



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Química Farmacéutico Biológica

Área Farmacéutica

**Manual de Bioquímica Celular y de los
Tejidos-I**

Fecha de aprobación: 8 de agosto de 2025

Vigente hasta: 8 de agosto de 2028



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	1/293

Listado de Profesores participantes

Primera edición 2014

Mtra. Leonor Aguilar Santelises
M. en C. Araceli García del Valle
Dra. María Teresa Corona Ortega
Edición: M. en C. Margarita Cruz Millán

Revisado y actualizado por:

Mtra. Leonor Aguilar Santelises
Dra. María Teresa Corona Ortega
Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava
Q.F.B. Rocío Ramírez Hernández
Dra. Adriana Hernández Reyes
Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz
M. en C. Claudia F. Martínez Rodríguez
Q.F.B. Graciela Rojas Vázquez
Dra. María Catalina Cárdenas Ascención
M. en C. Areli del Carmen Moran García
M. en C. Álvaro Bouret Araiza
M. en C. Octavio Zerecero Carreón



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	2/293

Índice

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	5
REGLAMENTO DE LABORATORIO	6
MANEJO DE RESIDUOS	8
CONSENTIMIENTO INFORMADO	9
CRITERIOS DE EVALUACIÓN	9
Práctica 1 MANEJO DE APARATOS	12
Práctica 2 MANEJO DE MICROPIPETAS	37
Práctica 3 CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS	53
Práctica 4 MICROSCOPIO ÓPTICO	65
Práctica 5 ESTRUCTURA CELULAR	79
Práctica 6 PRINCIPALES CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA MATERIA VIVA	102
Práctica 7 EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA EN ANIMALES Y PLANTAS	113
Práctica 8 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO	125
Práctica 9 ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	137
Práctica 10 TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS	150
Práctica 11 CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS	159
Práctica 12 SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	174
Práctica 13 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	183
Práctica 14 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE GERMEN DE TRIGO	208
Práctica 15 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN HUMANO	222
Práctica 16 CUANTIFICACIÓN DE ADN HUMANO	236
Práctica 17 ELECTROFORESIS DE ADN	246



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	3/293
Práctica 18	EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y METALES PESADOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA SALIVAL		256
Práctica 19	CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA		265
Práctica 20	MITOSIS		279
Práctica 21	FOTOSÍNTESIS		291
Material Básico			301
Anexo 1 Carta compromiso			303



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	4/293

INTRODUCCIÓN

La bioquímica es un área del conocimiento medular en la formación del Químico Farmacéutico Biólogo, al ser una disciplina que vincula los conocimientos previamente adquiridos con sistemas biológicos como su composición, estructura y función de las biomoléculas y la participación de éstas en los procesos en células y tejidos. Comprender estos mecanismos es esencial para interpretar fenómenos fisiológicos, detectar alteraciones patológicas y aplicar dicho conocimiento en ámbitos como la farmacología, la biotecnología y el diagnóstico clínico.

Este manual pretende ser una guía teórico-práctica para el aprendizaje de conceptos clave y el desarrollo de habilidades experimentales en un laboratorio de bioquímica. Se abordan temas como la estructura celular y los constituyentes químicos de la materia viva, proporcionando un marco para el estudio de biomoléculas como carbohidratos de reserva, lípidos presentes en la yema de huevo, proteínas plasmáticas y ácidos nucleicos como el ADN humano. Además, se incluyen procesos celulares como la mitosis, la fotosíntesis y la cinética enzimática, los cuales permiten entender la regulación y función de las células en distintos contextos.

Desde el enfoque práctico, se enfatiza el manejo de aparatos de laboratorio, el uso correcto de micropipetas y la observación celular mediante microscopio óptico. Se incluyen prácticas como la elaboración de una curva estándar de proteínas, la titulación y cromatografía de aminoácidos, y técnicas para el análisis de biomoléculas, diseñadas para fortalecer las competencias analíticas del futuro QFB.

El presente manual además de buscar transmitir conocimientos también pretende fomentar el pensamiento crítico, la rigurosidad científica y la integración entre la teoría y



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	5/293

la práctica, principios esenciales para la formación integral del Químico Farmacéutico Biólogo.

El objetivo de este material es fomentar en el estudiante la capacidad de integrar conocimientos teóricos y experimentales, desarrollar habilidades analíticas, y aplicar la bioquímica a la comprensión de fenómenos fisiológicos.

Objetivos

- **General**

Presentar en el Manual, actividades a desarrollar mediante técnicas de bioquímica, biología celular y biología molecular en el laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, así como mostrar la metodología, a fin de ejecutar cada práctica por los estudiantes y que aprendan a trabajar en el laboratorio con una actitud científica, manejar el equipo especial, la balanza analítica, centrífuga, micropipetas, espectrofotómetros, entre otros, además obtener resultados, registrarlos, analizarlos y elaborar sus conclusiones.

- **Particular**

- Analizar los fundamentos de técnicas bioquímicas, de extracción, cuantificación y análisis, utilizadas en las prácticas para estudiar las principales biomoléculas, carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN.
- Obtener habilidades prácticas en el laboratorio al desarrollar las técnicas presentadas en cada práctica para que obtenga resultados y datos confiables y válidos.
- Aprender las características de la curva estándar, los métodos espectrofotométricos y colorimétricos y aplicarlo para cuantificar las biomoléculas.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	6/293

- Discutir los resultados de los experimentos desarrollados en las actividades prácticas, para obtener conclusiones a partir de los mismos.
- Aprender a trabajar en equipo en el laboratorio, de manera ordenada, responsable y con respeto a todos los integrantes del equipo y profesores.
- Elaborar el reporte de cada práctica, presentando los objetivos, los resultados mediante fotografías, dibujos, esquemas, gráficas, cálculos, según sea el caso, discutir y presentar las conclusiones, además del material bibliográfico que consultó.

Reglamento de laboratorio

Los alumnos deben cumplir con lo establecido en el reglamento general de laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza aprobado por el H. Consejo Técnico disponible en la dirección https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2023/Reglamentos/reglamento_general_laboratorios_FESZ.pdf, además en caso de haber, de los siguientes lineamientos:

- **General**

Los lineamientos respecto del uso de laboratorio, uso de gavetas, condiciones de seguridad, prestamos de material y equipos, sanciones y adeudos deben ser revisadas en el Reglamento General de Laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, el cual se encuentra alojado en la sección de reglamentos en la página de la facultad.

- **Particular**

- Ser puntual a la sesión de laboratorio.
- Colocar mochila y objetos personales en el área asignada para ello.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	7/293

- Portar bata blanca de algodón durante toda la sesión de laboratorio.
- Usar zapatos cerrados.
- Mantener el cabello recogido.
- Como parte de las buenas prácticas de laboratorio, deben limpiar la mesa de trabajo al inicio y al final de cada experimento.
- Puede estar en el laboratorio si se encuentran los profesores responsables.
- Reportar a los maestros cualquier incidente ocurrido durante la práctica.
- Mantener pasillos y salidas sin obstrucciones.
- No ingerir alimentos, ni bebidas dentro del laboratorio.
- No correr, empujar o jugar en el laboratorio.
- Cerrar/apagar todo servicio usado en la práctica (extractor y luz de la campana, balanzas analíticas, llaves de agua, etc.).
- La asignación de gavetas se realiza en función del número de equipos por grupos.
- El/los equipos que ocupan una gaveta tienen la responsabilidad de traer su candado, y de tener llave todos los alumnos que la ocupan. Al finalizar el semestre, dejarán la gaveta desocupada, limpia y sin candado.
- Los reactivos y soluciones para usar a lo largo del semestre son preparados considerando un experimento por equipo, por lo que **no es posible repetir experimentos**.
- Los reactivos se preparan en colaboración por todos los grupos del módulo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	8/293

Manejo de Residuos

Docentes y alumnos participan en el manejo de residuos de acuerdo con el procedimiento SGC-PO06 Manejo de Residuos.

Docentes

- Dar a conocer a los alumnos, al inicio del ciclo escolar, el Procedimiento de manejo de residuos generados en los laboratorios de docencia SGC-PO06.
- Asesorar al alumno en la correcta clasificación, envasado y etiquetado de los residuos generados.
- Verificar al final de la actividad de laboratorio que los alumnos dejan sus áreas de trabajo limpias y que clasificaron, envasaron, identificaron y dispusieron correctamente los residuos generados.

