R1 y R2).

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO





Procedimiento

Actividad 1. Preparación del medio y placas

1. Medir el pH del agua de campo (donde se recolectó la muestra) con el potenciómetro calibrado. Este valor es el pH "objetivo" del medio (las algas del Parque Central están adaptadas a ese rango, ~7.6-8.2). Anotar el valor exacto.

2. Preparar la solución base: medir 200 mL de agua destilada en el matraz de 250 mL; agregar 1.5 mL de fertilizante PISUMMA (o 3.0 mL para el nivel enriquecido) con pipeta o jeringa graduada; agitar ~30 s para homogeneizar.

3. Ajustar el pH: el PISUMMA es ácido. Verificar el pH y añadir solución de NaOH o KOH muy diluida, gota a gota, hasta alcanzar el valor de referencia de campo. No exceder pH 8.5. Ajustar **antes** de añadir el agar.

4. Disolver el agar: pesar 2.5 g de Agar Aldrich Fine Powder y agregarlo a la solución; agitar enérgicamente para dispersar el polvo y evitar grumos. Calentar en microondas en ciclos de 30-40 segundos, agitando entre pulsos, hasta que la solución pase de opaca a ámbar traslúcido. **No hervir continuamente** (protege la tiamina).

5. Vaciar en placas: dejar enfriar hasta ~55 °C (tolerable al tacto con cuidado); verter **20 mL por placa** Petri de 60×15 mm (16 placas), trabajando cerca del mechero o en área estéril. Dejar solidificar sin mover.

Actividad 2. Inoculación

6. Lavar el inóculo: tomar un cúmulo de filamentos con asa o pinza estéril; pasarlo por agua destilada estéril agitando suavemente 2-3 veces (desprende copépodos, rotíferos y ostrácodos). Repetir en una segunda gota limpia.

7. Medir PPFD: con la app del celular (Photone u equivalente), colocar el sensor sobre la superficie de cada placa y registrar el valor en la tabla.

8. Inocular el filamento lavado en el centro exacto de cada placa. Los heterótrofos residuales quedarán atrapados en el punto de origen y morirán por inanición en las primeras 24-48 h (el medio inorgánico los priva de carbono orgánico).

Actividad 3. Tratamientos e incubación

9. Asignar tratamientos: VAR 1 (luz directa, mínima distancia), VAR 2 (distancia media), VAR 3 (luz baja, máxima distancia o filtro), CTRL (oscuridad absoluta, papel aluminio por todos los lados).

10. Sellar los bordes con Parafilm o cinta micropore para retener humedad. Opcional: añadir una capa milimétrica de agua estéril sobre el agar.

11. Incubar bajo las lámparas PAR (laboratorio V310) o luz LED/solar (modalidad casa) durante **7-14 días**.

Actividad 4. Registro y análisis

12. Registrar diariamente a la misma hora: número de burbujas visibles por cm², cobertura del filamento (%), coloración, presencia de contaminantes. Los primeros resultados comparativos son esperables entre el día 3 y el día 7.

13. Análisis morfológico: observar los filamentos en microscopio óptico (10× para visión general, 40× para detalle celular) y estereoscopio. Si hay *Spirulina* disponible, comparar su morfología (filamento helicoidal, procariota) con la del alga filamentosa. Fotografiar al menos 3 campos por tratamiento. Estimar la pigmentación en escala semicuantitativa (+++ intensa, ++ media, + débil, – ausente).

14. (Opcional) Ensayos funcionales: NBT (detección de superóxido, color azul-violeta) y H₂O₂ (estrés fotooxidativo), según el protocolo de la versión original.

Actividad 5. Análisis de los resultados

1. Elaborar gráficas de los **cursos temporales** de la fotosíntesis (burbujas/cm² vs. día) por tratamiento.
2. Comparar las velocidades de aparición de burbujas entre los niveles de luz (VAR 1, VAR 2, VAR 3, CTRL) y entre las dosis de nutrientes (1.5 mL vs. 3.0 mL).
3. Correlacionar la producción de burbujas con el PPFD registrado y con la coloración/morfología observada.

Resultados esperados (referencia):

Tratamiento	Burbujas de O ₂	Cobertura	Coloración
VAR 1 (alta luz, PPFD > 100)	Máxima	≥ 15 mm a día 7	Verde intensa
VAR 2 (media, 20-80)	Moderada	5-15 mm	Verde media
VAR 3 (baja, < 20)	Mínima o nula	< 5 mm	Verde pálido
CTRL (oscuridad)	Nula	Sin crecimiento	Amarillo/parda

◆ NOTA ACADÉMICA

Señales de falla experimental (no confundir con resultado): sin burbujas en VAR 1 en todos los grupos = inóculo inactivo o medio mal preparado; crecimiento nulo en todo = pH fuera de rango; contaminación visible = esterilización/lavado insuficiente; burbujas en CTRL = fuga de luz en el aluminio.

Versión original ligada: Fotosíntesis por discos de espinaca

(Práctica original del manual, corregida. Se conserva como referencia y para que el comité evaluador decida su uso.)

Propósitos

- Evaluar la fotosíntesis en plantas
- Conocer una técnica sencilla para monitorear la fotosíntesis

Introducción

La fotosíntesis es un proceso bioquímico complejo en el que se produce el oxígeno que los organismos aerobios requieren para la respiración y se genera la biomasa nutricional de los quimioheterótrofos. En esta práctica se mide la producción de oxígeno en un sistema derivado de hojas verdes fotosintéticamente activas. La premisa del ensayo es que la actividad fotosintética produce oxígeno, lo que cambia la densidad de los discos de hoja y los hace flotar por el exceso de gas.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
2	Gradillas para tubos de ensayo	500 mL	Solución de bicarbonato de sodio al 0.02 %
5	Pipetas de 10 mL y propipeta	1 (gotero)	Jabón líquido
2	Vasos de precipitado de 50 mL	1 (gotero)	Solución de azul de tetrazolio
1	Parrilla de calentamiento	20 mL	Reactivo de DNS
3	Micropipetas de diferentes volúmenes y puntas	10 mL	Acetato de amonio 5 mM
1	Sacabocados de 4 mm		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
6	Conectores de luz con soquet (para todo el grupo)
6	Focos no LED de 100 watts (rojo, naranja, amarillo, verde, azul y morado)
7	Cajas de cartón de 50×50×50 cm
1	Perforadora de hojas de papel o sacabocados pequeño

#	Material
5	Jeringas de 20 mL
5	Hojas de espinaca frescas

Actividad 1. Preparación de los discos de vegetal

1. Dejar remojando las hojas de espinaca **dos horas antes** de la práctica en agua fría (no es esencial).
2. Obtener **100 discos** de hoja de espinaca fresca, cortados con una perforadora de papel o un sacabocados.
3. Colocar los discos en 50 mL de una solución de bicarbonato al 0.02 %, con una pequeña gota de jabón líquido, y mezclar (no usar detergente).
4. Tomar **10 discos** y colocarlos dentro de una jeringa de 20 mL. Repetir llenando el resto de las jeringas.
5. Succionar con las jeringas **8 mL** de la solución de bicarbonato.
6. Retirar el aire dentro de la jeringa presionando el émbolo hasta que el líquido comience a salir de la punta; sellar la punta presionándola fuertemente **con el dedo**.
7. Sin quitar el dedo, jalar el émbolo de la jeringa y agitarla constantemente.
8. Repetir este procedimiento hasta que todos los discos se localicen en el fondo de la jeringa.
9. Colocar en gradillas las jeringas con los discos y distribuirlos como se menciona a continuación.

