
Manual de prácticas del Laboratorio de Bioquímica Metabólica

**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
Instituto de Ciencias Biomédicas
Departamento de Ciencias Químico-Biológicas
Programa de Licenciatura en Biotecnología**

Por Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

Tabla de contenido

<i>Cronograma</i>	3
<i>Introducción</i>	4
<i>Práctica 1. Introducción al laboratorio de Bioquímica metabólica</i>	5
<i>Práctica 3. Reacciones redox en las biomoléculas</i>	11
<i>Práctica 4. Determinación de la actividad de las enzimas y su papel en el metabolismo</i>	14
<i>Práctica 5. Degradación de almidón por la α-amilasa de distintas fuentes</i>	18
<i>Práctica 6. Transporte celular y preferencia de carbohidratos</i>	22
<i>Práctica 7. Cinética del transporte celular de carbohidratos</i>	25
<i>Práctica 8. Glucólisis</i>	27
<i>Práctica 9. Efecto de moduladores sobre la velocidad de una ruta metabólica</i>	32
<i>Práctica 10. Ciclo de Krebs</i>	34
<i>Práctica 11. Respiración aerobia</i>	36
<i>Práctica 12. Fotosíntesis</i>	38
<i>Práctica 13. Extracción y solubilidad de los lípidos</i>	40
<i>Práctica 14. Metabolismo de los lípidos</i>	43
<i>Práctica 14. Detección de cuerpos cetónicos</i>	46
<i>Práctica 15. Detección enzimática de urea en muestras biológicas</i>	48
<i>Práctica alternativa: Identificación química de carbohidratos (práctica alternativa en caso de que una de las prácticas no se pueda realizar)</i>	50

Cronograma

Semana	Práctica y nombre	Fecha de la práctica	Fecha de discusión	Página de lista de requerimientos
1	<i>Práctica 1. Introducción al laboratorio de Bioquímica metabólica</i>			5
2	<i>Práctica 2. Reacciones redox en las biomoléculas</i>			11
3	<i>Práctica3. Reacciones catalizadas</i>			14
4	<i>Práctica 4. Determinación de la actividad de las enzimas y su papel en el metabolismo</i>			18
5	<i>Práctica 5. Degradación de almidón por la α-amilasa de distintas fuentes</i>			22
6	<i>Práctica 6. Transporte celular y preferencia de carbohidratos</i>			25
7	<i>Práctica 7. Cinética del transporte celular de carbohidratos</i>			27
8	<i>Práctica 8. Glucólisis</i>			32
9	<i>Práctica 9. Efecto de modulares sobre la velocidad de una ruta metabólica</i>			34
10	<i>Práctica 10 Ciclo de Krebs</i>			36
11	<i>Práctica 11. Respiración aerobia</i>			38
12	<i>Práctica 12. Fotosíntesis</i>			40
13	<i>Práctica 13. Extracción y solubilidad de los lípidos</i>			43
14	<i>Práctica 14. Metabolismo de los lípidos</i>			46
15	<i>Práctica 15. Detección y metabolismo de aminoácidos</i>			48
16	<i>Práctica alternativa. Detección de carbohidratos</i>			50

Introducción

El laboratorio de bioquímica metabólica está enfocado en realizar prácticas y actividades experimentales que faciliten al alumno el aprendizaje de la estructura, dinámica y función del metabolismo. Las prácticas seleccionadas, aunque son muy sencillas, son de nivel fundamental y básico, la parte aplicada los alumnos la aprenderán en otros cursos. El orden de las prácticas está ligada al orden de los temas vistos en la parte teórica del curso. los fundamentos teóricos de las prácticas se revisan en la parte de teoría y los fundamentos esenciales técnicos están explicados de manera muy breve en las prácticas. Todas las prácticas están diseñadas para realizarse en dos sesiones, una para hacer la práctica y otra para analizar y discutir los resultados.

<u>Práctica 1. Introducción al laboratorio de Bioquímica metabólica</u>	
Propósitos	• Repasar los aspectos de Seguridad y reglamento del laboratorio. • Conocer la dinámica de la realización de las prácticas y su discusión. • Conocer los tipos de experimentos, representación de resultados y técnicas de un 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 sólo es un espacio para desarrollar conceptos de manera práctica y desarrollar destrezas técnicas, es también un espacio para reforzar ciertas competencias de seguridad e higiene. También se fomentan buenas prácticas de laboratorio, no sólo de forma práctica, sino en la manera de analizar, presentar y discutir los resultados, en donde se requieren y se fomentan ciertas habilidades matemáticas y analíticas.

Requerimientos

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

Materiales	
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. https://www.dropbox.com/s/qy7vdkdev9ygzi8/toaz.info-reglamento-de-seguridad-e-higiene-para-laboratorio-del-instituto-de-ciencias-bio-pr_74643eb94dd296d4c2564409a6cb1780.pdf?dl=0

Actividad 2: Dinámica de las prácticas y mecanismos de evaluación

Dar a conocer a los alumnos la forma de llevar a cabo las prácticas y coordinarse para la elaboración de estas en forma de trabajo por equipos de cuatro integrantes.
Dar a conocer los mecanismos de evaluación y entrega de reportes de laboratorio.

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

Exponer la dinámica general empleada en la aplicación del método científico en las prácticas y experimentos realizados en el curso de bioquímica metabólica.

Mostrar los equipos empleados en el laboratorio (Centrifugas, balanzas, cristalería, espectrofotómetros, entre otros), cómo se usan, para qué sirven y que tipos de datos proporcionan.

Enseñar a los alumnos a realizar registros de los pasos, procedimientos, resultados y observaciones durante la realización de las prácticas.

Enseñar a los alumnos los tipos de tendencias de los datos que se suelen observar en los experimentos de bioquímica (líneas rectas, hipérbolas, exponenciales, entre otras), cómo se analizan y que información paramétrica proporcionan; así como enseñar cómo se pueden incorporar a las bitácoras y reportes de laboratorio empleando paquetes de cómputo adecuados.

Enseñar a los alumnos la forma internacional y estándar de reportar resultados en revistas de investigación del área bioquímica. Por ejemplo, emplear la guía de autores de la revista *Biochemistry 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 determinada 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. En el presente se realizará una extracción acuosa en donde las células se lisan por calor. Esta lisis produce la liberación del contenido celular y posteriormente se separa por peso usando la técnica de centrifugación. Las biomoléculas solubles se obtienen en la fracción del sobrenadante resultante. Aquí se detectan los carbohidratos reductores y los aminoácidos y aminas libres. Este procedimiento se puede emplear para valorar otras familias de biomoléculas o una específica.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Espátula		
1	Balanza analítica	100 mL	Amortiguador de acetato de amonio 5 mM pH 8.0
1	Vortex (por todo el grupo)	1	Piseta con agua destilada
1	Baño maría a 80 °C (para todo el grupo)	1	Reactivo de Feling A en gotero
1	Centrifuga para tubos de 15 mL	1	Reactivo de Feling B en gotero
1	Cubo con hielo	1	Reactivo de ninhidrina en gotero
2	Gradillas para tubos	1	Glucosa al 1 % en gotero
16	Tubos de ensaye de 10 mL	1	L-lisina al 1 % en gotero
3	vaso de precipitados de 50 mL		
1	Micropipeta de 1000 uL	Alumnos	
1	Pipeta de 2 mL y pro-pipeta	1	1 sobre de tradipán (para todo el semestre)
			
3	Pipetas pasteur	1	Bolsa de hielo para todo el grupo
1	Marcador indeleble de punta fina	100 g	De carne molida fresca para todo el grupo
1	Platina de calentamiento	100 g	de semillas de calabaza de preferencia sin tostar
1	Pinzas para tubo de ensaye		

1	10 gr de carne molida de res fresca		
1	10 gr de semilla de calabaza sin tostar		

Procedimientos

Actividad 1. Extracción de biomoléculas a partir de una muestra biológica de matrices biológicas

1. Pesar 5 g de levadura de pan marca Tradipan® y mezclar en un vaso de precipitado conteniendo 20 mL de amortiguador de acetato de amonio 5 mM (pH 8.0) precalentado a 80 °C.
2. Dividir el contenido de la mezcla en dos tubos de ensaye de 15 mL, de plástico, asegurándose de que ambos tubos 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 (entre 3500-6,000 rpm) por 10 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante, decantando el contenido de estos en tubos limpios, secos y previamente rotulados como extracto de biomoléculas de levadura.
6. Colocar los tubos en hielo hasta su uso en las siguientes actividades.