Alumnos

- Investigar previo a la actividad en el laboratorio, las propiedades físicas y químicas de los reactivos que utilizarán.
- Llevar el día de la actividad de laboratorio, los contenedores primarios (recipientes) adecuados y suficientes para envasar los residuos que se generen.
- Clasificar los residuos generados en la actividad del laboratorio de acuerdo con su naturaleza y grado de peligrosidad (CRETIB).
- Envasar y etiquetar los residuos que genere en cada actividad de laboratorio con base a la investigación realizada, a la asesoría del docente y a lo establecido en este Procedimiento.
- Colocar los residuos en las áreas establecidas.

Consentimiento informado

De las prácticas incluidas en el presente manual, dos requieren de la toma de muestra sanguínea (proteína plasmática y extracción de ADN humano), que requieren de un



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	9/293

consentimiento informado por parte del alumno donante. El formato se encuentra en el anexo 1.

Criterios de Evaluación

El módulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos-I está conformado por un componente teórico y un componente práctico (laboratorio).

Para aprobar el módulo, es necesario tener ambos componentes aprobados. La calificación final la conforman 60% el componente teórico y 40% el componente práctico, y se reitera que los dos componentes deben ser aprobatorios.

La calificación del módulo práctico estará conformada por:

Examen previo: es el examen aplicado al inicio de cada práctica, abarca los conocimientos básicos necesarios para el desarrollo de ésta. Considerando las 12 prácticas programadas por semestre, son 12 exámenes previos. El promedio de los exámenes previos conformará el **30%** de la calificación final. Hay que considerar que éste se aplica en los primeros 10 minutos de la sesión.

Examen de bloque: es el examen que abarca un bloque de cuatro prácticas ya desarrolladas, en él se evalúan fundamentos y cálculos utilizados en dichas prácticas. Considerando las 12 prácticas programadas por semestre, son 3 exámenes de bloque. El promedio de los exámenes de bloque conforma el **40%** de la calificación final.

Reportes y Trabajo de laboratorio: cada práctica concluye con la entrega del reporte correspondiente, este se entrega por equipo a menos que el profesor lo solicite de manera individual, el cual debe elaborarse de manera clara y ordenada. El documento debe incluir las siguientes secciones:



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	10/293

Portada: indicando el nombre de la práctica, número de grupo y de equipo, el nombre completo de los integrantes del equipo, nombre del profesor, la fecha de realización y de entrega del reporte.

Objetivos: Plantean lo que se espera lograr con la práctica. Los encuentran descritos en el manual, en la práctica correspondiente.

Resultados: corresponden a los datos obtenidos en el desarrollo de la práctica, así como los dibujos, fotografías, tablas, gráficas y demás elementos que permitan visualizar la forma en la cual éstos se procesaron.

Análisis de resultados: interpretación de los datos obtenidos: se explica qué significan los resultados, cómo se relacionan con el fenómeno estudiado y se comentan posibles fuentes de error.

Discusión: Se contrastan los resultados obtenidos con los datos teóricos o experimentales reportados en la literatura. Se identifican coincidencias, discrepancias y se discuten las causas posibles.

Resultados: se establece en qué medida se cumplieron los objetivos planteados, basándose en el análisis realizado. También pueden señalarse aprendizajes clave o recomendaciones para futuras prácticas.

Referencias: Se enlistan las fuentes de información consultadas para el desarrollo y análisis de la práctica.

El reporte y el trabajo de laboratorio conforman el **20%** de la calificación final.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	11/293

Trabajo final: Se trata de la presentación de un tema de actualidad relacionado con el módulo, el cual se realiza por equipo y se trabaja a lo largo del semestre, se presenta en un evento denominado Encuentro de Bioquímica Celular y de los Tejidos al final del semestre, la fecha se establece en el programa del módulo. Esta actividad conformará hasta un **10%** de la calificación final en función del desempeño de los estudiantes.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	12/293

MANEJO DE APARATOS

Objetivos

- ✓ Identificar los principales componentes de aparatos de uso común en el laboratorio de BCT I (balanza analítica, potenciómetro, centrífuga, espectrofotómetro).
- ✓ Explicar el fundamento y el uso que tienen cada uno de los aparatos.
- ✓ Manejar y cuidar correctamente cada uno de ellos.

Antecedentes académicos

- Conceptos de masa, peso, sensibilidad, precisión y exactitud.
- Definición de pH.
- Diferentes tipos de electrodos.
- Amortiguador.
- Fuerza centrífuga y velocidad angular.
- Espectro electromagnético y espectrofotometría.
- Principales componentes, manejo adecuado y principales cuidados de:
 - Balanza analítica
 - Potenciómetro
 - Centrífuga
 - Espectrofotómetro



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	13/293

Introducción

BALANZA ANALÍTICA

La balanza es un instrumento de laboratorio utilizado para medir la masa de diferentes materiales o sustancias, paso indispensable para cualquier procedimiento analítico. Una determinación gravimétrica, implica la determinación de la masa, a la cual hacer referencia. Si la determinación de la masa no es absolutamente confiable, el resultado analítico final es inaceptable. El término peso se utiliza como sinónimo de masa, aunque es incorrecto.

La balanza analítica en particular se caracteriza por su exactitud y capacidad para detectar pequeñas diferencias de peso. Las balanzas analíticas modernas tienen una sensibilidad de hasta 0.1 mg (0.0001 g) lo que las hace ideales para trabajos que requieren gran precisión (fig. 1).



Fig. 1. Vista lateral y frontal de balanza analítica OHAUS®.

En un laboratorio de bioquímica es fundamental el uso de la balanza analítica, permitiendo la adecuada preparación de los reactivos a utilizar, tener reproducibilidad en los experimentos, además de permitir la evaluación cuantitativa de diversos componentes celulares (fosfolípidos, albúmina, azúcares reductores, etc.). Su adecuado uso es esencial para garantizar la exactitud de los resultados experimentales.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	14/293

Funciona mediante un sistema de compensación electromagnética de fuerza. Al colocar un objeto sobre el platillo, la célula de carga detecta el cambio en la fuerza ejercida y lo convierte en una señal eléctrica proporcional a la masa, esta señal es procesada electrónicamente y mostrada en una pantalla digital. La corriente eléctrica necesaria para generar esta fuerza electromagnética es proporcional al peso y se utiliza para determinar la masa del objeto (fig. 2).

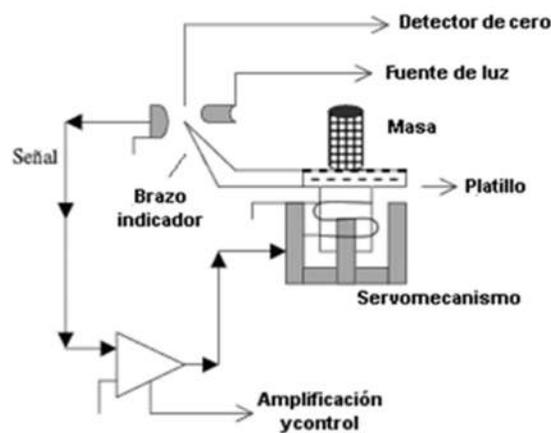


Fig. 2. Fundamento de la balanza analítica.

Existen diferentes marcas y modelos de balanza analítica, de manera general presentan los siguientes componentes:

1. **Gabinete protector** (vitrina o cámara de pesaje): evita corrientes de aire, polvo o vibraciones que puedan afectar la medición.
2. **Platillo de pesaje**: superficie metálica donde se coloca el recipiente o la muestra.
3. **Pantalla digital**: muestra el valor de la masa en tiempo real.
4. **Botón de tara**: permite restar el peso del recipiente para obtener solo el de la muestra.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	15/293

5. **Nivel de burbuja y patas de nivelación:** permiten asegurar que la balanza esté perfectamente nivelada.
6. **Puertas deslizables:** permiten acceso.

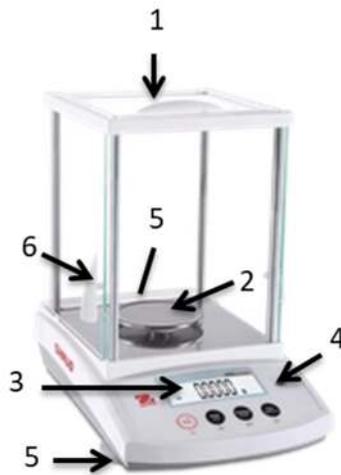


Fig. 3. Partes generales de la balanza analítica.