Actividad 2. Tratamiento lumínico a los discos

1. Armar un sistema de iluminación para cada uno de los focos de colores (rojo, naranja, amarillo, verde, azul y morado) dentro de una caja de cartón de 50×50×50 cm; la luz debe estar a un lado de una gradilla de tubos a una distancia de unos 10 cm. Hacer un pequeño orificio en la caja para poder observar la jeringa.
2. Colocar la gradilla con la jeringa que tiene discos en la mesa de trabajo y tapar con la caja, de manera que la luz del foco incida directamente dentro de la caja.
3. A otro tubo, colocarlo en una caja sin iluminación (**control de oscuridad**).
4. **Contar los discos que van flotando** con respecto al tiempo y contrastar las velocidades de los diferentes filtros.
5. Al final del experimento, **tomar** cinco discos de los que flotaron de cada tratamiento y realizar una extracción de biomoléculas para medir la reacción con azul de tetrazolio

y DNS. Tomar cinco discos que no flotaron del tratamiento de **oscuridad** para usar como control negativo.

Actividad 3. Análisis de resultados

1. Elaborar una gráfica de los cursos temporales de la fotosíntesis (discos que flotan contra el tiempo).
2. Comparar las velocidades de flotación en los diferentes tratamientos.
3. Contrastar los resultados de **azúcares reductores** y de NADPH.

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota de viabilidad: esta versión requiere 2.5-4 h de medición activa (remojo previo de 2 h, 100 discos, infiltración al vacío y 6-7 tratamientos). En sesiones de 2 horas es recomendable usar la **versión alternativa con algas** (sección principal de la Práctica 12).

Práctica 13. Extracción y solubilidad de los lípidos

ESQUEMA DE EXTRACCIÓN Y SOLUBILIDAD DE LÍPIDOS

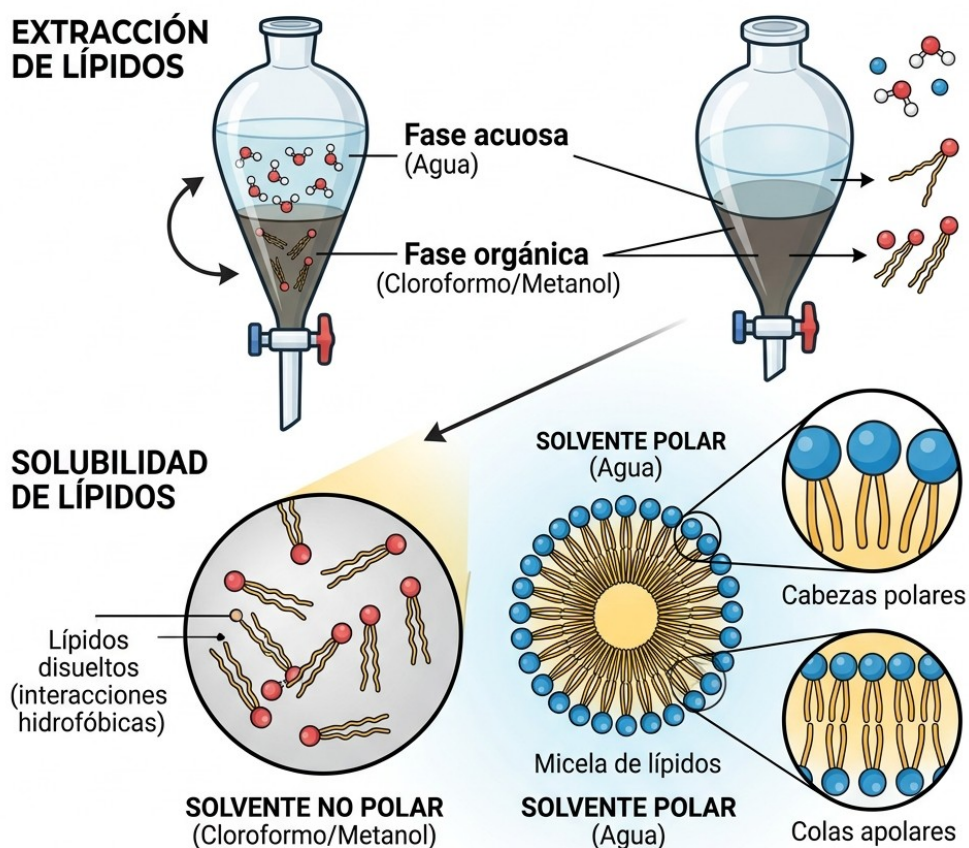


Figura 13.1. Esquema de extracción de lípidos en dos fases y estructura anfipática (micela).

Propósitos

- Conocer técnicas rápidas para aislar lípidos de muestras biológicas
- Identificar y medir las propiedades de los lípidos

Introducción

Los lípidos y su metabolismo son centrales en todos los organismos biológicos. La mayoría de las reacciones bioquímicas ocurren en un ambiente acuoso, y el estudio de las rutas en las que participan compuestos hidrofóbicos como los lípidos es relativamente más complejo. Por eso es esencial contar con métodos de extracción, solubilización y estabilización de estas biomoléculas para poder estudiar las reacciones en las que

participan. En esta práctica se realizan actividades para aprender métodos generales y sencillos de extraer y solubilizar lípidos de diversas fuentes.

Qué se estudia (didáctica)

El principio clave: "lo semejante disuelve a lo semejante"

Los lípidos son **hidrofóbicos** (apolares) y no se disuelven en agua (polar). Para extraerlos o disolverlos usamos solventes orgánicos apolares. La regla es:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

Solvente POLAR (agua)	→ disuelve moléculas polares (azúcares, sales)
Solvente APOLAR (hexano)	→ disuelve moléculas apolares (lípidos)
Acetona	→ solvente "intermedio" (parcialmente polar)

Polaridad según la estructura de cada lípido:

Lípido	Estructura	Naturaleza	Se disuelve en
Triglicéridos (aceite, mantequilla)	3 cadenas alifáticas + glicerol	Muy apolares	Hexano, acetona (no en agua)
Fosfolípidos	Cola alifática + cabeza con fosfato	Anfipáticos (cola apolar, cabeza polar)	Hexano (cola); parcial en mezclas
Colesterol	Anillo esteroide + OH (casi apolar)	Poco polar	Acetona fría, hexano
Lípidos de semilla	Mezcla (triglicéridos + fosfolípidos)	Mixta	Hexano, acetona

Resultados visuales esperados en las pruebas de solubilidad:

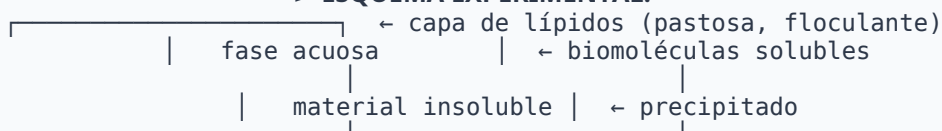
- **En agua:** el lípido **no se disuelve** — quedará como gotas flotando, capa aceitosa en la superficie, o un precipitado. La mezcla se ve **turbia**.
- **En hexano:** el lípido **se disuelve** — la solución queda **transparente/limpia** (una sola fase).
- **En mezclas agua/acetona/hexano:** transición gradual — disolución parcial, turbidez intermedia, o separación en dos fases.
- **Conclusión:** a mayor afinidad lípido-solvente, más transparente y homogénea queda la solución.