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

1. Pesar 5 g de carne molida de res fresca y mezclar en un vaso de precipitado conteniendo 20 mL de amortiguador de acetato de amonio 5 mM (pH 8.0) precalentado a 80 °C.
2. Dividir el contenido de la mezcla en dos tubos de ensaye de 15 mL, de plástico, asegurándose de que ambos tubos 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 (3500-6,000 rpm) por 10 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante, decantando el contenido de estos en tubos limpios, secos y previamente rotulados como extracto de biomoléculas de carne.
6. Colocar los tubos en hielo hasta su uso en las siguientes actividades.

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

1. Pesar 5 g de la semilla sin cascara y agregar en un mortero conteniendo 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 de la mezcla.
3. Dividir el contenido de la mezcla en dos tubos de ensaye de 15 mL, de plástico, asegurándose de que ambos tubos 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 (3500-6,000 rpm) por 30 minutos. En el tubo se deben apreciar tres fases: un precipitado que contiene los componentes celulares insolubles y de alto peso; un sobrenadante, que contiene los componentes solubles incluidas las biomoléculas y biomacromoléculas solubles; un fluoculante, que contiene la fracción lipídica de la semilla.

- Recuperar el sobrenadante decantando (o con una pipeta pasteur) el contenido de estos en tubos limpios, secos y previamente rotulados como extracto de biomoléculas de semillas.
- Colocar los tubos en hielo hasta su uso en las siguientes actividades.

Actividad 4: detección de carbohidratos reductores

- Acomodar cinco tubos de ensaye en una gradilla y pipetear los siguientes componentes:

Tubo	Rotulo	Amortiguador de acetatos (mL)	Estándar de glucosa 1 % (mL)	extracto (mL)	Reactivo Fehling A	Reactivo 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		

- Observar cambios físicos en las muestras.
- Colocar los tubos a baño maría en ebullición por cinco minutos y trascurrido el tiempo con la ayuda de unas pinzas para tubo colocarlos nuevamente en la gradilla perfectamente ordenados como se indica en la tabla.
- Permitir que los tubos se enfríen por cinco minutos a temperatura ambiente y realizar observaciones físicas sobre la mezcla, color, turbidez, formación de precipitados. Un cambio de color de azul a rojo es indicativo de presencia de azúcares reductores.
- Documentar las diferencias, resaltando las intensidades de los colores con respecto a los controles negativo y positivo.

Actividad 5: Detección de aminoácidos libres

- Acomodar otros cinco tubos de ensaye en una gradilla y pipetear los siguientes componentes:

Tubo	Rotulo	Amortiguador de acetatos (mL)	Estándar de lisina 1 % (mL)	extracto (mL)	Reactivo de ninhidrina
1	Control negativo	1	-	-	5 gotas
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 a baño maría en ebullición por cinco minutos y transcurrido el tiempo con la ayuda de unas pinzas para tubo colocarlos nuevamente en la gradilla perfectamente ordenados como se indica en la tabla.
3. Permitir que los tubos se enfíen por cinco minutos a temperatura ambiente y realizar observaciones físicas sobre la mezcla, color, turbidez, formación de precipitados. Un cambio de color de amarillo a morado es indicativo de presencia de aminoácidos libres.
4. Documentar las diferencias, resaltando las intensidades de los colores con respecto a los controles negativo y positivo.

Actividad 4: Discusión

1. Discutir las diferencias entre los resultados de las distintas matrices biológicas.
2. Inferir si las diferencias se pueden explicar por la abundancia de biomoléculas reportadas en la literatura para las matrices analizadas.
3. Discutir cómo puede ser utilizado 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.

<u>Práctica 3. Reacciones redox en las biomoléculas</u>	
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 sólo 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 u 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 por medio de una reacción entre éstas y un aceptor general llamado azul de metileno. Este indicador pierde el color al recibir electrones y lo recupera cuando se re-oxida. El tiempo del cambio y recuperación de color esta relacionado directamente con el potencial redox del agente reductor.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
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 microL	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 ensaye	5 mL	solución de tirosina al 1 % (p/v)
1	gradilla para tubos	10 mL	solución de azul de metileno en etanol 0.005 gr/50 mL de metanol
1	Vaso de precpitado	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
		Alumnos	

		100 g	De carne molida fresca para todo el grupo
		10 mL	de aceite de olivo
		1	Huevo de gallina en caso de que no se encuentre disponible el estándar de colesterol

Procedimiento

Actividad 1. oxidación de carbohidratos

1. Agregar 0.1 g de hidróxido de potasio en un tubo de ensaye. Tener precaución con el hidróxido ya que 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 0.2 microL de solución de azul de metileno, agitar y observar los cambios en el color. El color no debe ser demasiado intenso de lo contrario se tardará más en observar los cambios.
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 seg 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, sólo que ahora usar en uno sacarosa, en otra 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	microL de azul de metileno	1 mL de estándar
1	2.5	0.2	histidina
2	2.5	0.2	cisteína
3	2.5	0.2	tirosina
4	2.5	0.2	aceite de olivo
5	2.5	0.2	colesterol

2. Una vez que se pipeteen 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 gr de tejido muscular (carne molida de res cruda) a cuatro tubos de ensaye.
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 otro 1 mL de agua.
4. Incubar la reacción por 10 minutos y agregar después 200 microL 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 de color ya que la sangre del tejido produce un color de fondo, pero si se espera un cambio en la intensidad del color.
6. Inferir porque en estos tubos no es necesario agregar el hidróxido de potasio.

Actividad 4: Discusión

1. Discutir las diferencias entre los resultados de las distintas biomoléculas.
2. Inferir porque en la muestra de tejido biológico se observa un cambio sin necesidad de agregar hidróxido de potasio.
3. Discutir cómo puede ser utilizado este procedimiento de forma rutinaria en un laboratorio de biotecnología durante la producción de algún biológico de interés comercial.

<u>Práctica 4. Determinación de la actividad de las enzimas y su papel en el metabolismo</u>	
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 relacionada con la trayectoria molecular/atómica, que en última instancia influye con la rapidez de la reacción. Prácticamente todas las reacciones biológicas son inaccesibles cinéticamente de manera intrínseca. Los catalizadores biológicos o enzimas, permiten que estas reacciones sean accesibles en las escalas de tiempo biológicas y permiten 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 acelerado por la enzima ureasa de semilla de sandia. 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

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	100 mL	urea 0.2 M (recién preparada, hacer una prueba mezclando la urea con el medio de reacción, debe de resultar un color amarillo, si es rosa significa que la urea está hidrolizada y no funcionará)
2	gr de semillas de sandia molida (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	5 tubos de ensayo		
4	4 pipetas de 10 mL		
4	4 pipetas de 1 mL		
1	Caja de celdas para espectro de 1.5 mL y de 3 mL		

1	1 vaso de pp de 50 mL	Alumnos	
2	2 tubos para centrifuga de 15 mL	1	Bolsa de hielo
1	Balanza granataria	5 g	De semillas de sandia en caso de que no estén disponibles en el laboratorio
1	vortex	1	Hielera pequeña de unicel
1	centrifuga clinica	1	Etiquetas de rotulación o masking tape (alumnos)
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 microL) y puntas		
1	Baño maría a 70 o 80 °C. se puede usar otra temperatura, sólo que esta debe ser para obtener agua caliente		
2	Propipetas verdes		

Actividad 1: Extracción de la ureasa de semilla de sandia

1. Prender los espectrofotómetros y verificar que el baño maria esté listo para usar en la actividad 4.
2. Pesar 2.0 gr de semilla de sandia seca y molida, colocar en un vaso de precipitado pequeño y re-suspender con 13 mL de agua destilada.
3. Dividir el homogenizado en dos tubos de plástico de 15 mL.
4. Centrifugar la muestra a 3500-6,000 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, este debe agregarse una vez que la celda está en el espectrofotómetro.

Condición	Urea 0.2 M (mL)	Agua destilada (mL)	MEDIO DE REACCIÓN (mL)	Iniciador de la reacción (no agregar hasta que se vaya a medir)
Sin enzima	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

2. La reacción se inicia con la adición de 100 microL de extracto de enzima o agua y ésta debe pipetear una vez que este colocado la celda 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) y medir la absorbancia a 560 nm cada

30 segundos por 5 minutos. Se recomienda previamente construir una tabla en la bitácora con los tiempos de reacción en una columna y dejar el espacio en blanco para que se anoten las absorbancias correspondientes.

4. Graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción. Esta se calcula con la pendiente de la parte lineal e inicial de la curva obtenida. Adicionalmente se puede usar: $m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$.
5. Re-graficar las velocidades obtenidas en condiciones y analizar las diferencias. Se puede construir 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 (microL)	Agua destilada (mL)	MEDIO DE REACCIÓN mL
1	0.5	5	0.895	1.0
2	4	40	0.860	1.0
3	8	80	0.820	1.0
4	20	200	0.700	1.0

2. La reacción se inicia con la adición de 100 microL de extracto de enzima y ésta debe pipetear una vez que este colocada la celda en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
3. Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos por 2 minutos.
4. Graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción.
5. Re-graficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis grafico correspondiente para calcular los parámetros cinéticos de la reacción.

Actividad 4: efecto de integridad de la enzima sobre la velocidad de reacción

1. Pipetear 1 mL de extracto de enzima en un microtubo.
2. Incubar a 80 °C por 5 minutos.
3. 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 (no agregar hasta que se vaya a medir)
Con enzima	0.100	0.800	1.0	0.1 mL de extracto de la enzima calentada

1. La reacción se inicia con la adición de 100 microL de extracto de enzima calentado y ésta debe pipetear una vez que este colocada la celda en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
2. Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos por 2 minutos.

3. Graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción.
4. Re-graficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis grafico correspondiente para calcular los parámetros cinéticos de la reacción.
5. Después de dejar enfriar la enzima tratada volver a medir 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 porque 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 glicosil 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 glicosil hidrolasas. El aparato digestivo de animales expresa diversas isoformas, por ejemplo, la salival y la pancreática. Las plantas y semillas vegetales producen amilasa para facilitar el uso y 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 usando ensayos discontinuos.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
40	Tubos de ensaye de 10-15 mL	1	Piseta con agua
2	Gradillas para tubos	100 mL	Reactivo DNS
2	Vasos de pp de 250 mL	40 mL	HCl 2 M
2	Vasos de pp de 100 mL	50 mL	Reactivo de lugol
1	Mortero con pistilo	100 mL	PBS 1X y 4X
1	Balanza analítica	100 mL	de suspensión de almidón 2 %
1	centrifuga para microtubo		
1	Balanza granataria		
1	Probeta de 50 mL	Alumnos	
6	Tubos cónicos de 50 mL con rosca	1	Bolsa de hielo
1	Caja de celdas para espectro	20 g	Germinado de brócoli, soya o trigo
1	Espectrofotómetro	20 g	Hoja de espinaca fresca o acelgas
5 cm	Papel parfilm	20 g	Semillas de calabaza sin cascara, no pelar con la boca.
1	licuadora	10 mL	Saliva humana en el momento de la práctica, quien done la saliva no debe presentar síntomas de enfermedades respiratorias o presentar algún riesgo de infección biológica.

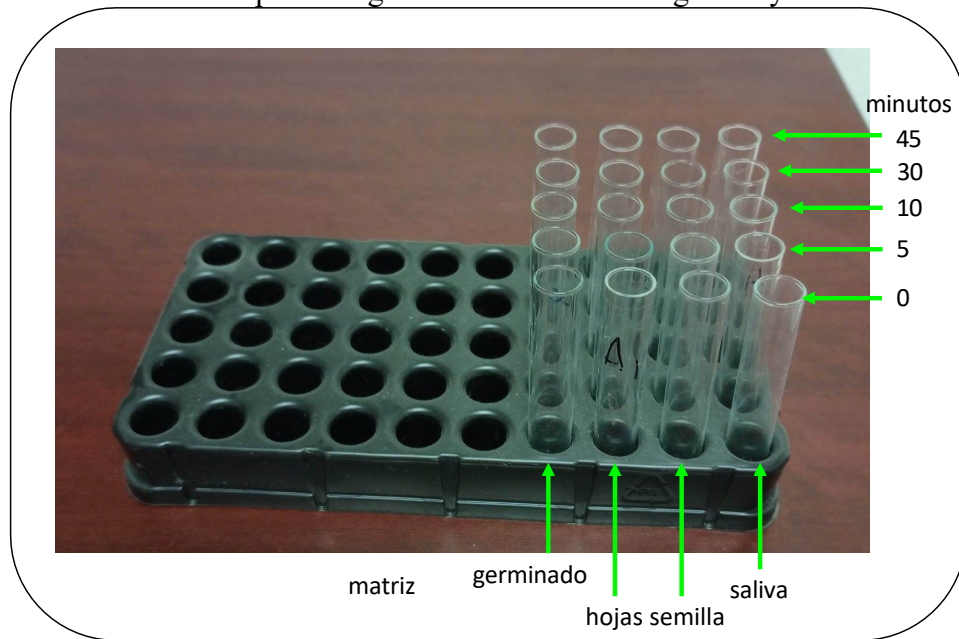
Actividad 1: Extracción de proteínas solubles

1. Prender el espectrofotómetro y alistar el baño maría a temperatura cercano a la ebullición del agua para tener todo listo en el momento de su uso
1. Extraer las proteínas solubles de las tres matrices vegetales a emplear: germinado de brócoli o de soya; hojas de espinaca; semillas de calabaza sin cascara y sin cocinar; así como 10 mL de saliva humana.
2. Pesar 10 gr de tejido vegetal y homogenizar en un mortero en presencia de 40 mL de amortiguador PBS. Para hacer más rápido el proceso se puede usar la licuadora y obtener los homogenizados para todos los equipos y repartírselos. Pasar el homogenizado por un colador de cocina para retirar material fibroso.
3. Decantar la parte líquida en dos tubos cónicos de 15 mL y centrifugar a 3000 rpm x 10 minutos.
4. Decantar el sobrenadante sobre tubos, perfectamente rotulados según la matriz que se trate y colocar en hielo.

Actividad 2: Ensayo de actividad por monitoreo de aparición de moléculas con extremos reductores

La actividad 2 y 3 se pueden hacer de manera paralela, sólo coordinarse y rotular perfectamente los tubos para no confundirse.

1. Colocar en una gradilla una matriz de tubos de ensayo de 4 columnas x 5 líneas rotulados como corresponda según los dos extractos vegetales y muestra de saliva.



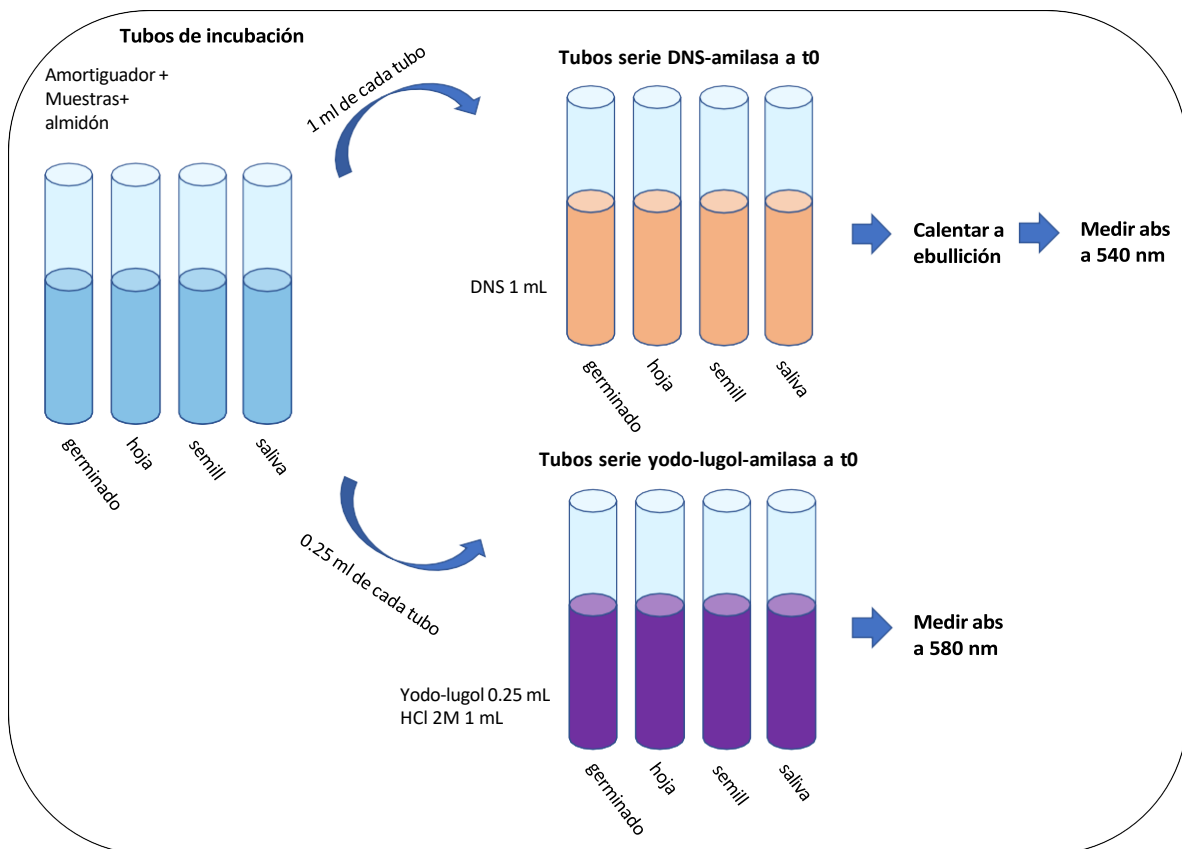
Toda una columna corresponde a una de las matrices, la segunda a otra distinta y así sucesivamente. También marcar los tubos según corresponda el tiempo de incubación según la línea de tubos que se trate: tiempo 0, 5, 10, 30 y 45 minutos. Estos tubos corresponden a la “serie de DNS-amilasa”.