Pasos para su uso

Se deben seguir los siguientes pasos para la correcta operación de la balanza analítica:

- Verificar que se encuentre nivelada (con la burbuja de aire en el centro) de lo contrario, nivelarla usando los tornillos niveladores de las patas, hasta llevar la burbuja al centro (fig. 4A).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	16/293

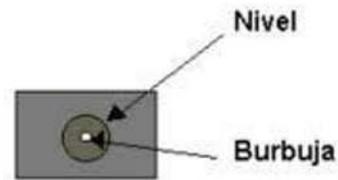


Fig.4A. Burbuja de nivel de balanza analítica

- Encender presionando la membrana del botón de encendido (ON O/T), y esperar a que ésta se estabilice (fig. 4B).
- Abrir la puerta del gabinete y colocar el recipiente o papel sobre el que se pesará.
- Cerrar la puerta y esperar a que la lectura se estabilice.
- Presionar el botón de tara para poner a cero la balanza.



Fig. 4B. Encendido de balanza analítica

- Abrir nuevamente la puerta y añadir cuidadosamente la sustancia a pesar, usando una espátula adecuada, cuidando de no derramar sustancias sobre el platillo o en el gabinete (figura 4C).



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	17/293



Fig. 4C. Uso de espátula al momento de pesar

- Cerrar la puerta, permitir la estabilización, leer y registrar el valor medido.
- Retirar cuidadosamente la muestra y cerrar la balanza si no se sigue usando.
- Oprimir nuevamente el botón de encendido, para dejar en ceros.
- Finalmente oprima el botón de apagado (OFF/MODE).

Cuidados y recomendaciones

- Es un instrumento sensible, debe permanecer en una superficie firme y estable.
- Identificar y respetar la capacidad máxima indicada por el proveedor. No rebasar esta capacidad.
- Usar papel de pesaje o recipientes adecuados; la muestra a pesar no debe entrar en contacto directo con el platillo.
- Nunca pesar sustancias calientes o frías, ya que generan corrientes de aire que afectan la precisión.
- Limpiar regularmente el platillo y el interior del gabinete con una brocha de cerdas suaves.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	18/293

POTENCIÓMETRO

También conocido como pHmetro, es uno de los instrumentos más comúnmente utilizados en diversos tipos de laboratorios; de docencia, de investigación e industriales, incluyendo laboratorios de bioquímica (fig. 5). Son utilizados para determinar el grado de acidez o alcalinidad de una solución, es decir su pH.



Fig. 5. Potenciómetro HANNA HI 223®

El pH se define como el $-\log [H^+]$, indicando el grado de acidez de una solución, con una escala de 0 a 14. La determinación es potenciométrica, al comparar el potencial eléctrico entre dos electrodos.

El instrumento cuenta con un electrodo sensible, el cual se sumerge en la muestra y un segundo electrodo (electrodo de referencia) con un pH conocido. Así, cuando el electrodo sensible entra en contacto con la solución, los iones de hidrógeno que se encuentran en ella interactúan con la membrana de vidrio del electrodo. Esta interacción crea una diferencia de potencial eléctrico entre el electrodo sensible y el electrodo de referencia. El instrumento mide esa diferencia de potencial eléctrico y la convierte en un valor numérico que representa el pH de la solución, estableciendo si es ácido o básico.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	19/293

Su uso permite controlar y ajustar las condiciones del medio, lo cual es crítico en los diversos procesos biológicos.

Existen diferentes marcas y modelos de pHmetros, con ciertos componentes generales (fig. 6):

1. **Electrodo de pH:** Es el electrodo sensible, el cual se sumerge en la solución muestra, censando la concentración de iones de hidrógeno. Puede ser de vidrio o de otro material, dependiendo del tipo y modelo del PHmetro.
2. **Electrodo de referencia:** Es un electrodo interno, con un potencial invariable, contra el cual se compara cuantitativamente los cambios del potencial censados por la membrana de detección.
3. **Circuito eléctrico:** Circuito eléctrico que conecta el electrodo sensible y el electrodo de referencia, midiendo la diferencia de potencial (voltaje) entre ellos.
4. **Pantalla digital:** Pantalla que muestra la lectura de pH.
5. **Controles:** Permiten al usuario realizar ajustes, como cambiar el rango de pH, compensar la temperatura o realizar una calibración.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	20/293

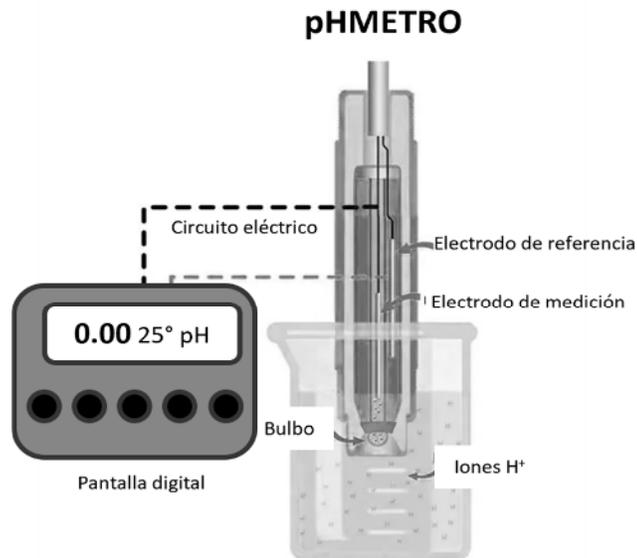


Fig. 6. Partes de un pHmetro

Los pasos generales para seguir para el correcto uso del potenciómetro son:

- Encender el potenciómetro (fig. 7A).
- Calibrar el potenciómetro utilizando soluciones buffer:
 - Pulse la tecla CAL (fig. 7B).



Fig.7A. Encendido del Potenciómetro.



Fig.7B. Selección de calibración.

- Aparecerá el mensaje “CLEAR CAL”; de inmediato oprima el botón SET CLR (fig. 7C).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	21/293

- Destape y enjuague el electrodo con agua destilada, y sumérgalo en el buffer pH 7 (fig. 7D). Use los botones de aumento y disminución para el ajuste de pH.



Fig.7C. Inicio de calibración.



Fig.7D. Buffer pH 7.

- Agite el vaso de precipitados que contiene el buffer pH 7 hasta que en la pantalla el reloj de arena se apague.
- Cuando aparezca "CFM" en pantalla, oprima el botón CFM.
- Retire el electrodo de la solución buffer y enjuáguelo con agua destilada (fig. 7E).



Fig.7E. Lavado del electrodo.

- Sumerja el electrodo en el buffer pH 4 y repita los dos pasos anteriores.
- Lavar el electrodo entre cada calibración.
- Medir la muestra:

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	22/293

- Enjuagar el electrodo y sumergirlo en la muestra (fig. 7F).
- Esperar a que la lectura se estabilice.
- Registrar el valor de pH (fig. 7G).



Fig.7F. Muestra.

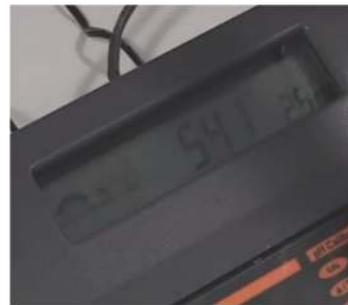


Fig.7G. Lectura de pH

- Enjuagar el electrodo con agua destilada tras cada medición.
 - Al finalizar, almacenar el electrodo en solución conservadora (nunca seco).

Cuidados y recomendaciones

- Dejar el electrodo sumergido en solución específica, nunca dejar secar el electrodo.
- Evita golpear o rayar el bulbo de vidrio del electrodo, ya que es muy delicado.
- No sumergir el electrodo más allá del nivel indicado por el fabricante.
- Lava con agua destilada antes y después de cada medición.
- No uses el electrodo en soluciones calientes o agresivamente corrosivas, a menos que esté diseñado para ello.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	23/293

- No frotar el electrodo, en caso necesario, para quitar el exceso de agua por capilaridad usando un papel adsorbente.
- Calibra el potenciómetro cada vez que se vaya a utilizar, o al menos una vez al día si se usa frecuentemente.
- Para optimizar el funcionamiento de los electrodos, la calibración y las mediciones se realizan en soluciones a la misma temperatura.
- Reemplaza las soluciones buffer regularmente para asegurar una calibración precisa.