Floculación (extracción de lípidos por centrifugación):

Al centrifugar un homogenizado acuoso, las fases se separan por densidad:

- **Abajo:** material insoluble (restos celulares)
- **Medio:** fase acuosa con biomoléculas solubles en agua
- **Arriba:** capa de lípidos (menos densos que el agua) → son la "floculación" pastosa que recuperamos

► **ESQUEMA EXPERIMENTAL:**



◆ **ASPECTO DIDÁCTICO / FUNDAMENTO**

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** está la guía de **extracción de lípidos** con el fundamento y la interpretación:

<https://interactomamodular.com/assets/guias/practica13-extraccion-lipidos.pdf>.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
20	Tubos de ensayo	50 mL	Acetona fría
2	Gradillas	0.5 g	Colesterol estándar
1	Probetas de 10 y 25 mL	50 mL	Hexano
2	Vasos de 50 y 100 mL (gotero)		Reactivo de colesterol (Boehringer-Mannheim)
3	Pipetas de 1, 5 y 10 mL	20 mL	PBS 1x
5	Pipetas Pasteur		
1	Varilla de vidrio para agitar		
1	Espátula		
1	Centrífuga		
3	Propipetas		
1	Baño termostático a 37 °C		

#	Material	#	Reactivo
1	Micropipeta de varios volúmenes y puntas		
1	Espectrofotómetro		
1	Celdas de vidrio		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1 g	Mantequilla
50 mL	Aceite de olivo
1	Huevo de gallina (se usan 4 g de yema en total: 2 g para acetona + 2 g para hexano)
10 g	Semilla de calabaza

Diagrama de flujo profesional**► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO**
**PRÁCTICA 13: EXTRACCIÓN Y SOLUBILIDAD
DE LÍPIDOS**


Act. 1	Act. 2	Act. 3	Act. 4
Flocula- ción de semilla tras)	Solubili- dad (3 mues- (ac+hex)	Coleste- rol de yema -Mannheim)	Identif. colesterol (Boehringer



Act. 5: Análisis — discutir rendimiento,
solubilidad relativa y aplicaciones

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de lípidos por floculación

1. Obtener **2 g de semilla de calabaza sin cáscara**.
2. Triturar en mortero.
3. Agregar 5 mL de PBS y resuspender.
4. Colocar en microtubos y centrifugar a 14000 rpm (o máxima velocidad) por **5 minutos**. Alternativamente, en centrífuga clínica a 3000 rpm por **10 minutos**.
5. Al final se obtendrán tres fases (ver sección didáctica): abajo el material insoluble, en medio la fase acuosa con biomoléculas solubles, y arriba los lípidos (principalmente fosfolípidos).
6. Tomar la fase pastosa de lípidos y colocarla en un microtubo para su posterior uso.

Actividad 2. Pruebas de solubilidad

1. Preparar **3 series** de tubos (una por muestra: lípidos de semilla, aceite de olivo y mantequilla), cada serie con la siguiente tabla de solventes:

Tubo	Solvente	mL de agua	mL de acetona	mL de hexano
1	Agua	5	—	—
2	Acetona	—	5	—
3	Hexano	—	—	5
4	Agua/acetona 25/75	1.25	3.75	—
5	Agua/hexano 25/75	1.25	—	3.75
6	Agua/acetona/ hexano 10/40/50	0.5	2	2.5
7	Acetona/hexano 50/50	—	2.5	2.5

2. A **cada tubo** de la serie de aceite de olivo, agregar **30 gotas de aceite**.
3. A **cada tubo** de la serie de extracto de semillas, agregar **0.5 g de extracto**.
4. A **cada tubo** de la serie de mantequilla, agregar **0.5 g de mantequilla**.
5. Observar los diferentes niveles de solubilización (transparente, turbio, dos fases, flotación) y registrar.

Actividad 3. Extracción de colesterol de yema de huevo

◆ NOTA ACADÉMICA

Nomenclatura de fracciones: H = homogenado, F = fracción (sobrenadante), A = acetona, H = hexano. Ejemplo: **HA1** = homogenado de yema en acetona, primera vez; **FA1** = fracción acetónica 1 (sobrenadante).

1. Obtener **2 g de yema de huevo** y colocarlos sobre un tubo cónico de centrífuga.
2. Agregar 5 mL de **acetona fría** y agitar hasta obtener un homogenado (**HA1**).
3. Tomar una alícuota de 0.5 mL de HA1 (para la identificación posterior).
4. Centrifugar el remanente a 3500 rpm por 10 minutos.
5. Extraer el sobrenadante, que **se llama** fracción acetónica 1 (**FA1**), y reservarlo para su posterior uso.
6. Tomar el sedimento (precipitado) resultante del centrifugado de HA1.
7. **Re-extraer** del sedimento más colesterol agregando otros 5 mL de acetona fría y agitando. En este punto se genera un **HA2** (tomar alícuota de 0.5 mL). *La re-extracción recupera el colesterol que no se disolvió en la primera pasada, mejorando el rendimiento.*
8. Centrifugar HA2 como en el paso 4 y recuperar el sobrenadante (**FA2**); reservar para su uso posterior.
9. Obtener **otros 2 g de yema** y colocarlos sobre un tubo cónico de centrífuga (esta segunda porción se extrae con hexano).
10. Agregar 5 mL de **hexano** y agitar hasta obtener un homogenado (**HH1**).
11. Tomar una alícuota de 0.5 mL de HH1.
12. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.
13. Extraer el sobrenadante, que se llama fracción hexánica 1 (**FH1**).
14. Tomar el precipitado de HH1 y **re-extraer** del sedimento más colesterol agregando 5 mL de hexano, generando un **HH2** (tomar alícuota de 0.5 mL).
15. Centrifugar HH2 como en el paso 12 y recuperar el sobrenadante resultante (**FH2**).
16. Reservar en frío hasta su posterior uso.

Actividad 4. Identificación de colesterol presente en las fracciones

1. Agregar **0.4 mL** de cada fracción obtenida (HA1, FA1, HA2, FA2, HH1, FH1, HH2, FH2) en tubos rotulados.
2. Agregar **0.4 mL de agua destilada** en un tubo rotulado como **blanco**.

3. Agregar **10 gotas** del reactivo de Boehringer-Mannheim a cada tubo, incluido el blanco.

4. Incubar por **20 minutos a 37 °C**.

5. Observar los cambios de coloración (mayor intensidad = mayor contenido de colesterol).

Actividad 5. Análisis de los datos

1. Proponer un experimento o estudio donde pueda emplearse la técnica de aislamiento de lípidos de membrana usada en la **Actividad 1**.

2. Valorar el rendimiento de colesterol extraído en cada fracción de la **Actividad 3** (comparar acetónica vs. hexánica, y primera vs. segunda extracción).

3. Discutir la solubilidad relativa de las fracciones lipídicas de la **Actividad 2**, en términos fisicoquímicos (polaridad del lípido y del solvente).