2. Pipetear 1.0 mL del reactivo DNS a cada uno de los tubos.
3. En otra gradilla acomodar otros cinco tubos de ensayo (donde se llevará la reacción enzimática) de manera similar a la anterior, pero colocar 4 mL de los extractos de proteína o saliva, agregar 2.0 mL de PBS 4x y 2.0 mL de almidón al 2 %.

4. Incubar a temperatura de 37 °C por los tiempos indicados y transcurrido el periodo de incubación tomar 1.0 mL de muestra y transferir a los tubos correspondientes de la serie DNS para revelar su contenido de azúcares reductores. El contenido del reactivo DNS desnaturaliza la amilasa y detiene la reacción.
5. Calentar los tubos a ebullición por 5 minutos, después permitir la atemperación ambiental de los tubos y leer la absorbancia a 540 nm. Un incremento en la intensidad de color con respecto al tiempo de incubación es indicativo de actividad amilasa.
6. Repetir el procedimiento para los tiempos restantes, agitando los tubos de incubación de las reacciones cada minuto.

Actividad 3: Ensayo de actividad por monitoreo desaparición de almidón

1. Colocar en otra gradilla una matriz de tubos de ensaye de 4 x 5 rotulados como corresponda según los extractos vegetales y muestra de saliva. También marcar los tubos según corresponda el tiempo de incubación: tiempo 0, 5, 10, 30 y 45 minutos. Estos tubos corresponden a la “serie de yodo-lugol-amilasa”.
2. Pipetear 0.25 mL de reactivo de yodo-lugol a cada uno de los tubos más 1.5 mL de HCl 2 M.
3. En otros cinco tubos de ensaye colocar 4 mL de los extractos de proteína y saliva, agregar 2.0 ml de PBS 4x y 2.0 mL de almidón al 2 %. Se pueden usar los tubos de incubación de la actividad anterior pipeteando a los tiempos adecuados de manera paralela en los tubos “serie de DNS-amilasa” y la “serie de yodo-lugol-amilasa”.
4. Incubar a temperatura de 37 °C por los tiempos indicados y transcurrido el periodo de incubación tomar 0.25 mL de muestra y colocar en los tubos correspondientes de la serie yodo-lugol.
5. Leer la absorbancia a 580 nm.
6. Repetir el procedimiento para los tiempos restantes, agitando los tubos de las reacciones cada minuto.



Actividad 4: análisis de resultados

1. Graficar los valores de absorbancia frente a los tiempos de incubación de cada una de las muestras.
2. Calcular las pendientes que son las velocidades de hidrólisis y las actividades específicas.
3. Construir una gráfica de la actividad específica de cada una de las muestras corregidas por gramo de tejido.

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 éstos 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 que está relacionada con la velocidad de transporte de los distintos carbohidratos a concentración fija. Es decir el cociente de la velocidad de transporte entre la concentración del carbohidrato es un parámetro aparentemente relacionado con la especificidad.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
6	Pipetas de 10 mL	100 mL	PBS 1x
1	Varilla de vidrio	100 mL	De reactivo de Dinitrosalisilato (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 uL	25 mL	Solución de fructosa 15 mM
1	Caja de puntas azules	25 mL	Solución de arabinosa 15 mM
1	Centrifuga clínica	25 mL	Solución de maltosa 15 mM
1	Microcentrifuga para microtubos	25 mL	Solución de lactosa 15 mM
3	Gradillas para microtubo (unicel)		Sacarosa en sólido
1	Espectrofotómetro	Alumnos	
1	Caja de celdas de plástico para espectro	1	Bolsa de hielo
2	Tubos cónicos	1	Sobre de tradipan

Actividad 1: Preparación de las células de levadura

1. Pesar 3 gr de levadura tradipan y mezclar en un matraz con 30 mL de agua tibia a 30 °C y adicionar 1.0 gr 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. Re-suspender el paquete celular con la ayuda de una pipeta Pasteur o por inversión suave del tubo cinco veces o hasta que se mezclen las células completamente. Se puede emplear una pipeta Pasteur para facilitar el mezclado.
8. Repetir los pasos de lavado hasta completar un total de tres lavados. Los lavados son esenciales para eliminar el exceso de azúcares extracelulares, si éstos no se hacen adecuadamente la práctica no funcionará.
9. Finalmente, re-suspender el paquete celular en 5 mL de PBS y usar 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 los siguiente en 6 microtubos, perfectamente rotulados como tubos de incubación y según el azúcar que contiene:

Tubo	D-Azúcar y volumen	Volumen de 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	Agua 0.7 mL	0.20 mL

2. Agregar 0.5 mL de células lavadas y tapar los tubos. Una vez que se agregan las células empieza a contar el tiempo del periodo de incubación y en este experimento se tomaran 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 de forma suave, colocar de nuevo en la gradilla y abrir el tubo.
4. En seguida 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 tubos serán llamados tubos de cosecha celular al tiempo 0.
5. Colocar los tubos de cosecha en hielo para bloquear el transporte de los azúcares.
6. Rápidamente centrifugar los tubos de cosecha del T0 en microfuga a máxima velocidad por 60 segundos y recuperar el sobre nadante 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 ensaye previamente marcado como corresponda y conteniendo 1.90 mL de reactivo DNS.
8. Colocar los tubos del tiempo cero del paso anterior en baño maría a ebullición por 5 minutos, permitir que las muestras se enfíen y leer absorbancia a 540 nm. En caso

de que la intensidad de color sea muy alta, es necesario realizar las diluciones correspondientes para lograr medir la absorbancia.

9. Transcurridos 30 minutos en los tubos de incubación repetir los pasos del 4 al 8; usando ahora series de tubos nuevos previamente rotulados como T30 (tiempo 30 min).

Actividad 2. Análisis de los resultados

1. La disminución de intensidad de color tanto de la reacción de DNS es indicativo de transporte del azúcar del exterior al interior celular.
2. Con las absorbancias construir una gráfica de barras al t_0 y t 30 minutos, se deben considerar 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 Densidad Óptica por minuto, corregir este factor empleando el coeficiente de extinción molar del reactivo de DNS reducido.
4. Determinar en cuales de los tratamientos se observa el cambio más grande para inferir cuál es el azúcar que la levadura prefiere.