CENTRÍFUGA

La centrífuga es un equipo de separación, que usa la fuerza centrífuga separando los diferentes componentes presentes en una muestra. La separación se da en función de: la densidad, el tamaño, la forma, de los diferentes componentes que conforman la muestra, al responder diferencialmente a dicha fuerza (fig. 8).

Esta función es de gran utilidad en los diferentes laboratorios en los cuales se trabajan con muestras biológicas, permitiendo separar, por ejemplo: los diferentes componentes de la sangre, los diferentes organelos celulares, células de su medio de cultivo, un sólido de un líquido o dos líquidos inmiscibles de diferente densidad, por mencionar algunos.

El principio básico de la centrifugación es la sedimentación de los diferentes componentes de una muestra en un líquido, al ser sometida a una fuerza centrífuga (generada por un rotor que gira a alta velocidad) en un tiempo determinado.

La fuerza gravitacional relativa “g” es la aceleración que experimentan los componentes de la muestra durante la centrifugación, expresada como un múltiplo de la gravedad terrestre. Esta fuerza está dada a su vez por la siguiente ecuación:

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	24/293

$$g = \omega r^2 = \frac{4\pi(\text{rpm})r^2}{3600} = \frac{\pi(\text{rpm})r^2}{900}$$

w = velocidad angular rad/s.

rpm = revoluciones por minuto.

r = distancia radial a partir del eje de rotación hasta la solución.

La fuerza que experimenta cada componente de la muestra está relacionada con el tiempo al que se somete a esta fuerza, la velocidad angular (relacionada con el rotor usado), la distancia al eje (también relacionado con el rotor usado).

La fuerza gravitacional relativa “g” es convertible a RPM, permitiendo ajustar en función de los diferentes protocolos, existen tablas para ello.

La centrifugación, es útil en la concentración del precipitado (resuspendiendo en volúmenes más pequeños), lavado del precipitado, cambio de medio de suspensión. Estimar los pesos moleculares de macromoléculas con el uso de ultracentrífugas (con velocidades de 50,000 a 30,000 g).

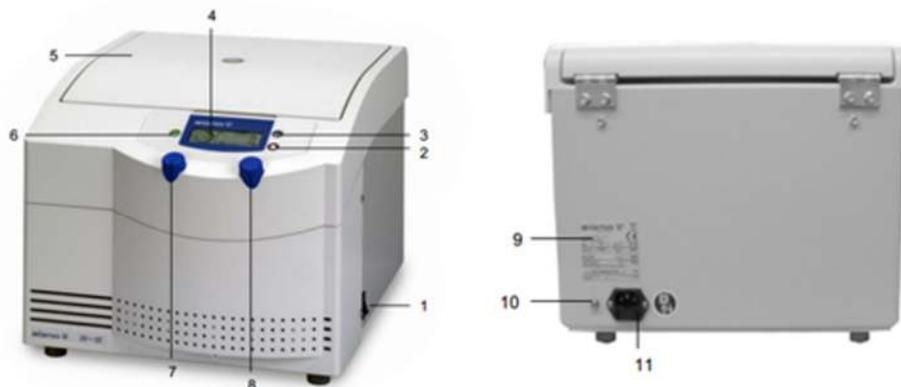


Fig.8. Vista frontal y trasera de centrífuga Sigma modelo 2-6®.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	25/293

Existen diferentes marcas y modelos de centrífugas, para una gran variedad de tubos. Los componentes generales son (fig. 9):

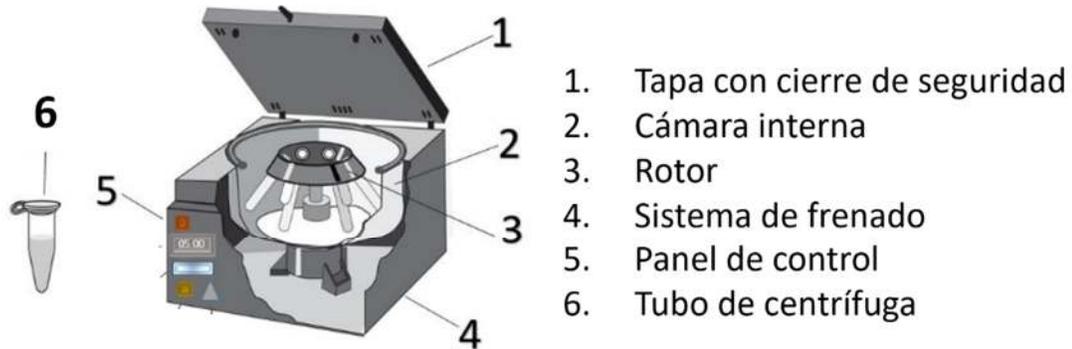


Fig.9. Partes de una centrífuga

1. **Tapa con cierre de seguridad:** impide el funcionamiento si no está correctamente cerrada.
2. **Cámara interna:** área donde gira el rotor, aislada por seguridad.
3. **Rotor:** pieza giratoria donde se colocan los tubos de muestra. Puede ser de ángulo fijo o basculante (swing-out).
4. **Sistema de frenado:** detiene el rotor gradualmente tras el uso.
5. **Panel de control:** permite seleccionar velocidad (rpm), tiempo, y en algunos modelos, temperatura (fig. 10).
6. **Tubo de centrífuga:** recipiente resistente que contiene la muestra.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	26/293



Fig.10. Acercamiento del panel de operación

Pasos para su uso

Se deben seguir los siguientes pasos para la correcta operación de la centrifuga:

- Verificar que la centrifuga esté limpia, seca y colocada sobre una superficie nivelada.
- Colocar los tubos con la muestra y asegurarse de que estén bien cerrados.
- Equilibrar los tubos (utilizando una balanza de dos platos):
 - Cada tubo debe tener un tubo opuesto de igual peso.
 - Si hay un número impar de muestras, usar un tubo con agua como contrapeso.
- Insertar los tubos en el rotor, de forma simétrica y ajustando bien (fig. 11).

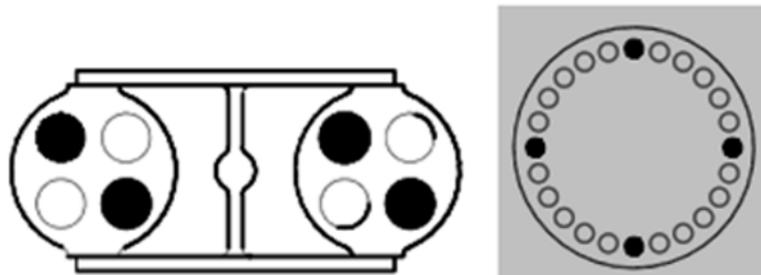


Fig.11. Colocación de muestras en la centrifuga



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	27/293

- Cerrar correctamente la tapa de seguridad.
- Ajustar la velocidad (rpm) y el tiempo de centrifugación según las indicaciones de la práctica.
- Encender la centrifuga y esperar a que el proceso termine sin abrir la tapa.
- Esperar a que el rotor se detenga por completo antes de abrir la tapa.
- Retirar los tubos con cuidado, sin agitar el pellet si se requiere conservarlo.

Nota: Si los tubos no son equilibrados o son colocados de manera incorrecta; se romperán durante el proceso y se desajustará el equipo. En este caso será necesario oprimir el botón de frenado para interrumpir el proceso inmediatamente.

Cuidados y recomendaciones

- Nunca operar la centrifuga sin balancear las cargas; puede provocar daños severos al equipo y accidentes.
- No llenar los tubos más de 2/3 de su capacidad.
- No abrir la tapa mientras el rotor esté en movimiento.
- Revisar que los tubos no estén agrietados o deformados.
- Utilizar sólo tubos compatibles con el modelo de centrifuga.
- Limpiar derrames inmediatamente después del uso con un paño húmedo.
- No sobrepasar los límites de velocidad recomendados para cada tipo de tubo.
- Evitar el uso de soluciones corrosivas a menos que se cuente con un rotor y tubos resistentes.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	28/293

- Guardar la centrífuga con la tapa abierta para evitar acumulación de humedad.

ESPECTROFOTÓMETRO

Es un instrumento utilizado para medir la cantidad de luz que absorbe o transmite una determinada sustancia, la cual puede relacionarse con su concentración, permitiendo realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas. Aprovecha la propiedad de las sustancias de absorber o transmitir algún tipo de luz que incide en ellas.