Práctica 14A. Metabolismo de los lípidos

Propósitos

- Observar la conversión de ácidos grasos a carbohidratos durante la germinación de semillas
- Observar el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis

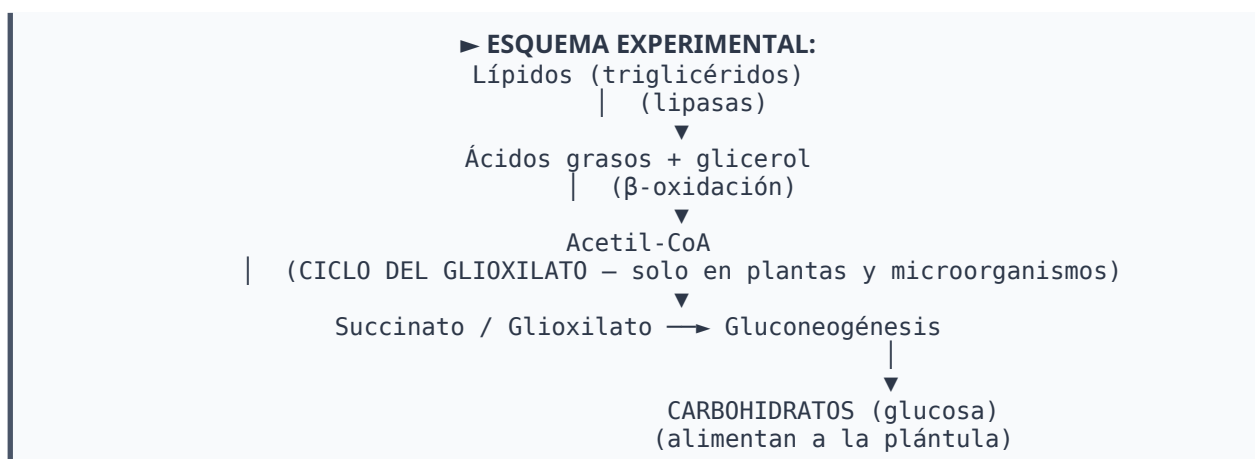
Introducción

El estudio directo del metabolismo de lípidos es complicado para realizarse en una práctica de laboratorio con pocas horas. Por ello, aquí se estudia mediante el **monitoreo indirecto de la biomasa de la fracción lipídica total** de un modelo vegetal en dos condiciones o etapas de demanda energética. Las semillas contienen embriones y los nutrientes que un nuevo individuo necesita durante la fase no fotosintética, así como las enzimas que procesan los almacenes energéticos (almidón y lípidos). En la etapa de germinación es esencial que los lípidos sean degradados y entren en el **ciclo del glioxilato y del Krebs** para que la planta obtenga fuentes de carbono y energía. En esta práctica no se miden directamente los flujos de estas rutas, sino que se **infieren por una disminución (consumo) del contenido lipídico** durante la germinación.

Qué se estudia (didáctica)

La conversión de lípidos en carbohidratos durante la germinación:

Cuando una semilla germina, aún no puede hacer fotosíntesis (está bajo tierra o en oscuridad). Para sobrevivir, **moviliza sus reservas**: degrada los lípidos almacenados (triglicéridos) y los convierte en **carbohidratos** mediante dos rutas acopladas:



¿Qué esperar en cada condición?

Condición	Contenido de lípidos	Contenido de carbohidratos
Semilla sin germinar	Alto (reserva intacta)	Bajo
Semilla germinada	Bajo (ya consumidos)	Alto (convertidos)

◆ NOTA ACADÉMICA

Importante — misma especie: esta comparación solo es válida si se usa la **misma especie** de semilla en ambas condiciones (p. ej., ajonjolí germinado vs. ajonjolí sin germinar). Si se usan especies distintas, se introduce una variable extra que invalida la comparación.

El método fenol-sulfúrico (Dubois) para carbohidratos:

Los azúcares reaccionan con **fenol** en **ácido sulfúrico concentrado** (reacción muy exotérmica) produciendo un **color ámbar/naranja** medible a **485 nm**. La intensidad del color es proporcional a la concentración de carbohidratos:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

Azúcar + fenol + H_2SO_4 concentrado $\xrightarrow{\text{(calor)}}$ color ámbar/naranja (485 nm)

Proteína (A280) — referencia comparativa simple:

La absorbancia a 280 nm refleja la presencia de proteínas (por triptófano y tirosina). Aquí se usa solo como **referencia comparativa simple** entre las dos condiciones — no es una cuantificación rigurosa (para eso se usaría Bradford o similar). No se necesita precisión de laboratorio de enzimología.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
20	Tubos de ensayo	10 mL	Mezcla cloroformo-metanol 2:1
1	Gradilla	10 mL	Fenol al 5 %
1	Recipiente para hielo	40 mL	H_2SO_4 concentrado
4	Tubos de centrifuga		Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.5, 3 mM de MgCl_2

#	Material	#	Reactivo
2	Embudos		Reactivo de Biuret
1	Papel filtro	5 mL	Solución patrón de glucosa 10 mg/mL
1	Parafilm	5 mL	Solución patrón de caseína 20 mg/mL
1	Pipeta Pasteur		Solución de NaCl al 1 %
2	Vasos de precipitado de 25 mL		Sulfato de sodio anhidro
4	Vasos de precipitado de 50 mL		
4	Pipetas de 1 mL		
2	Pipetas de 5 mL		
2	Pipetas de 10 mL		
2	Pipetas Pasteur		
1	Piseta		
4	Tubos de espectrofotómetro		
1	Horno para pesar		
1	Balanza granataria		
1	Espátula		
1	Centrífuga		
1	Baño maría		
1	Espectrofotómetro		

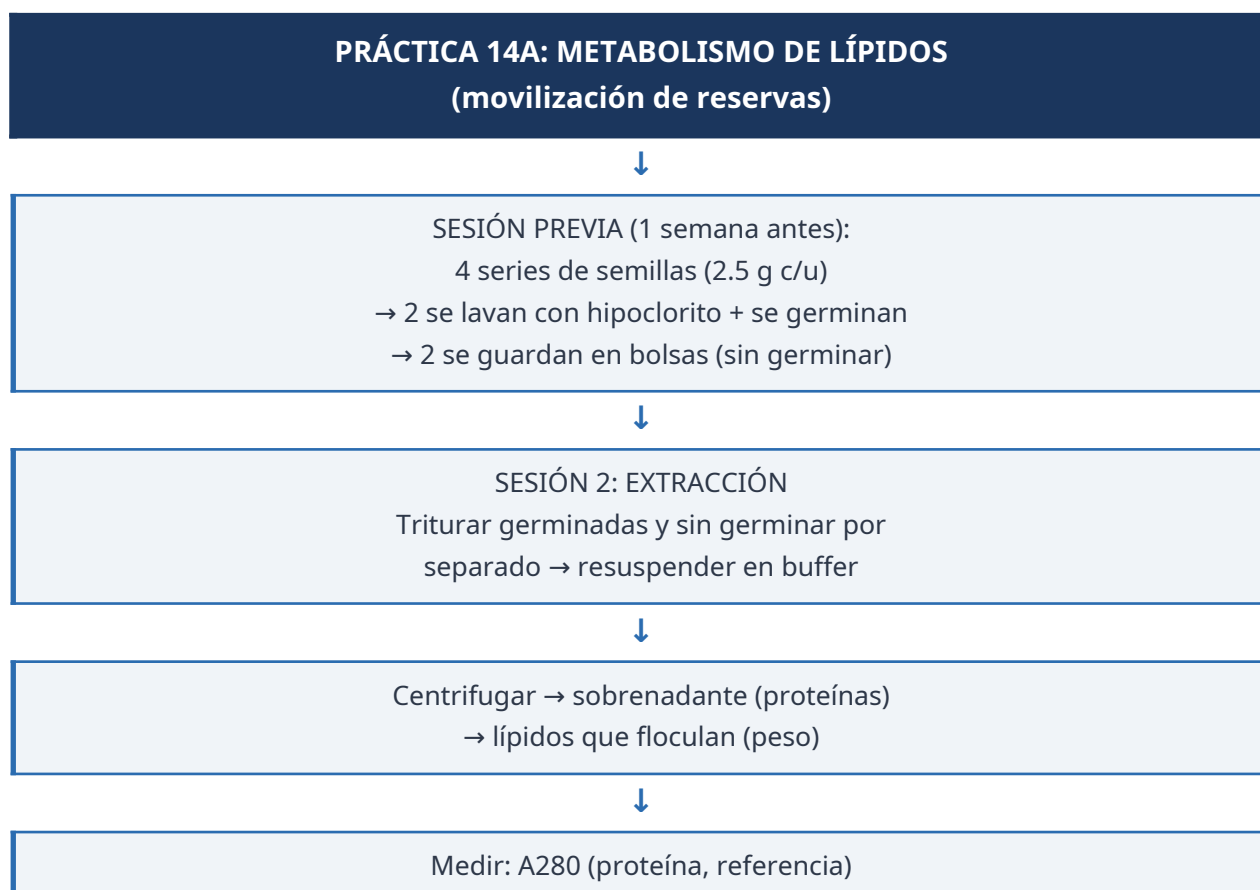
Por alumno (primera sesión)