<u>Práctica 7. Cinética del transporte celular de carbohidratos</u>	
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. A partir del análisis del curso temporal obtenido se puede inferir el orden de reacción que el transporte sigue.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
4	Pipetas de 10 mL	100 mL	PBS 1x
4	Propipetas		
2	Vaso de PP de 50 mL		
1	Varilla de vidrio	100 mL	Dinitrosalisilato (DNS)
5	Pipetas Pasteur de plástico	1	Piseta con agua destilada
25	Microtubos de 1.5 mL	25 mL	Solución de glucosa 25 mM
1	Micropipeta de 100 a 1000 uL		
1	Caja de puntas azules		
1	Centrifuga clínica		
1	Microcentrifuga para microtubos	Alumnos	
3	Gradillas para microtubo (unicel)	1	Bolsa de hielo
1	Espectrofotómetro	1	Sobre de tradipan
1	Caja de celdas de plástico para espectro		
15	tubos de ensaye		

Actividad 1. Cinética del transporte de la glucosa (parte 2)

1. Preparar las levaduras y realizar tres lavados tal y como en la práctica anterior.
2. Pipetear los siguientes volúmenes en seis tubos de centrifuga de acuerdo con la siguiente tabla:

# TUBO	CONDICIÓN
A (control)	1.5 mL de agua destilada
B	1.5 mL de glucosa 10 mM
C	1.0 mL de glucosa 10 mM + 0.5 mL de agua
D	0.75 mL de glucosa 10 mM + 0.75 mL de agua
E	0.5 mL de glucosa 10 mM + 1.0 ml de agua

F	0.2 mL de glucosa 10 mM + 1.3 mL de agua
---	--

3. Pipetear 1 mL de levaduras lavadas en los seis tubos.
4. Tapar los tubos y agitar rápidamente, por inversión de forma suave.
5. En seguida tomar una muestra de cada tubo de 0.3 mL y colocarlos en otro microtubo previamente marcado con el nombre de cada muestra (A, B, C...) y T0. Estos microtubos de cosecha deben tener previamente 0.2 mL de agua destilada
6. Rápidamente centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo y toma una muestra de 0.5 mL, para después colocar en un tubo de ensaye previamente marcado como corresponda y conteniendo 2 mL de reactivo DNS.
8. Transcurridos 10 minutos repetir los pasos del 8 al 10 en otros tubos marcados correctamente como T10 (tiempo 10 min).
9. Transcurridos 20 minutos, repetir los pasos 8 al 10 en otros tubos marcados como T20 (tiempo 20 min) y finalmente repetir a los 40 y 60 minutos.
10. Al finalizar cada tiempo de incubación, colocar los tubos en baño maría a ebullición por 5 minutos, permitir que las muestras se enfríen y leer absorbancia a 540 nm.

Actividad 2. Análisis de los resultados

1. La disminución de intensidad de color tanto 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 y realizar el análisis de velocidad inicial.
 3. Proponer un mecanismo de transporte de acuerdo con lo observado.
-

Práctica 8. Glucólisis

Propósitos	• Observar el fenómeno de 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 a 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.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
4	pipetas de 10 mL	100 mL	de glucosa al 5 %
1	pipeta de 5 mL	100 mL	de sacarosa al 5 %
3	pipetas Pasteur	100 mL	de lactosa al 5 %
1	parrilla de calentamiento	50 mL	Al 10 % de dicromato de potasio en medio ácido (en ácido sulfúrico al 5 %) tener precaución ya que es oxidante y corrosiva.
		5 mL	Piruvato de sodio o ácido pirúvico 1 mM
2	vasos de pp de 250 mL	20 mL	Reactivo de Brady en gotero preparar el mismo día de uso: (A) Agregar 0.6 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4 DNFH) a un vaso precipitado y disolver con aproximadamente 3mL de H₂SO₄. (B) A un vaso de precipitado de 100 mL agregar 4mL de agua destilada y luego adicionar 14 mL de etanol puro. (C) Verter el contenido (A) en el vaso precipitado (B) mientras se agita en platina. Finalmente colocar en gotero
1	piseta con agua	1	gotero con reactivo de nitrato cérico-amoniaco 40 % en ácido nítrico concentrado. Precaución

			con este compuesto ya que es peligroso. Leer hoja de seguridad.
20	tubos de ensaye	1	Gotero con solución de rojo de fenol a 0.032 mM
2	gradillas para tubos de ensaye	1	gotero con reactivo de nitroblue-tetrazolium: preparar solución fresca en agua MQ o inyectable. Se prepara al 0.1 % y se disuelve agitando a temperatura de 30 °C por una hora. Se almacena a 4-8 °C hasta su uso. No almacenar por más de un mes, se sugiere preparar sólo la cantidad necesaria cada vez.
1	pinzas para tubo	250 mL	Amortiguador de cultivo. Preparar 250 mL de agua destilada desgasificada, hervida por 10 minutos para retirar el oxígeno disuelto. Inmediatamente después de hervir cerrar de manera hermética en un matraz con taparosca. Agregar 0.5 g de fosfato de potasio dibásico. El pH resultante debe oscilar entre 7 y 8. Este es suficiente para todo el grupo
1	Tiras reactivas para pH o papel tornasol azul y rosa		

Actividad 1: Preparación del sistema celular

1. Pesar 10 gr 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 roturados, de acuerdo con la siguiente tabla:

tubo #	sustrato			cultivo de levadura (mL)	condición anaerobiosis
	sacarosa 5 % (mL)	lactosa 5 % (mL)	glucosa 5 % (mL)		
1	2			5	tapado
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
11			2	5	tapado
12			2	5	tapado
13			2	5	tapado
14			2	5	tapado
15			2	5	Tapado*

*se puede tapar con papel parafilm o con un tapón de goma para tubo:



-
3. Incubar los tubos a temperatura ambiente por un periodo de 50 minutos.
 4. Trascurrido el tiempo realizar lo siguientes actividades:
- Actividad 2: Medición del contenido de gas producido**
1. Con la ayuda de una regla medir la altura de las burbujas formadas dentro de cada uno de los tubos, midiendo desde el borde de la mezcla.
 2. La formación de la espuma se encuentra relacionada con la liberación de CO₂, que a su vez está relacionada con el metabolismo del piruvato, el producto final de la glucólisis.
 3. En su casa, sacar el promedio y desviación estándar de cada tratamiento y comparar los resultados. Se puede realizar algún análisis de significancia estadística apropiado.

Enseguida se realizarán cinco pruebas diferentes a cada tratamiento con los tres azúcares. Los tubos se pueden reagrupar de la siguiente manera:

Tubo #	Prueba para realizar	Tubo #	Prueba para realizar
1	Actividad 3: Identificación de piruvato producido	4	Actividad 6: Acumulación de alcohol
6		9	
11		14	
2	Actividad 4: Oxidación de intermediarios	5	Actividad 7: acidificación del medio
7		10	
12		15	
3	Actividad 5: Detección de nucleótidos reducidos NAD(P)H		
8			
13			

Actividad 3: Identificación de ceto-acidos (piruvato) por 2,4 DNFH

1. Tomar los tubos de los diferentes tratamientos destinados para esta prueba (tubos 1, 6 y 11) y que contiene los 7 mL de la mezcla y colocar en una gradilla.
2. Agregar 3 mL del reactivo de Brady y dejar reposar por 5 minutos.
3. Adicionalmente en un tubo colocar 3 mL del reactivo de Brady, 1 mL de piruvato 1 mM y 6 mL de agua destilada para usar como control positivo.
4. La aparición de un precipitado marrón es indicativo de la presencia de piruvato y/o ceto-acidos.

Actividad 4: Oxidación de intermediarios

1. A los tubos correspondientes (2, 7 y 12), agregar 2 mL de solución saturada de dicromato de potasio
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.
4. Olfatear los tubos antes de agregar el dicromato y después de haberlos hervido (esperar a que este atemperado antes de oler).
5. Un olor a frutas es indicativo de la presencia de alcoholes y aldehídos.

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

1. Calentar a ebullición por 2 minutos los tubos que corresponden para esta prueba (3, 8 y 13)
2. colocar 10 gotas del reactivo nitroblue-tetrazolium.
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.

Actividad 6: Acumulación de alcohol

1. A los tubos que corresponden para esta prueba, 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.

Actividad 7: acidificación del medio

1. Medir el pH con tiras reactivas de pH a los tubos que corresponden para 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.