Johann Lambert matemático, físico, astrónomo y filósofo alemán observó que existía una relación entre el rayo incidente y el transmitido a través de placas coloreadas de espesor diferentes, anunciando la ley en la que señala que existe una relación logarítmica entre la intensidad del rayo transmitido y el espesor de la placa.

August Beer, físico y matemático alemán amplió la ley de Lambert para incluir la concentración de las sustancias, resultando la siguiente ley: “La absorbancia de los cuerpos coloreados en solución es directamente proporcional a la concentración (fig. 12), además del espesor del recipiente, dando como resultado la siguiente expresión:

$$A = (E) (e) (c)$$

Donde:

A = absorbancia.

E = coeficiente de extinción.

c = concentración.

e = espesor de la placa.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	29/293

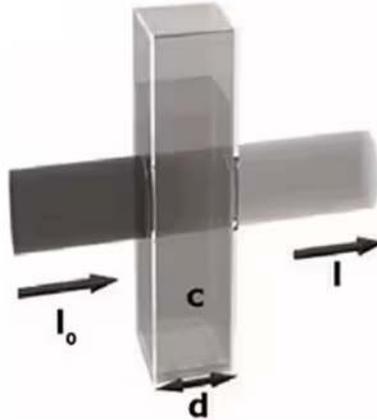


Fig.12. Modificaciones de un haz de luz al incidir sobre una muestra.

Por lo tanto, al incidir un rayo de luz a través de una cubeta de vidrio, un disolvente y la sustancia disuelta, se tendrán que tomar en cuenta las absorbancias de la cubeta y el disolvente, pero puede eliminarse esto si se utiliza la misma cubeta y el mismo disolvente (el uso de un blanco), además de comparar las absorbancias del problema con el de una solución patrón.

Es un instrumento fundamental en los laboratorios de química, de biología y de otras ciencias (fig.13). Permite la determinación cuantitativa de diferentes componentes celulares: concentración de proteínas, de ADN, de ARN, de algún bioelemento, etc.



Fig.13. Parte frontal del espectrofotómetro ThermoScientific Genesys 20®



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	30/293

Existen diferentes marcas y modelos de espectrofotómetros, de manera general presentan los siguientes componentes:

1. **Fuente de luz:** Proporciona energía radiante en forma de luz visible o no visible. Por ejemplo: lámparas de filamento de tungsteno (para longitudes de onda del espectro visible y el ultravioleta próximo), lámparas de Hidrógeno y Deuterio (para región ultravioleta entre 220-360 nm) y lámparas de carburo de silicio y óxido de zirconio para radiaciones IR (Infrarrojo).
2. **Rendija de entrada:** Reduce la luz difusa y evita que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de onda.
3. **Monocromador (Selector de radiaciones):** Difractan el haz de luz. Por ejemplo: prismas que permiten el paso de luz (vidrio para el espectro visible y cuarzo para el espectro UV), redes de difracción (son un gran número de líneas paralelas situadas a distancias iguales entre sí y son hendiduras sobre un vidrio o una superficie metálica).
4. **Rendija de salida:** Tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer.
5. **Cubeta:** Es el recipiente donde se coloca la muestra para la medición. Pueden ser de distintos tipos y tamaños (cuadradas, rectangulares, redondas). Suelen estar fabricadas en vidrio, cuarzo o en plástico.
6. **Detector:** Puede ser de dos tipos: fotocélulas o células fotovoltaicas o fototubos multiplicadores.
7. **Medidor:** Sistemas de lectura de la energía eléctrica que recoge el detector y que puede ser lectura directa (se utiliza una célula fotovoltaica) o puede ser amplificadores de señal como en el caso del fototubo multiplicador.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	31/293

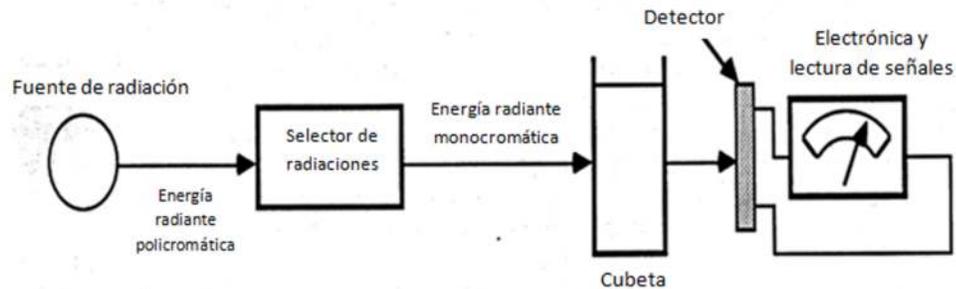


Fig.14. Esquema simplificado de la trayectoria óptica de un espectrofotómetro

Pasos para su uso

Se deben seguir los siguientes pasos para la correcta operación del espectrofotómetro:

- Encender el espectrofotómetro y permitir que se estabilice (al menos 15 minutos).
- Seleccionar la longitud de onda adecuada para el analito.
- Usar un blanco (incluye todo menos el analito), limpiar las superficies externas de la cubeta con un paño libre de pelusa.
- Colocar la cubeta del blanco en el compartimiento y cerrar la tapa.
- Ajuste a 0 de absorbancia o 100% de transmitancia con el blanco.
- Sustituir la cubeta del blanco por la muestra, previamente limpia por fuera y sin burbujas.
- Cerrar la tapa y leer la absorbancia en la pantalla.
- Registrar los datos y, si es necesario, repetir con otras muestras.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	32/293

Nota: Ubique en la celda y en el espectro la forma correcta de colocarla, de forma que la luz pase a través de las paredes claras (fig. 15).

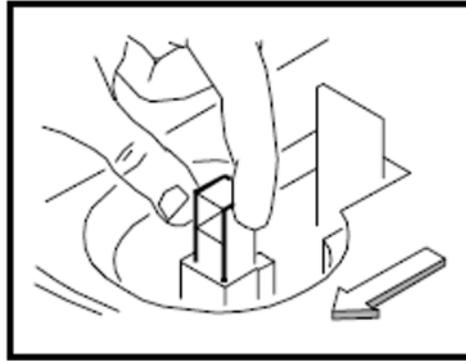


Fig.15. Posición correcta de la celda.

Cuidados y recomendaciones

- Colocar el equipo sobre una superficie plana, nivelada y estable.
- Manipular las cubetas con precaución por las partes opacas para evitar huellas en la zona óptica.
- No utilizar cubetas rayadas, sucias o con burbujas.
- Usar siempre el mismo tipo de cubeta (plástico, vidrio o cuarzo) para todas las mediciones comparativas, incluyendo el blanco.
- No sobrellenar las cubetas; no más de 2/3 de su capacidad.
- Limpiar regularmente el compartimento de cubetas con un paño seco.
- Apagar el equipo después del uso y mantenerlo cubierto para evitar acumulación de polvo.
- No mantener prendido sin usar, se reduce el tiempo útil de vida de la fuente de luz.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	33/293

Nota: Ten presente la existencia de diferentes modelos y marcas de cada uno de los equipos e instrumentos usados tanto en tu formación académica como en tu vida laboral, ante cualquier duda de uso, siempre consulta el manual correspondiente.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	34/293

Material y equipo

Esta práctica tiene como objetivo dar a conocer el uso, cuidados, fundamento, de los principales equipos a usar a lo largo del semestre, por lo que esta práctica no requiere de reactivos o insumos.

- Balanza analítica
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Potenciómetro

Método

La práctica está diseñada para que los alumnos usen la introducción aquí planteada como base, la complementen con su propia investigación y sean capaces de explicar los componentes principales, el uso adecuado y los principales cuidados que se requieren, usando los equipos correspondientes.

Resultados

La dinámica de la práctica consiste en la explicación de cada uno de los equipos por parte de los alumnos, complementado por los profesores. Se evalúa el desempeño de su presentación, por lo que la práctica no considera la entrega de un reporte.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	35/293

Cuestionario

1. ¿Qué es y cómo se utilizan los términos de precisión y exactitud?
2. Explique por qué es necesario realizar la calibración interna o externa de una balanza analítica, y describa el procedimiento adecuado para cada caso.
3. Describa detalladamente el funcionamiento del electrodo combinado de vidrio en un potenciómetro y cómo afecta su constante de Nernst a la precisión de la medida de pH.
4. Si usted tiene que centrifugar a 3000 g y cuenta con una centrifuga cuyo rotor tiene un diámetro de 20 cm, ¿cuántas rpm tiene que aplicar?
5. Durante una lectura espectrofotométrica, ¿qué efectos puede tener el uso de un blanco inadecuado y cómo se corrige este error experimentalmente?