#	Material
2	Frascos de boca ancha

#	Material
2	Ligas
1	Paquete de gasas
1	Papel aluminio
1	Charola
1	Solución de hipoclorito de sodio al 1 %

Por alumno (segunda sesión)

#	Material
1	Bolsa de hielo

Diagrama de flujo profesional**► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO**

Peso seco de lípidos (horno)
Carbohidratos (fenol-sulfúrico, 485 nm)



ANÁLISIS: comparar germinada vs sin
germinar (lípidos ↓ y carbohidratos ↑
en la germinada)

Procedimiento

Actividad 1. Preparación de las muestras de semillas (hacer una semana antes de la práctica)

1. Preparar **4 series** de semillas de ajonjolí o de girasol (sin cáscara), de **2.5 g** cada serie.
2. **Lavar 2 series** de las semillas con 50 mL de solución de hipoclorito de sodio al 1 % y enjuagarlas con agua previamente hervida y atemperada a 25 °C.
3. Colocar en cada uno de dos frascos de boca ancha una capa de gasa en el fondo y 2.5 g de semillas; tapar con 2 capas de gasa sostenidas con una liga.
4. Guardar las **dos series restantes** en bolsas ziplock (quedan sin germinar).
5. En una bandeja con un poco de agua, colocar los dos frascos **boca abajo**.
6. Mantener los frascos en la bandeja con agua durante **4 días**, tapados con papel aluminio, a temperatura ambiente.

Actividad 2. Extracción del material biológico

1. Procesar una serie de semillas **germinadas** y otra de semillas **no germinadas**.
2. Triturar por separado en un mortero frío, o en una licuadora o trituradora para café.
3. Agregar y **resuspender** las semillas o germinados en 10 mL de amortiguador de fosfatos.
4. Centrifugar el homogenizado a 14000 rpm por 5 minutos, o a 3000 rpm por 10 minutos.
5. Decantar el sobrenadante sobre un tubo limpio y seco.
6. Medir la concentración de proteínas en los sobrenadantes midiendo la **absorbancia a 280 nm** (referencia comparativa simple de presencia de proteína).
7. Tomar el **material lipídico que flocluló** (capa superior).

8. Secar en horno y pesar los lípidos (este peso se usa en el análisis final para comparar las dos condiciones).

Actividad 3. Determinación del contenido de carbohidratos (método fenol-sulfúrico)

1. Preparar los siguientes tubos, pipeteando como se indica. Los tubos 1-6 son la **curva estándar de glucosa**; los tubos 7-10 son las **muestras** (Ext Ger = extracto de germinado, Ext sem = extracto de semilla, a diluciones 1:20 y 1:50):

Tubo	Sol. glucosa (mL)	Agua (mL)	Ext Ger 1:20	Ext Ger 1:50	Ext sem 1:20	Ext sem 1:50	Fenol (mL)	Sulfúrico (mL)
1	0	1	—	—	—	—	0.6	3.6
2	0.2	0.8	—	—	—	—	0.6	3.6
3	0.4	0.6	—	—	—	—	0.6	3.6
4	0.6	0.4	—	—	—	—	0.6	3.6
5	0.8	0.2	—	—	—	—	0.6	3.6
6	1.0	0	—	—	—	—	0.6	3.6
7	—	0.5	0.5	—	—	—	0.6	3.6
8	—	0.5	—	0.5	—	—	0.6	3.6
9	—	0.5	—	—	0.5	—	0.6	3.6
10	—	0.5	—	—	—	0.5	0.6	3.6

2. Agitar con precaución, ya que la reacción es muy exotérmica (el ácido sulfúrico concentrado genera mucho calor).

3. Permitir que los tubos se atemperen y **leer absorbancia a 485 nm**.

4. Interpolare las muestras en la curva estándar para estimar el contenido de carbohidratos.

Actividad 4. Análisis de los resultados

1. Comparar los tratamientos efectuados: contenido de lípidos (peso seco) y de carbohidratos (485 nm) entre semillas germinadas y sin germinar.

2. Corregir los valores usando los coeficientes de extinción molar para la concentración de proteína, de carbohidratos y el peso de lípidos.

3. Interpretar: la germinada debe mostrar **menos lípidos y más carbohidratos** (evidencia de la conversión ácidos grasos → carbohidratos vía glioxilato/gluconeogénesis).

Práctica 14B. Detección de cuerpos cetónicos

Propósitos

- Observar la presencia de cuerpos cetónicos en muestras de sangre obtenidas en diferentes condiciones metabólicas

Introducción

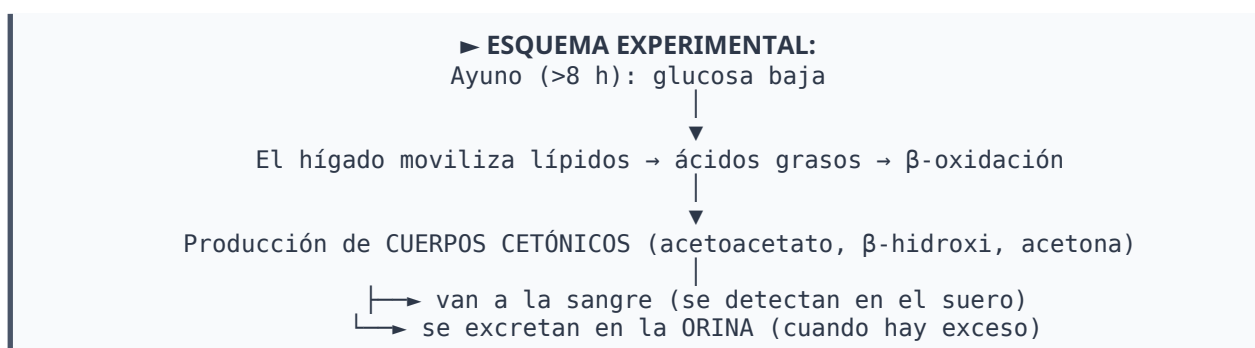
Durante el metabolismo de los lípidos, en condiciones de hipoglucemia o ayuno en animales, se produce un flujo de fuentes energéticas intertejidos con el fin de proveer las demandas energéticas de los tejidos con altos consumos. Parte de esta dinámica bioenergética es movilizada por medio de los **cuerpos cetónicos**. En esta práctica se detectan y comparan el contenido de cuerpos cetónicos en orina y suero sanguíneo en personas que presentan **ayuno prolongado** y personas con **ingesta de carbohidratos normal y reciente**.

Qué se estudia (didáctica)

¿Qué son los cuerpos cetónicos?

Son moléculas de "combustible alternativo" que el hígado produce cuando la glucosa escasea (ayuno, dieta baja en carbohidratos, diabetes no controlada):

- **Acetoacetato**
- **β -hidroxibutirato**
- **Acetona** (se exhala y da aliento afrutado)



¿Qué esperar en cada muestra?