<u>Práctica 9. Efecto de modulares sobre la velocidad de una ruta metabólica</u>	
Propósitos	• Valorar el efecto de la presencia de moduladores de la glucolisis 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 glucolisis en levadura en presencia de catabólicos que alimentan otras rutas. Una alteración en la velocidad de la glucolisis en presencia de intermediarios de otras rutas es indicativo de una represión catabólica.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
8	Tubos de ensaye	100 mL	de glucosa al 20 mM
8	Celdas para espectro	100 mL	Succínico 20 mM a pH 7.0
		100 mL	Citrato de sodio 20 mM a pH 7.0
1	espectrofotómetro	100 mL	Lactosa 20 mM
2	Pipetas de 10 mL	100 mL	De glicerol o glicerina
2	Pipetas de 5 mL	100 mL	PBS diluido 1 en 100 con agua
1	Vaso de PP	50 mL	Solución de rojo de fenol 0.032 mM
		500 mL	Cultivo de levadura
		Alumnos	
		1 sobre de tradipan	

Actividad 1: preparación de las células

1. Pesar 2 gr de levadura tradipan y mezclar con 20 mL agua tibia a 37 °C.
2. Incubar a temperatura ambiente la mezcla por 1 minuto, tapando el matraz con parafilm.
3. Pipetear los siguientes componentes en un tubo de ensaye de acuerdo con la siguiente tabla:

tubo #	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)
1	0.5	0	0	0	0	1	2.4	0.1
2	0.5	0.5	0	0	0	1	1.9	0.1
3	0.5	0	1	0	0	1	1.4	0.1
4	0.5	0	0	1	0	1	1.4	0.1
5	0.5	0	0	0	1	1	1.4	0.1
6	0.5	0	1	0	1	1	0.4	0.1
7	0	0	1	1	1	1	0	0.1
8	0.5	0.5	1	0	0	1	1.0	0.1

-
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 adición del cultivo a cada celda para tener suficiente tiempo para 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 deberá realizar cerca del espectrofotómetro.
3. No es necesario estar realizando el autocero en cada determinación, sólo se debe realizar antes de las primeras lecturas y estar cambiando cada vez las celdas según corresponda la lectura.

Actividad 3: análisis de los resultados

1. Construir gráficos de dos variables de los cursos temporales de la glicolisis, por acidificación del medio.
2. Calcular la velocidad del estado estacionario de la glicolisis y valorar si hay cambios entre los tratamientos.

<u>Práctica 10. Ciclo de Krebs</u>	
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 la presencia de diversos nutrientes.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
20	tubos de ensaye	1	azul de metileno 0.05 % en metanol en un gotero
7	pipetas de 5 mL	20 mL	de solución de ácido succínico 50 mM (0.118 gr en 20 mL de agua)
1	propipeta	20 mL	de solución de glutamato 50 mM
3	pipeta Pasteur	20 mL	de solución de ácido cítrico 50 mM (0.118 gr en 20 mL de agua)
1	espátula pequeña	20 mL	de solución de ácido pirúvico 50 mM (0.1340 gr en 20 mL de agua)
100 g	Carne de res recién molida e hígado	20 mL	de solución de glucosa a 50 mM (0.18 gr en 20 mL de agua)
1	navaja de un filo para picar la carne de hígado.	50 mL	PBS fresco y filtrado
5-10	Frijoles germinados	Alumnos	
3	Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas	5	Semillas de frijol germinadas molidas o trituradas en mortero o licuadora. Para obtener el germinado de frijol, incubar cuatro días previo a la práctica cinco o diez frijoles frescos en un recipiente, sobre un algodón humedecido con agua.
1	cronometro	50 g	De carne molida fresca
		50 g	De hígado triturado fresco

Actividad 1: Preparación del extracto celular

1. A seis tubos previamente rotulados como se indica en la tabla, agregar 1 gr de tejido de carne recién molida.

Tubo	Tratamiento
1C	ac. succínico
2C	Glutamato de sodio
3C	ac cítrico
4C	ac pirúvico
5C	glucosa
6C	fosfato

La letra C corresponde a que los tubos tendrán el homogenizado de carne.

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 tejido hepático en cada tubo. Rotular de forma similar a lo anterior pero ahora usar la letra H después del numero.
4. Finalmente, preparar otra serie de tubos ahora usando 1 gr de germinado de frijol macerado en mortero y ahora usar la letra F en los rótulos.
5. Incubar todos los tubos por lo menos por cinco minutos en baño maría a 37 °C.

Actividad 2: Medición de la velocidad de producción de FADH_2

1. Agregar 1 mL del estándar proporcionado a los tubos según corresponda su tratamiento y agitar rápidamente.
2. Agregar 0.2 mL de azul de metileno y agitar vigorosamente el tubo. El color de la mezcla no debe ser demasiado intensa ya que tardará más en cambiar. Si es muy intensa diluir antes el reactivo de azul de metileno proporcionado 1 a 10.
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 gráficos 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.

<u>Práctica 11. Respiración aerobia</u>	
Propósitos	• Evaluar la rapidez con la que se consume el oxígeno en un sistema de.
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 medicina.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
3	tubos de ensaye grandes y anchos de fondo plano	1	Piseta con agua destilada
3	Tubos de ensaye	20 mL	de solución de nitroazul de tetrazolium
1	gradilla	20 mL	KOH 2M
1	Probeta de 100 mL	50 mL	PBS 1X
1	Vaso de precipitado de 100 mL		
20	Semillas de frijol germinadas		
20	Semillas de frijol sin germinar		
20	Perlas de vidrio o canicas muy pequeñas	alumnos	
3	Pipetas de 1 mL	20	Frijoles recién germinados, obtenidos igual que en la práctica anterior
3	Tapones de hule para los tubos anchos, con un agujero que quepa la pipeta de 1 mL	30	Perlas de ebullición de vidrio o canicas pequeñas
1	1° cm de papel parafilm	1	Bandeja de plástico larga, de aproximadamente 45 cm.
1	Bandeja de plástico larga o una charola desechable para hornear.		

Actividad 1: Preparación de los respirómetros

1. a tres tubos de ensaye grandes de boca ancho 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 gr de algodón sobre la primera capa.
3. A uno de los tubos agregar 15 semillas de frijol germinado (estos se obtienen de forma similar a la práctica anterior). Previo a agregar las semillas, en una probeta de 100 mL agregar 50 mL de agua destilada e introducir las 15 semillas germinadas para registrar el volumen que ocupan las semillas.
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. Posteriormente colocar los frijoles y las perlas secas en el tubo 2.
5. Para el tubo tres poner la cantidad de perlas de vidrio que igualen el volumen de los otros dos tubos, empleando el sistema de medición del volumen del material 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, conteniendo suficiente agua para cubrir completamente los respirómetros y las pipetas, sólo que no introducir completamente la pipeta, hasta que se haya equilibrado la temperatura y se este listo para realizar las mediciones. En este paso la punta externa de la pipeta se puede recargar en el borde de la bandeja.
8. Ver el siguiente video para que esta actividad quede más clara:
https://www.youtube.com/watch?v=oL7C9_3biZQ

Actividad 2: Medición de la velocidad de consumo de oxígeno

1. Con cronometro 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 y asegurarse de registrar en la pipeta hasta donde entra el agua.
3. Enseguida cada cinco minutos durante media hora registrar los cambios en la marca de agua de la pipeta, entre más agua entre es indicativo de que se está consumiendo el oxígeno.
4. Transcurridos los 30 minutos, sacar los respirómetros de la bandeja y recuperar el material vegetal y 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 tetrazolio y observar las diferencias en el color.

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.

<u>Práctica 12. Fotosíntesis</u>	
Propósitos	• Evaluar la fotosíntesis en plantas • Conocer una técnica sencilla para monitorear la fotosíntesis
Introducción	La fotosíntesis es un proceso bioquímico complejo. En este se produce el oxígeno que los organismos aerobios requieren para la respiración en el proceso de heterotrofia y se produce la biomasa nutricional de los quimioheterótrofos. Aunque complejo, se han diseñado diversas estrategias para monitorear el proceso. En esta práctica se sigue midiendo la producción de oxígeno en un sistema derivado de hojas verdes fotosintéticamente activas. La premisa del ensayo es que la actividad fotosintética produce oxígeno, este produce un cambio en la densidad de discos derivados de hojas haciendo que éstos floten por un exceso del gas.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
2	Gradilla para tubos de ensaye	500 mL	Solución de bicarbonato de sodio al 0.02 %
5	Pipeta de 10 mL y propipeta	1 gotero	Jabón liquido
2	Vaso de PP 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 sus puntas	10 mL	Acetato de amonio 5 mM
1	Sacabocados de 4 mm		
		Alumnos	
		6	Conectores de luz con soquet  Los seis son para todo el grupo
		6	Focos no led de 100 watts, uno rojo, naranja, amarillo, verde, azul y morado.
		7	Cajas de cartón de 50x50x50
		1	Perforadora de hojas de papel o un sacabocados pequeño
		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 con un sacabocados.
3. Colocar los discos en 50 mL de una solución de bicarbonato al 0.02 %, con una pequeña gota pequeña 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 de la jeringa y sellar la punta de la jeringa presionándola fuertemente sobre 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 los colores: rojo, naranja, amarillo, verde, azul y morado, dentro de una caja de cartón de 50 cm x 50 cm x 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 de manera que se pueda 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.
4. Contar los discos que van flotando con respecto al tiempo y contrastar entre 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 tetrazolium 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