Referencias

1. **Aguilar-Santelises, L., Corona-Ortega, M. T., García-del Valle, A., Rangel-Corona, R., & Cruz-Millán, M. (2007).** *Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I* (2.^a ed.). FES Zaragoza, UNAM.
2. **Hanna Instruments. (2002).** *HI 21/HI 22 Series Instruction Manual* [Manual]. Woonsocket, RI: Hanna Instruments. Recuperado de <https://docs.rs-online.com/caca/0900766b805cc9a9.pdf>.
3. **Sigma Laborzentrifugen GmbH. (2007).** *Operating manual: Laboratory centrifuge Sigma 2-6* [Manual]. Osterode am Harz, Alemania. Recuperado de <https://www.ous-research.no/regenerative/docs/>
4. **Thermo Fisher Scientific. (2001).** *SPECTRONIC® 20+ and 20D+ series spectrophotometers: Operator's manual* [Manual]. Thermo Fisher Scientific.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	36/293

MANEJO DE MICROPIPETAS

Objetivos

- ✓ Identificar las partes que componen las micropipetas.
- ✓ Aprender el uso adecuado de las micropipetas y seguir los cuidados indicados para su mejor conservación.
- ✓ Realizar el cálculo de la exactitud y del coeficiente de variación de las mediciones con micropipetas.

Antecedentes académicos

- ✓ Manejo de material de laboratorio.
- ✓ Tipos de micropipetas.
- ✓ Calibración de micropipetas.
- ✓ Tipos de errores de medición.

Introducción

Las micropipetas son dispositivos que se caracterizan por carecer de depósito y que se utilizan para medir o trasvasar pequeños volúmenes de líquido de un recipiente a otro con gran exactitud, permiten medir volúmenes pequeños que van desde 0.1 μL y



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	37/293

comúnmente hasta 1 mL. Hoy en día existen una gran cantidad de compañías y modelos similares que funcionan bajo un mismo principio de pistones. Por lo anterior, es importante consultar las instrucciones del fabricante sobre el empleo correcto de cada modelo. Una característica común a todas es que utilizan puntas plásticas descartables que se ajustan al extremo de cada modelo de micropipeta. En estas puntas de plástico es donde se deposita el líquido a medir.

Existen micropipetas que sólo miden un volumen fijo y otras que miden volúmenes variables. Las de volumen fijo son más precisas que las de volumen variable. Además, pueden ser usadas de forma manual o electrónicamente automatizada; siendo éstas últimas de alto costo por lo que su uso se limita en equipos automatizados o robóticos.

La pipeta mecánica o de pistón funciona generalmente transmitiendo la fuerza que un operador ejerce sobre un émbolo que se encuentra unido a un pistón mediante un eje que los desplaza a lo largo de un cilindro de longitud fija, forzando un volumen predefinido de líquido fuera de la pipeta.

Las pipetas de pistón de volumen fijo, dispensan un volumen predeterminado de líquido, el cual es conocido como volumen nominal (V_n) y las de volumen variable permite ajustar el volumen dispensado dentro de un rango determinado en las especificaciones de la pipeta; en este caso, la variación del volumen se logra modificando la longitud de la carrera del pistón dentro del émbolo mediante un micrómetro.

Las pipetas de pistón pueden ser de desplazamiento por aire o neumáticas, debido a que existe un volumen de aire entre la cabeza del pistón y el líquido en el cilindro, o de desplazamiento directo por que el pistón se encuentra en contacto directo con el líquido (fig. 1).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	38/293

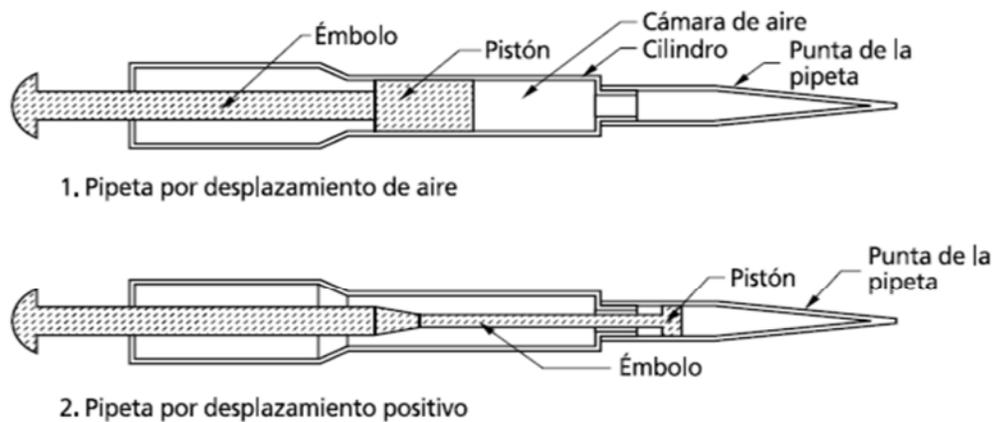


Fig. 1. Tipos de pistón en las pipetas. Tomado de Organización Panamericana de la Salud (2005). Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio (178).

Todas las pipetas de pistón disponen de puntas desechables para minimizar los riesgos de contaminación. Para facilitar el uso del tipo de punta adecuado los fabricantes han adoptado un código de color según el volumen a dispensar (Cuadro 1) y que en las de uso más general coincide con el color de las puntas utilizadas.

Las pipetas utilizadas en nuestros laboratorios son del tipo Gilson® (Figs. 2 y 3). Cada marca tiene sus particularidades, especialmente con el ajuste exacto de las puntas desechables; sin embargo, el uso, cuidado y calibración es similar para todas las de su tipo.

Cuadro 1. Capacidad de las pipetas por código de colores

Volumen dispensado por la pipeta. Rango en microlitros μL	Color característico utilizado para identificar
---	--



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	39/293

0.1-2.5 μ L	Negro
0.5-10 μ L	Gris
2.0-20 μ L	Gris/ amarillo
10-100 μ L	Amarillo
50-200 μ L	Amarillo
100-1000 μ L	Azul
500-2500 μ L	Rojo



Fig. 2. Imágenes de pipetas de la marca Gilson de distintas capacidades.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	40/293