Muestra	Condición	Resultado esperado
Suero	Ayuno prolongado (>8 h)	Púrpura intenso (más cuerpos cetónicos)
Suero	Alimentación reciente	Color tenue o ausente

Muestra	Condición	Resultado esperado
Orina	Ayuno prolongado	Púrpura (excreción de cetonas)
Orina	Alimentación reciente	Color tenue o ausente
Tubo 1	Agua (control negativo)	Sin color

La reacción (nitroprusiato / reacción de Legal):

El **nitroprusiato de sodio** reacciona con los cuerpos cetónicos (especialmente acetoacetato) en medio alcalino (hidróxido de amonio), formando un **complejo púrpura**:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

Acetoacetato + nitroprusiato de sodio + NH_3 (alcalino) → complejo púrpura

◆ NOTA ACADÉMICA

La intensidad del color es **semicuantitativa**: más púrpura = más cuerpos cetónicos. Esta práctica es de **detección cualitativa** (positivo/negativo y comparación de intensidades).

Obtención de muestras (importante)

Voluntarios: pueden ser **distintos** para cada condición, siempre que cumplan los requisitos:

- **Ayuno prolongado:** ayuno voluntario de **más de 8 horas** el día de la práctica.
- **Alimentación reciente:** consumir azúcares unos minutos antes de la toma de muestra.

Opciones para obtener las muestras (evitar carencias):

Muestra	Cómo obtenerla
Orina	Los propios voluntarios pueden llevarla en un frasco estéril, o pedir un frasco estéril en la isla con los técnicos y tomarla ahí mismo.
Sangre (suero)	Con el kit para extraer sangre del laboratorio (personal capacitado). Alternativa: si no hay kit, pedir suero de sangre a los técnicos del piso 1 (edificio de microbiología) — suficiente para la práctica.

◆ RECUADRO DE SEGURIDAD / PRECAUCIÓN

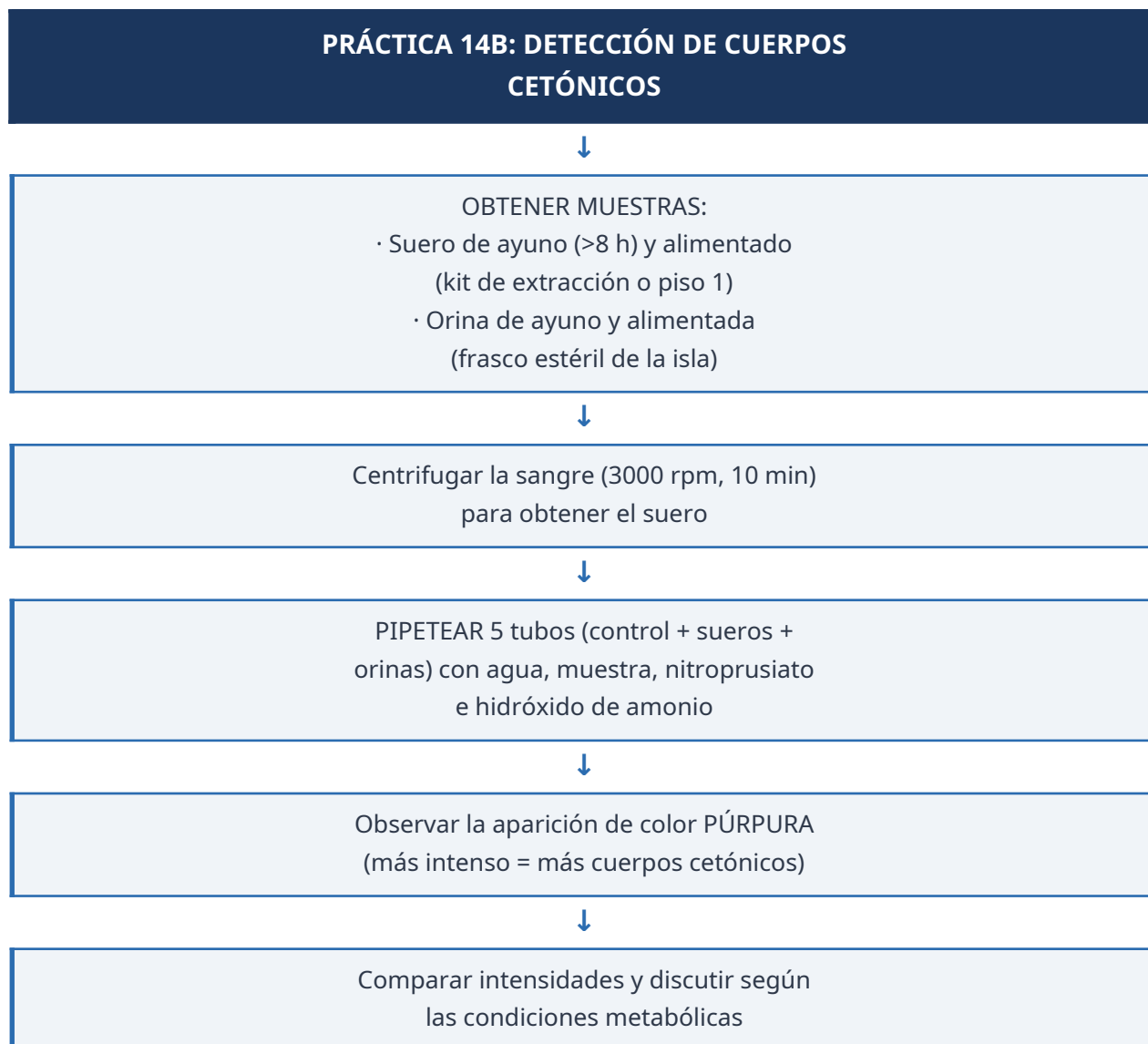
Bioseguridad: la toma de sangre debe hacerla personal capacitado, con guantes, y los residuos biológicos (tubos, agujas, muestras) se desechan en el **contenedor RPBI** correspondiente. La orina se maneja como muestra biológica.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
6	Tubos de ensayo	5 mL	Nitroprusiato de sodio
1	Gradilla	5 mL	Hidróxido de amonio
1	Vaso de precipitado de 200 mL	1 tubo	Muestra de sangre de persona en ayuno prolongado (voluntario que ayune el día de la práctica)
1	Piseta con agua destilada	1 tubo	Muestra de sangre de persona con reciente alimentación (voluntario que consuma azúcares unos minutos antes de la toma)
4	Pipetas de 10 mL	20 mL	Muestra de orina de persona en ayuno prolongado
2	Pipetas de 1 mL	20 mL	Muestra de orina de persona con reciente alimentación
2	Propipetas de 1 mL		
3	Propipetas de 10 mL		
1	Kit para extraer sangre con tubo amarillo		
1	Centrífuga clínica		
2	Recipientes para orina		

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO



Procedimiento

Actividad 1. Detección de cuerpos cetónicos en muestras biológicas

1. Obtener un tubo de sangre de un voluntario con **ayuno voluntario de más de 8 horas** y otro de un voluntario con **ingesta reciente de alimento** (ver "Obtención de muestras" para alternativas).
2. Centrifugar el tubo de sangre para obtener el **suero** a 3000 rpm por 10 minutos.