<u>Práctica 13. Extracción y solubilidad de los lípidos</u>	
Propósitos	• Conocer técnicas rápidas para aislar lípidos de muestras biológicas. • Identificar y medir las propiedades de los lípidos.
Introducción	Los lípidos y su metabolismo es central en todos los organismos biológicos. La mayoría de las reacciones bioquímicas ocurren en un ambiente acuoso y el estudio de estas reacciones o rutas en las que participan es relativamente más sencillo que el de las que involucra compuestos hidrofóbicos como los lípidos. A este respecto es esencial contar con métodos de extracción, solubilización y estabilización de estas biomoléculas para posteriormente estudiar las reacciones en las que participan. En esta práctica se realizan actividades para aprender métodos generales y sencillos para extraer y solubilizar lípidos de diversas fuentes.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
20	Tubos de ensayo	50 mL	Acetona fría
2	Gradilla	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	alumnos	
1	Espátula	1 g	de mantequilla
1	Centrífuga	50 mL	Aceite de olivo
3	Propipetas	1	Un huevo de gallina
1	Baño termostático 37 °C	10 g	Semilla de calabaza
1	Micropipetas de varios volúmenes y sus puntas		
1	Espectrofotómetro		
1	Celdas de vidrio		

Actividad 1: extracción de lípidos por floculación

1. Obtener 2 g de semilla de calabaza sin cascara.
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 se puede hacer en centrifuga clínica a 3000 rpm por 10 minutos.

- Al final se obtendrán tres fases. La fase de abajo es el material insoluble, la fase acuosa contiene todas las biomoléculas solubles en agua y la capa de arriba son lípidos, principalmente los fosfolípidos.
- Tomar la fase pastosa de lípidos y colocar en un microtubo para su posterior uso.

Actividad 2: pruebas de solubilidad

- Preparar los siguientes tubos por triplicado, uno para los lípidos de semilla, otro para el aceite de olivo y otro para la mantequilla:

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

- Agregar de acuerdo con su serie 30 gotas de aceite de olivo
- A otra 0.5 g de extracto de semillas
- A otra 0.5 g de mantequilla
- Observar los diferentes niveles de solubilización

Actividad 3: extracción de colesterol de yema de huevo

- Obtener 2 gr de yema de huevo y colocar sobre un tubo cónico de centrifuga.
- Agregar 5 mL de acetona fría y agitar hasta obtener un homogenado (HA1).
- Tomar una alícuota de 0.5 mL de HA1
- Centrifugar el remanente a 3500 rpm por 10 minutos.
- Extraer el sobrenadante, que es llamada fracción acetónica 1 (FA1) y reservar para su posterior uso.
- Tomar el sedimento o precipitado que resultó del centrifugado de HA1
- re-extraer del sedimento más colesterol agregando otros 5 mL de acetona fría y agitar. En este punto se genera un HA2 (tomar alícuota de 0.5 mL).
- Centrifugar HA2 como en el paso 4 y recuperar el sobrenadante (FA2) y reservar para su uso posterior.
- Obtener otros 2 gr de yema y colocar sobre un tubo cónico de centrifuga.
- Agregar 5 mL de hexano y agitar hasta obtener un homogenado (HH1).
- Tomar una alícuota de 0.5 mL de HH1
- Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.
- Extraer el sobrenadante, que es llamada fracción hexánica 1 FH1

14. Tomar el precipitado de HH1 y Re-extraer del sedimento más colesterol agregando 5 mL de hexano y 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 las fracciones obtenidas de colesterol obtenidas en tubos rotulados: HA1, FA1, HA2, FA2, HH1, FH1, HH2 y FH2.
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 uno de los tubos y control.
4. Incubar por 20 minutos a 37 C.
5. Observar los cambios.

Actividad 5: análisis de los datos

1. Proponer un experimento o un estudio en donde se pueda emplear 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 2.
3. Discutir la solubilidad relativa de las fracciones lipídicas de la actividad 4, en términos fisicoquímicos.

<u>Práctica 14. Metabolismo de los lípidos</u>	
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 necesarios que un nuevo individuo necesita durante la fase no fotosintética. Para ello también se incluyen las enzimas que procesan los diversos almacenes energéticos de las semillas, como almidón y lípidos. En la etapa de germinación es esencial que los lípidos sean degradados y entren en el ciclo del glioxilato y Krebs para que la planta obtenga fuentes de carbono y energía. En esta práctica no se miden directamente los flujos de estas rutas, pero si se infieren por un consume del contenido lipídico aumentado durante la germinación.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
20	tubos de ensaye		Mezcla cloroformo-metanol 2:1
1	Gradilla	10 mL	Fenol al 5%.
1	recipiente para hielo	40 mL	H ₂ SO ₄ concentrado.
4	tubos de centrífuga		Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 7.5, 3mM de MgCl ₂
2	embudo		Reactivo de Biuret.
1	papel filtro	5 mL	Solución patrón de glucosa 10 mg/ml.
1	parafilm		Solución patrón de caseína 20 mg/ml
1	pipeta Pasteur		Solución de NaCl al 1%
2	vasos de precipitado de 25 ml		
4	vasos de precipitado de 50 ml		Sulfato de sodio anhidro
4	pipetas 1 ml		
2	pipetas 5 ml	Alumnos para la primera sesión	
2	pipetas 10 ml	2	frascos de boca ancha
2	pipetas Pasteur	2	Ligas
1	Piseta	1	paquete de gasas
4	tubos de espectrofotómetro	1	papel aluminio

1	Horno para pesar	1	charola
1	balanza granataria	1	Sol. de hipoclorito de sodio al 1%.
1	espátula	Alumnos segunda sesión	
1	centrífuga	1	Bolsa de hielo
1	Balanza granataria		
1	baño maría		
1	espectrofotómetro		

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 cascara) de 2.5 g cada serie.
2. Lavar 2 series de las semillas con 50 ml de sol. de hipoclorito de sodio 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 sosteniéndolas con una liga.
4. Guardar las dos series de semillas restantes en bolsas ziplock.
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 re-suspender 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 absorción a 280 nm.
7. Tomar el material lipídico que flocló.
8. Secar en horno y pesar

Actividad 3: determinación del contenido de carbohidratos

1. Preparar los siguientes tubos pipeteando como se indica:

tubo	Sln glc (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.
3. Permitir que se atemperen los tubos y leer absorbancia a 485 nm.

Actividad 3: Análisis de los resultados

Compara los tratamientos efectuados, contenido de lípidos y de carbohidratos

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

<u>Práctica 14. Detección de cuerpos cetónicos</u>	
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 hipoglicemia o ayuno en animales, se produce un flujo de fuentes energéticas inter-tejidos con el fin de proveer con las demandas energéticas de tejidos con altos consumos. Parte de esta dinámica bionérgica es movilizadora 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 ingesta de carbohidratos normal y reciente.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
6	tubos de ensaye	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 (un voluntario que ayune el día de la práctica)
1	Pizeta con agua destilada	1 tubo	Muestra de sangre de persona con reciente alimentación (un voluntario que consuma azúcares unos minutos antes de la toma de muestra)
4	pipetas de 10 mL	20 mL	Muestra de orina de persona en ayuno prolongado (un voluntario que ayune el día de la práctica)
2	pipetas 1.0 mL	20 mL	Muestra orina de persona con reciente alimentación (un voluntario que consuma azúcares unos minutos antes de la toma de muestra)
2	propipetas de 1.0 mL		
3	propipetas de 10 mL		
1	Kit para extraer sangre con tubo amarillo		
1	Centrifuga clínica		
2	Recipiente para orina		

Actividad 1: Detección de cuerpos cetónicos en muestras biológicas

1. Extraer un tubo de sangre de un voluntario con ayuno voluntario de más de 8 hrs y otro de otro voluntario con ingesta reciente de alimento.
2. Centrifugar el tubo para obtener el suero a 3000 rpm por 10 minutos.
3. Pipetear en tubos previamente roturados los siguientes componentes:

	Tubo 1(testigo)	Tubo 2 (suero ayuno)	Tubo 3 (suero alimentado)	Tubo 4 (orina ayuno)	Tubo 5 (orina alimentado)
Agua destilada	5 mL	3 mL	3 mL	-	-
Muestra de sobrenadante	-	2 mL	2 mL	5 mL	5 mL
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 presencia de cuerpos cetónicos.