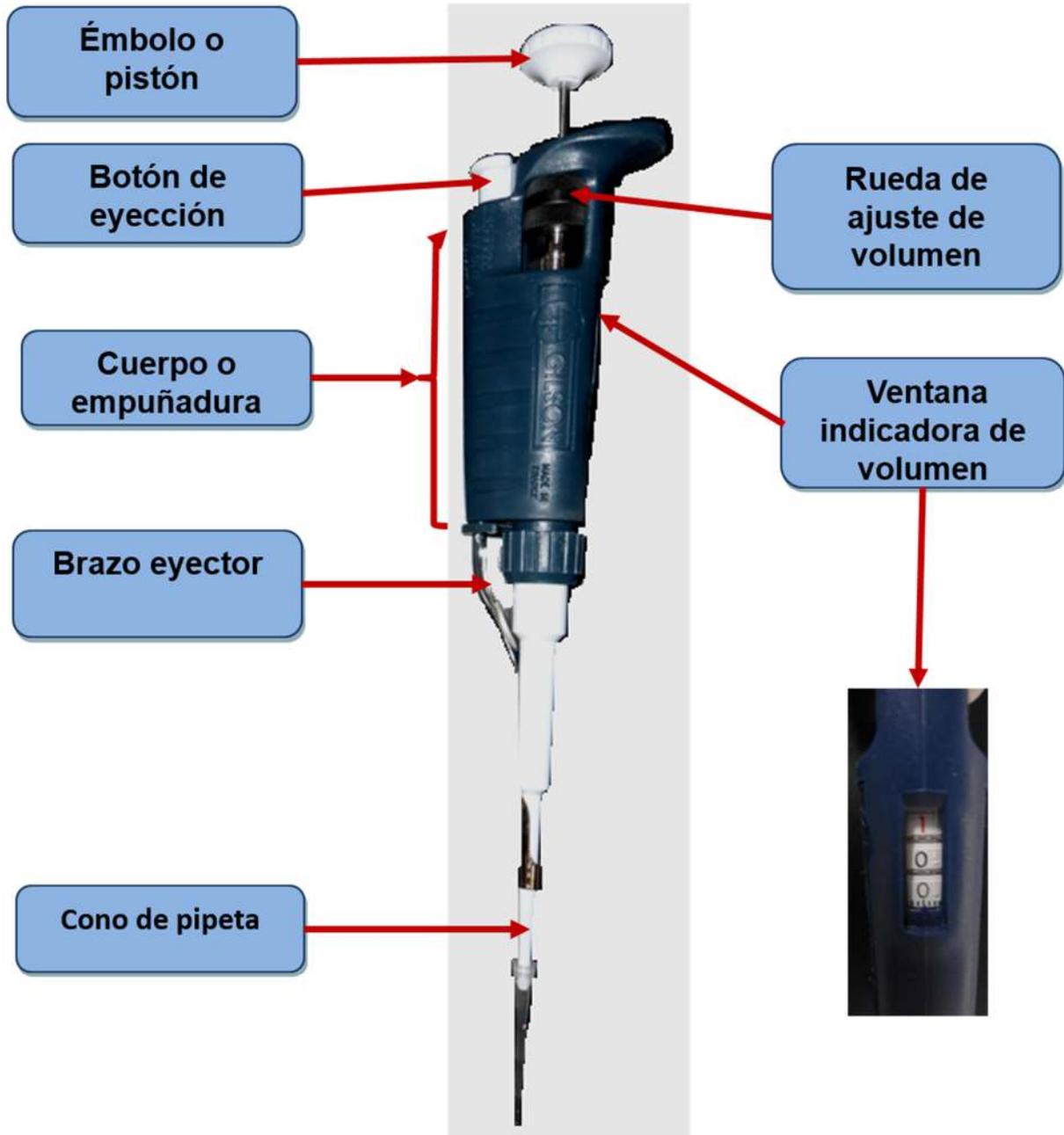


Fig. 3. Esquema de las partes que componen un micropipeta de la marca Gilson.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	41/293

Recomendaciones para el pipeteo:

- ✓ La profundidad de inmersión de la punta es especialmente importante en el uso de volúmenes pequeños. Si la punta se sumerge demasiado, se aspira más líquido debido al aumento de la presión. Si, por el contrario, la punta no se sumerge lo suficiente, se puede cargar aire con las consiguientes burbujas y volumen inadecuado.
- ✓ Es fundamental mantener un ritmo, velocidad y técnica adecuada al mover el émbolo. Una aspiración demasiado rápida e incontrolada puede llevar a la formación de aerosoles, salpicaduras y posible contaminación del eje y del pistón, lo que puede producir incluso pérdida de volumen de la muestra.
- ✓ Se debe procurar mantener el ángulo de inmersión de la pipeta lo más cercano a la vertical posible. De otra forma, la columna vertical de líquido será más pequeña y se aspirará demasiada muestra. Por el contrario, al dispensar el líquido, la punta se ha de mantener en un ligero ángulo frente a la pared del vaso para asegurar un correcto vaciado.
- ✓ Para la mayoría de aplicaciones se recomienda dispensar con el extremo de la punta apoyado contra la pared del recipiente. Así se reduce o elimina el hecho de que se quede algo de muestra en el interior de la punta después de acabar la dispensación. Retirar la pipeta deslizando el extremo de la punta hacia arriba por la pared lateral para liberar cualquier gota restante en el orificio de la punta. Otra técnica consiste en dosificar directamente en la superficie del líquido. Es crucial usar una punta de pared fina para que no quede ninguna gota en el interior de la punta. Si se dispensa directamente dentro del líquido tendremos que sacar la pipeta manteniéndola en el segundo tope para evitar una toma de muestra después de la dispensación.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	42/293

- ✓ Se recomienda enjuagar previamente las puntas como mínimo dos veces con el líquido a pipetear para compensar la película de líquido en el interior de la punta. El enjuague previo también tiene otras ventajas: ayuda a neutralizar los efectos de capilaridad, temperatura y humedad del aire del interior de la pipeta con la temperatura y humedad de la muestra.

Material y Equipo

- Micropipetas p20, p200, p1000 y p5000 μ L
- Balanza analítica
- Una caja Petri o un vaso de precipitado de 10 mL.
- Puntas desechables para las micropipetas
- Agua destilada

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	43/293

Método

1. Pasos para manejar una micropipeta:

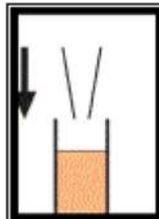
- a. Ajustar el volumen girando la rueda dentada de control de volumen hasta que en la ventana aparezca el volumen deseado.



- b. Colocar una punta descartable adecuada en la punta de la pipeta haciendo una leve presión para lograr un buen ajuste.

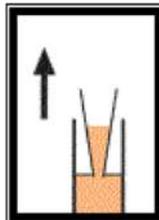


- c. Oprimir el botón pulsador con el dedo pulgar, **hasta el primer tope** y **sin soltarlo** introducir verticalmente la pipeta, hasta que la punta se sumerja de 2 mm para volúmenes pequeños, hasta 5 mm para volúmenes mayores dentro del líquido.

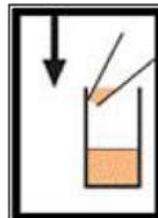


Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	44/293

- d. Liberar lentamente la presión sobre el botón, después de 2-3 segundos retirar (en el caso de sustancias viscosas el proceso será más lento evitando la formación de burbujas al interior de la punta desechable), siempre verticalmente, la pipeta del líquido deslizándola la punta contra la pared del recipiente.



- e. Apoyando la punta contra la pared del recipiente colocar el líquido, presionar lentamente el botón pulsador hasta el **primer tope**. Después de un segundo, y sin soltar el botón pulsador, terminar de vaciar la pipeta presionando hasta el **segundo tope**.





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	45/293

- f. Retirar la pipeta deslizando la punta contra la pared del recipiente.



2. Precauciones para no dañar el sistema interno de pistones que posee la micropipeta:

- El líquido no debe entrar en contacto con el cono de la micropipeta.
- Nunca invertir la micropipeta con la parte de arriba hacia abajo.
- No colocar la micropipeta en forma horizontal si la punta tiene líquido.
- Jamás ajustar el volumen fuera del rango de la micropipeta (No forzar el tornillo micrométrico de ajuste de volumen).

3. Cálculo de la exactitud (E%) y del coeficiente de variación (CV%):

- Para cada micropipeta revisar el porcentaje de exactitud (E%) y el coeficiente de variación (CV%) en todo el rango usando al menos dos volúmenes diferentes y el volumen mínimo y el máximo de la micropipeta.
- Seleccionar la micropipeta y las puntas adecuadas.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	46/293

- c. Colocar el vaso de precipitado o una caja Petri en la balanza, anotar el peso y tarar a cero.



- d. Tomar el volumen de agua destilada con la micropipeta y colocar en el vaso que se encuentra en la balanza.



- e. Registrar el peso del agua añadido. La densidad del agua es 1 g/mL a 25°C, por lo tanto, un volumen de 1 mL corresponde aproximadamente a una masa de 1 g, (1 mL = 1000 µL).

- f. Repetir el procedimiento diez veces para cada volumen.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	47/293

4. Cálculo del volumen medio:

Los valores de las pesadas del control gravimétrico son sólo la masa del volumen dosificado. Para obtener el volumen real se debe efectuar un cálculo corrector. El cálculo corrector se realiza multiplicando el valor medio de los valores de las pesadas (x) por el factor Z (mL/g que es lo mismo que $\mu\text{L}/\text{mg}$), que toma en consideración la densidad del agua, la temperatura de control y la presión atmosférica. Z es igual a $1.0032 \mu\text{L}/\text{mg}$, referido a 21.5°C , 1013 mbar (hPa) y a la utilización de agua destilada o Z es igual a $1.0029 \mu\text{L}/\text{mg}$, referido a 20.5°C y 1013 mbar (hPa).