3. Pipetear en tubos previamente rotulados los siguientes componentes (la orina no requiere centrifugación; se usa directamente):

Componente	Tubo 1 (control negativo)	Tubo 2 (suero ayuno)	Tubo 3 (suero alimentado)	Tubo 4 (orina ayuno)	Tubo 5 (orina alimentada)
Agua destilada	5 mL	3 mL	3 mL	—	—
Muestra	—	2 mL suero	2 mL suero	5 mL orina	5 mL orina
Nitroprusiato de sodio	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Hidróxido de amonio	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

4. La aparición de un **color púrpura** es positiva e indicativa de la presencia de cuerpos cetónicos. Comparar las intensidades entre tubos.

Actividad 2. Análisis de los resultados

1. Comparar los resultados entre las diferentes muestras (ayuno vs. alimentado; suero vs. orina) y discutir de acuerdo con lo esperado en las diferentes condiciones metabólicas.
2. Interpretar: el tubo de ayuno debe mostrar púrpura más intenso que el de alimentación reciente, tanto en suero como en orina.

Práctica 15. Detección enzimática de urea

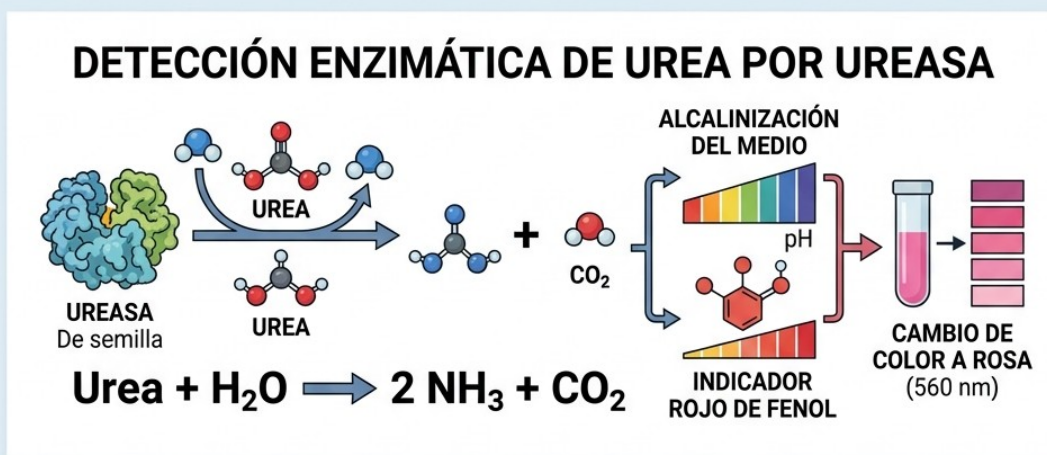


Figura 15.1. Mecanismo de reacción de hidrólisis de urea por ureasa y viraje del indicador a 560 nm.

Propósitos

- Aprender a utilizar un método enzimático para la determinación de un metabolito en distintas muestras

Introducción

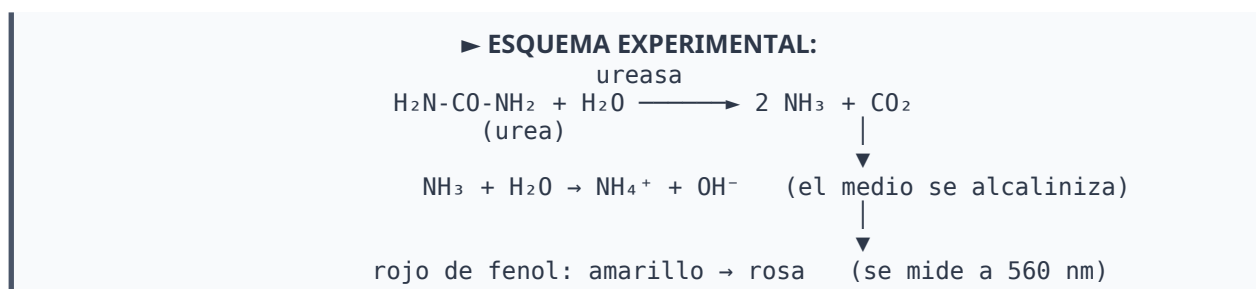
El catabolismo de aminoácidos produce nitrógeno de desecho. La principal forma de desecho de nitrógeno orgánico en los animales es la **urea**. El exceso de nitrógeno es movilizado al hígado desde todos los tejidos en forma de glutamina y alanina, donde estos son interconvertidos hasta producir urea. En seguida, la urea es **movilizada** por el torrente

sanguíneo hasta el sistema urinario. La concentración de urea en sangre es relativamente alta y aún más alta en orina. En esta práctica se aprende a detectar la urea en muestras de sangre y orina empleando un método enzimático sencillo y económico.

Qué se estudia (didáctica)

La reacción de la ureasa y la señal medida:

La **ureasa** (extraída de semilla de sandía) hidroliza la urea y produce amoníaco, que alcaliniza el medio. El **rojo de fenol** es el indicador de pH:



- Más urea en la muestra → más OH^- → más rápido cambia el color → mayor velocidad inicial.
- La **velocidad inicial** (pendiente de la parte lineal del curso temporal) es proporcional a la concentración de urea.

La curva estándar: se mide la velocidad inicial de concentraciones conocidas de urea → se grafica velocidad vs. [urea] → esa recta sirve para interpolar las muestras.

Valores de referencia (para orientar):

Muestra	Urea típica	Nota
Suero sanguíneo	~15-40 mg/dL	Menor concentración
Orina	Mucho más alta	Concentrada, requiere más dilución

◆ NOTA ACADÉMICA

Por eso la orina suele necesitar diluciones mayores (1:100) para caer dentro de la recta estándar.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	100 mL	Urea 0.1 M
2 g	Semillas de sandía molidas (área bioquímica)	100 mL	Medio de reacción: rojo de fenol 0.03 mM, pH 6.8
15	Tubos de ensayo	20 mL	PBS 1x
4	Pipetas de 10 mL		
4	Pipetas de 1 mL		
1	Caja de celdas para espectro		
1	Vaso de precipitado de 50 mL		
2	Tubos para centrífuga de 15 mL		
1	Material para toma de muestra sanguínea		
1	Vaso para muestra de orina		
1	Juego de micropipetas y puntas		
1	Espectrofotómetro		