Actividad 2: Análisis de los resultados

Compara los resultados entre las diferentes muestras y discutir de acuerdo con lo esperado en las diferentes condiciones.

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

Práctica 15. Detección enzimática de urea en muestras biológicas

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, en donde estos son interconvertidos hasta producir urea. en seguida la urea es movilizda por torrente sanguíneo hasta el sistema urinario. La concentración de urea en sangre es relativamente alta y 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.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	100 mL	urea 0.1 M
2	gr de semillas de sandia molida (bioquímica)	100 mL	Medio de reacción: rojo de fenol 0.03 mM, pH 6.8
15	15 tubos de ensayo	20 mL	PBS 1X
4	4 pipetas de 10 mL		
4	4 pipetas de 1 mL		
1	Caja de celdas para espectro	Alumnos	
1	1 vaso de pp de 50 mL	1	Bolsa de hielo pequeña
2	2 tubos para centrifuga de 15 mL	1	Muestra de sangre periferica obtenida en el laboratorio de clase
1	1 material para toma de muestra sanguínea	1	Muestra de orina obtenida en los sanitarios del edificio H1
1	1 vaso para muestra de orina		
1	Juego de micropipetas y puntas		
1	espectrofotómetro		

Actividad 1: Extracción de la ureasa de semilla

- Pesar 2 gr de semilla molida y resuspender en 10 mL de destilada.
- Centrifugar la muestra a 3,000 rpm por un periodo de 10 minutos.
- Recuperar el sobrenadante y reservar en hielo hasta su uso.

Actividad 2: Preparación de una curva estandar de urea

- En una serie de celdas de plástico pipetear los siguientes volúmenes:

UREA mL	AGUA mL	MEDIO DE REACCIÓN mL
0	1.45	1.5
0.1	1.35	1.5
0.25	1.20	1.5
0.5	0.95	1.5
0.75	0.70	1.5
1.0	0.45	1.5
1.45	0	1.5

7. La reacción se inicia con la adición de 50 microL de extracto de enzima y ésta debe pipetear una vez que este colocado en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
8. Agregar la enzima y medir la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos por 5 minutos.
9. Graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción, de la parte lineal de cada curso temporal.
10. Re-graficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de urea y emplear la parte lineal como una curva estándar.

Actividad 3: Determinación de la concentración de urea de muestras biológicas

1. Tomar con la ayuda del maestro o el técnico académico del área una muestra de sangre periférica humana.
2. Obtener el suero de la muestra de sangre centrifugando a 3000 rpm por 10 minutos.
3. Tomar una muestra de 20 a 50 mL de orina.
4. Realizar a cada muestra (suero y orina) una serie de diluciones en amortiguador de fosfatos de la siguiente manera: 1:2, 1:5 y 1:100
5. Pipetear en tres celdas de espectrofotómetro 1.45 mL de cada dilución de cada muestra (son seis en total y medir de una por una) y colocar en el espectrofotómetro.
6. Iniciar la reacción ureasa agregando 50 microL 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. Intrapolar las velocidades en la recta patrón y determinar su contenido de urea.
9. Descartar las diluciones que queden fuera de la recta y discutirlos resultados.

Práctica alternativa: Identificación química de carbohidratos (práctica alternativa en caso de que una de las prácticas no se pueda realizar)

Propósitos

- Identificar los diferentes tipos de carbohidratos: monosacáridos, disacáridos y polisacáridos en distintas muestras.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
50	Tubos de ensaye de 10 mL	10 mL	de solución de glucosa al 1%
4	Gradillas	10 mL	de solución de fructuosa al 1%
1	Pinzas para tubo de ensaye	10 mL	de solución de sacarosa al 1%
5	Pipetas de 5 mL	10 mL	de solución de lactosa al 1%
5	Pipetas de 10 mL	10 mL	de suspensión de almidón al 1% previamente hervido
2	propipetas	10 mL	de muestra problema
20	Pipetas Pasteur	10 mL	de solución de Fehling A
2	Vaso de precipitados de 100 mL	10 mL	de solución de Fehling B
1	Baño María	10 mL	de reactivo de molish
1	Parrilla de calentamiento	10 mL	de reactivo de DNS
		10 mL	de reactivo de Selliwanoff
		2 mL	de solución de lugol
		Material por parte de los alumnos	
		1	Manzana
		1	Plátano
		2 gr	de carne molida
		1	Refresco de limón
		10 ml	Salsa catsup

Procedimiento

Actividad 1. Preparación de las muestras problema

1. Obtener muestras de 2 g de manzana, 2 g plátano, 2 gr de carne de fresca, 2 mL de refresco de limón (incoloro) y 2 mL de salsa catsup.
2. Triturar en mortero las muestras solidas.
3. Agregar 10 mL de agua destilada y mezclar incluidas las muestras liquidas.
4. Decantar el liquido obtenido de cada uno de los homogenizados sobre un tubo rotulado como corresponda.
5. Reservar los tubos en hielo hasta su empleo.

Actividad 2. Identificación de los carbohidratos

1. Preparar las siguientes series de 5 tubos por 10 y pipetear el número de gotas que se indica las distintas muestras o estándar de carbohidrato (M), y los reactivos de la prueba que corresponda de acuerdo con la siguiente matriz (en total son 50 tubos)

	<i>Columna 1</i>			<i>Columna 2</i>		<i>Columna 3</i>		<i>Columna 4</i>		<i>Columna 5</i>	
	<i>Serie Fehling</i>			<i>Serie Molish</i>		<i>Serie Selliwanoff</i>		<i>Serie DNS</i>		<i>Serie yodo-lugol</i>	
	<i>RF An</i>	<i>RF Bn</i>	<i>M</i>	<i>Mol n</i>	<i>M</i>	<i>RSn</i>	<i>M</i>	<i>RB n</i>	<i>M</i>	<i>FH n</i>	<i>M</i>
<i>Glucosa</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>fructosa</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>Sacarosa</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>Lactosa</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>Almidón</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>P1</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>P2</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>P3</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>P4</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3
<i>P5</i>	5	2	2	10	1	5	10	5	2	10	3

2. Rotular perfectamente cada uno de los tubos de manera que no se pierda su identificación a la hora de realizar el procedimiento de las reacciones:

Prueba de Fehling:

1. Tomar los tubos de la serie de Fehling
2. Observar los cambios en color y aspecto de los tubos
3. Calentar en baño maría a ebullición por 5 minutos

4. Anotar los cambios observados
5. La reacción será positiva si la muestra se torna de color rojo y será negativa si permanece azul o cambia a un tono azul-verdoso.

Prueba de Molish:

1. Tomar los tubos de la serie de Molish.
2. Observar los cambios en color y aspecto de los tubos
3. Agregar una gota de ácido sulfúrico, deslizándola con precaución sobre la pared del tubo inclinado con un ángulo de unos 20°.
4. Anotar los cambios observados.
5. La reacción será positiva si se forma un anillo violeta en el tubo. La prueba sirve para identificar la presencia de carbohidratos.

Prueba de DNS:

1. Tomar los tubos de la serie de DNS.
2. Observar los cambios en color y aspecto de los tubos
6. Calentar a ebullición en baño maría por 5 minutos.
7. Anotar los cambios observados.
8. La reacción será positiva si la muestra se observa un cambio en la coloración a rojo intenso.

Prueba de Selliwanoff:

1. Tomar los tubos de la serie Selliwanoff
2. Observar los cambios en color y aspecto de los tubos
3. Calentar a ebullición en baño maría por 10 minutos y observar cada minuto
4. Anotar los cambios observados
5. La reacción será positiva si aparece un color rojo para las cetosas y rosa para las aldosas, los oligosacáridos y polisacáridos pueden dar positivos sólo si tienen un extremo reducto.

Prueba de Yodo-Lugol:

1. Tomar los tubos de la serie Yodo-lugol.
2. Observar los cambios ocurridos.
3. La prueba es positiva si se observa la aparición de un color morado intenso.
4. Incubar la muestra por 5 minutos en baño a ebullición.
5. La desaparición de color se debe a la disociación del reactivo del polisacárido por la desnaturalización inducida por el calentamiento.
6. Anotar los resultados

Resultados

Reportar las observaciones obtenidas en cada uno de los experimentos y presentarlas en tablas

Actividades

Revisar con el instructor el fundamento y operación de las reacciones químicas de identificación de carbohidratos

Discutir con el instructor los resultados, sobre todo las posibles discrepancias y elaborar un reporte de actividades.

Llenar la bitácora con todos los detalles importantes usando un formato estándar internacional.