Por alumno / para todo el grupo

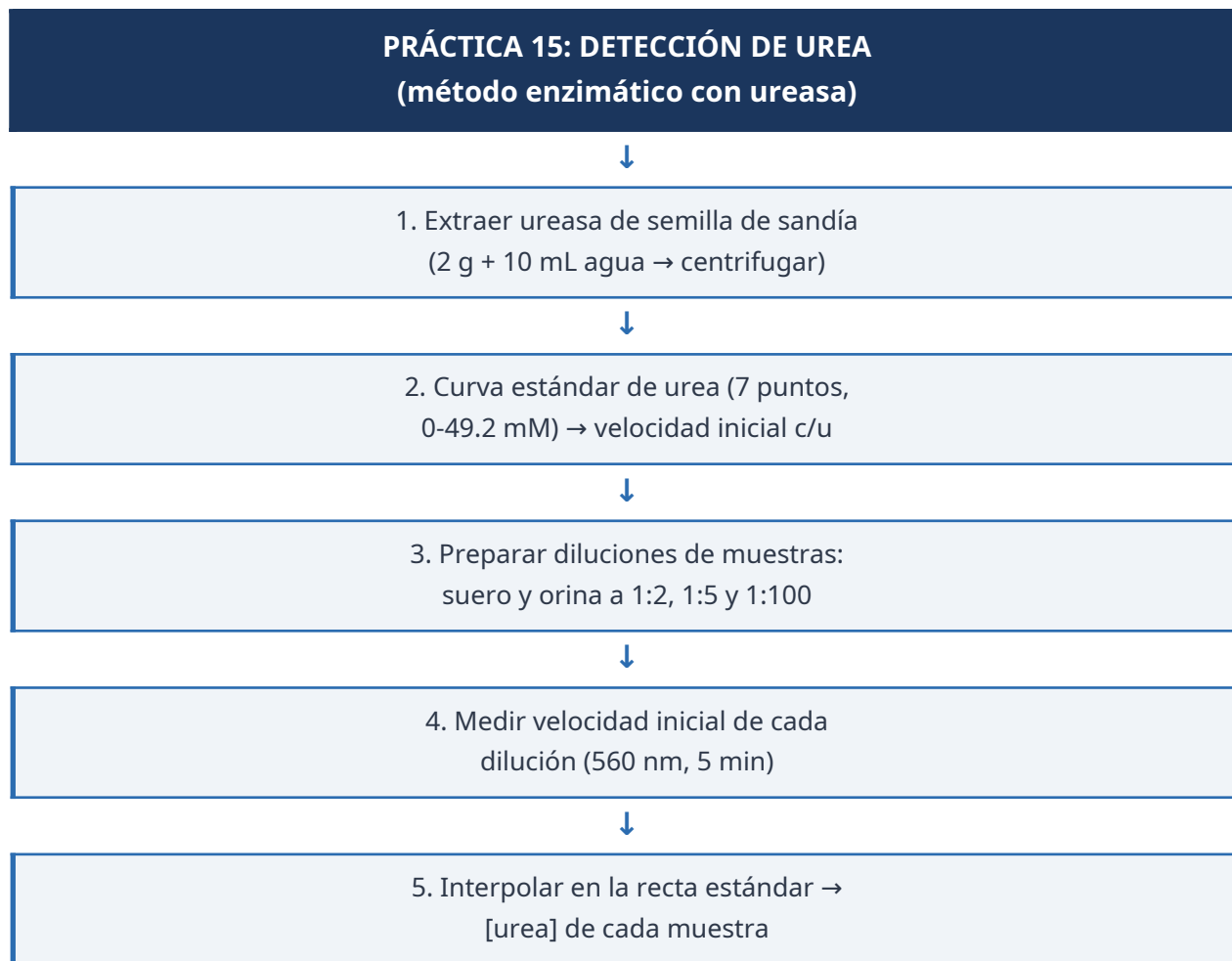
#	Material
1	Bolsa de hielo pequeña
1	Muestra de sangre periférica (obtenida en el laboratorio de clase)
1	Muestra de orina (obtenida en los sanitarios del edificio H1)

◆ NOTA ACADÉMICA

La obtención de las muestras sigue las mismas opciones de la Práctica 14B (voluntarios, kit de extracción, o suero solicitado a los técnicos).

Diagrama de flujo profesional

► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO



Procedimiento

Actividad 1. Extracción de la ureasa de semilla

1. Pesar **2 g de semilla molida** y resuspender en **10 mL de agua destilada**.
2. Centrifugar la muestra a 3000 rpm por un periodo de **10 minutos**.
3. Recuperar el sobrenadante y reservar en hielo hasta su uso.

Actividad 2. Preparación de una curva estándar de urea

1. En una serie de celdas de plástico, pipetear los siguientes volúmenes. La columna final muestra la **concentración de urea resultante** (solución madre 0.1 M = 100 mM; volumen total 2.95 mL):

Celda	Urea 0.1 M (mL)	Agua (mL)	Medio de reacción (mL)	[Urea] final (mM)
1	0	1.45	1.5	0
2	0.1	1.35	1.5	3.4
3	0.25	1.20	1.5	8.5
4	0.5	0.95	1.5	16.9
5	0.75	0.70	1.5	25.4
6	1.0	0.45	1.5	33.9
7	1.45	0	1.5	49.2

2. La reacción se inicia con la adición de **50 μ L de extracto de enzima**, que debe pipetearse una vez que la celda esté colocada en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.

3. Agregar la enzima y medir la absorbancia a 560 nm cada 10 segundos durante 2 minutos (lecturas a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 s).

4. Graficar el cambio de absorbancia respecto al tiempo de reacción y calcular la **velocidad inicial** (pendiente de la parte lineal de cada curso temporal).

5. Regraficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de urea y emplear la parte lineal como **curva estándar**.

Actividad 3. Determinación de la concentración de urea en muestras biológicas

1. Tomar, con la ayuda del maestro o el técnico académico del área, una muestra de **sangre periférica humana** (ver opciones de obtención en la P14B).

2. Obtener el **suero** de la muestra de sangre centrifugando a 3000 rpm por 10 minutos.

3. Tomar una muestra de **2 a 5 mL de orina** (la cantidad que se diluirá).

4. Realizar a cada muestra (suero y orina) una serie de diluciones en amortiguador de fosfatos: **1:2, 1:5 y 1:100**.

5. Pipetear en celdas de espectrofotómetro **1.45 mL de cada dilución** de cada muestra (seis en total) y medir de una por una en el espectrofotómetro.

6. Iniciar la reacción ureasa agregando **50 µL de extracto de enzima** y seguir su curso temporal por 5 minutos, monitoreando el cambio de absorbancia a 560 nm cada 30 s.
7. Calcular la **velocidad inicial** de la reacción de cada muestra y dilución.
8. **Interpolar** las velocidades en la recta patrón y determinar su contenido de urea.
9. **Descartar las diluciones que queden fuera de la recta** y discutir los resultados.

Referencias

1. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman and Company.
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2019). *Biochemistry* (9th ed.). W. H. Freeman and Company.
3. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level* (5th ed.). John Wiley & Sons.
4. Ferrier, D. R. (2017). *Lippincott illustrated reviews: Biochemistry* (7th ed.). Wolters Kluwer.
5. Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Weil, P. A. (2018). *Harper's illustrated biochemistry* (31st ed.). McGraw-Hill Education.
6. Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular biology of the cell* (7th ed.). W. W. Norton & Company.
7. Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Angewandte Chemie International Edition*, 36(21), 2240–2256. <https://doi.org/10.1002/anie.199722401>
8. Knowles, J. R. (1980). Enzyme catalysis: Not as simple as it looks. *Nature*, 289(5793), 26–27. <https://doi.org/10.1038/289026a0>
9. Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2005). The discovery of glycolysis by Gustav Embden and Otto Meyerhof. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), e3–e4.
10. Montejo Dávila, C. (2026). *Interactoma Modular: Plataforma digital e itinerarios didácticos de bioenergética y metabolismo*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. <https://interactomamodular.com/>
11. Díaz Sánchez, Á. G. (2025). *Manual de prácticas del Laboratorio de Bioquímica Metabólica* [Documento institucional]. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas.
12. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
13. Boehringer Mannheim. (s. f.). *Reactivo de colesterol: instrucciones de uso* [Kit comercial].
14. Montejo Dávila, C. (2026). *Guías de biomoléculas* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/biomoleculas-introduccion.pdf>

- 15.** Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Reducción metabólica* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/practica3-reduccion-metabolica.pdf>
- 16.** Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Glucólisis y fermentación* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/practica8-glucolisis-fermentacion.pdf>
- 17.** Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Monitoreo de la glucólisis* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/monitoreo-glucolisis.pdf>
- 18.** Montejo Dávila, C. (2026). *Krebs cycle lab* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/krebs-cycle-lab.pdf>
- 19.** Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Fotosíntesis con algas (cultivo)* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/fotosintesis-algas-cultivo.html>
- 20.** Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Extracción de lípidos* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/practica13-extraccion-lipidos.pdf>