Ejemplo:

Valores del control a 21.5°C ($Z = 1.0032 \mu\text{L}/\text{mg}$)

Volumen controlado V_0 (es el volumen de la pipeta que se calibra)

Ejemplo V_0 (μL): $20\mu\text{L}$ (x)

Valor nominal V (mg) = Volumen controlado / Z

Valor nominal (mg): $(20\mu\text{L} / 1.0032\mu\text{L}/\text{mg}) = 19.9362 \text{ mg}$

$x_1 = 20.0 \text{ mg}$ $x_2 = 19.9 \text{ mg}$ $x_3 = 19.5 \text{ mg}$ $x_4 = 19.6 \text{ mg}$ $x_5 = 19.9 \text{ mg}$

Valor medio

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

x = resultado de las pesadas

n = número de pesadas



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	48/293

Volumen medio

$$\underline{V} = \underline{x} * Z$$

\underline{x} = promedio de las pesadas
Z = factor

Exactitud

$$E (\%) = \underline{V} - V_{nominal} / V_{nominal} * 100$$

Desviación estándar

$$S = Z * \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Coefficiente de variación

$$CV (\%) = \frac{S}{\underline{V}} * 100$$

Si los valores calculados de exactitud (E%) y el coeficiente de variación (CV%) son menores que los valores de tolerancia o iguales a éstos, entonces la pipeta está en orden.

Límites de tolerancia

Volumen (µL)	E% nominal	CV % nominal
5-10	1.0	0.8
20-10	0.7	0.4
100-1000	0.5	0.2

Esta metodología permite adiestrarse en el control de la precisión y la exactitud de una pipeta, comparar diversos tipos de pipetas entre sí para detectar si hay diferencias entre



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	49/293

ellas. Además, detectar la exactitud y la precisión de un lote de pipetas y controlar factores atribuibles a la utilización de una pipeta por diversos usuarios.

Resultados

- Realizar el análisis de los datos obtenidos con las fórmulas proporcionadas.
- Calcular la exactitud y precisión que tienen las micropipetas utilizadas en el laboratorio.

Cuestionario

1. Defina qué es calibración.
2. ¿Cuáles otros parámetros se utilizan para realizar la calibración de una pipeta?
3. Defina que es exactitud y precisión.
4. ¿Qué marcas de micropipetas son las más comunes?
5. ¿Cuántos rangos de volumen se manejan en las micropipetas y cuáles son?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	50/293

Referencias

1. Catálogo de Productos de Manejo de líquidos. LT800507/A. USA: Gilson S.A.S.; 2011.
2. García M, Silva M. Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínicos. España: MAD; 2004.
3. Instrucciones de Trabajo Estándar para Pipetas. AESOP13640. Germany: Eppendorf AG; 2013.
4. Organización Panamericana de la Salud. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio. Washington: 2005.
5. Segal C, Ortega G. Manual de prácticas de biología molecular de la célula I. México: Facultad de ciencias de la UNAM; 2005.
6. User's Guide. PIPETMAN®P. LT801129/A. France: Gilson S.A.S.; Recuperado de: https://www.gilson.com/pub/media/docs/PIPETMAN_User_Guide_T801122_E.pdf?srsltid=AfmBOoopJhtvFt8Anpd155HZyQxIFGWXsVIHgwDZD-My01AcLRROQbq7 en junio de 2025.
7. https://www.gilson.com/pub/media/docs/PIPETMANCLASSIC_UG_LT801120-F.pdf?srsltid=AfmBOoqNRp8BVy2qBmYKGkvqaQ0PpoLjhMIg4GDz6NnXEeCbpe6vZNE



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	51/293

CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS

Objetivos

- ✓ Desarrollar y analizar una curva estándar.
- ✓ Determinar la concentración de albúmina en la clara de huevo por el método de Lowry.

Antecedentes académicos

- ✓ Espectrofotometría.
- ✓ Ley de Lambert y Beer
- ✓ Curvas de calibrado o curvas estándar.
- ✓ Fundamento del método de Lowry.

Introducción

El adecuado diseño y análisis de una curva estándar es una herramienta indispensable en el trabajo de laboratorio para la determinación cuantitativa de una sustancia.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	52/293

Entre las determinaciones de curva estándar más utilizadas se encuentran aquellas que proporcionan un resultado colorido proporcional a la sustancia que se desea cuantificar. Con este método fisicoquímico basado en la medición de la absorción de la energía radiante, el analista medirá la absorción en la longitud de onda correspondiente al color obtenido en la reacción.

I. Espectrofotometría

La espectrofotometría es un método de análisis óptico frecuentemente usado en análisis químicos para determinar la cantidad de luz absorbida o transmitida por una solución, y debido a que, en el caso de las curvas estándar, ésta es proporcional a la concentración presente, puede indicarnos la concentración exacta al compararla con una solución de concentración conocida. Cabe mencionar que el método espectrofotométrico recibe el nombre según sea la radiación utilizada, como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta o infrarroja.

a) Espectrofotometría de absorción

La espectrofotometría de absorción se basa en la capacidad que poseen algunas sustancias homogéneas de absorber parte de la energía y transmitir el resto cuando un haz de energía radiante monocromática incide sobre ella.

Para familiarizarse con la técnica, a continuación, se presentan algunas definiciones útiles:

- **Absorbancia (A):** es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia (T), en el que el disolvente puro es el material de referencia, esto es:

$$A = \log_{10} 1/T = -\log_{10} T$$

- **Absortividad (a):** es la relación entre la absorbancia y el producto de la longitud del paso óptico (b) normalmente expresada en centímetros, por la concentración (c). Es decir:



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	53/293

$$a = A/bc \quad \square \quad A = abc$$

- Coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción (ϵ): es la absortividad cuando la concentración se expresa en moles por litro y el paso de la luz en centímetros.
- Poder de radiación (P): también llamado flujo de radiación, es la cantidad de energía transportada por un haz de energía radiante y se mide con detectores, tales como fotocélulas, termopares y bolómetros.
- Transmitancia (T): es la relación entre el poder de radiación transmitido por una muestra (P) y el poder de radiación que incide sobre ella (P_0), medidos ambos en la misma posición del espectro y con la misma rendija. Esto es:

$$T = P/P_0$$

b) Espectro de absorción.

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida (ϵ) a diferentes valores de longitud de onda (λ).

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

El espectro de la absorción de una sustancia depende fundamentalmente, de la estructura química de la molécula, por lo que cada sustancia absorbente posee su espectro característico. En el desarrollo de nuevos métodos espectrofotométricos, deberá obtenerse siempre la curva espectral de las especies absorbentes con la finalidad de seleccionar la longitud de onda apropiada para el experimento.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	54/293

II. Curvas de calibrado o curvar estándar

Después de determinar la longitud de onda a la cual deben realizarse las medidas, se procede al desarrollo del método, para lo cual es necesaria la elaboración de un blanco, este deberá contener los reactivos, aditivos, disolventes, etc., en la misma concentración y naturaleza que las utilizadas en la muestra en la que se desarrollará el color, de esta manera, las lecturas de las muestras estarán corregidas automáticamente para cualquier absorción pequeña por acción de los reactivos y disolventes.

En un proceso analítico que relaciona; la señal (absorbancia) y las características del analito (concentración), de modo que la calibración se realiza para obtener la señal de respuesta como función de la concentración real del analito. Se representan los datos obtenidos y se obtiene la gráfica de la señal corregida frente a la concentración del analito. Lo normal es que la gráfica tienda a una línea recta, donde a medida que aumenta la concentración, la señal de respuesta es mayor (pendiente positiva). La ecuación matemática que representa el modelo de curva de calibración lineal, es la siguiente:

$$y = mx + b$$

Siendo: m = pendiente, x = concentración, y = señal de respuesta (absorbancia), b = ordenada al origen.

Dado que se utiliza un blanco, el valor de b siempre será cero, con lo que m permanece constante y no va a depender de la concentración.

a) Recomendaciones para el diseño de una curva estándar:

- Conocer la concentración aproximada de la sustancia a determinar en la muestra problema.
- Contar con una sustancia patrón en el laboratorio para ser utilizado como referencia.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	55/293

- Determinar el intervalo de concentraciones del patrón a utilizar, procurando que la elección incida en donde el método ofrezca más sensibilidad.
- Elegir por lo menos 4 concentraciones distintas del patrón.
- Hacer diluciones del problema (si es necesario) para asegurar que los datos que se obtengan estén dentro del intervalo de las concentraciones elegidas del patrón para el experimento.
- Prepara un blanco de reactivos que deberá contener todo menos la sustancia a determinar.
- El volumen final de todos los tubos deberá ser el mismo.
- Realizar la curva por duplicado.

III. Método de Lowry para la cuantificación de proteínas.

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

El método consta de dos etapas (fig. 1):

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -Proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a precipitar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
2. La reducción, también en medio alcalino, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	56/293

reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo color azul.

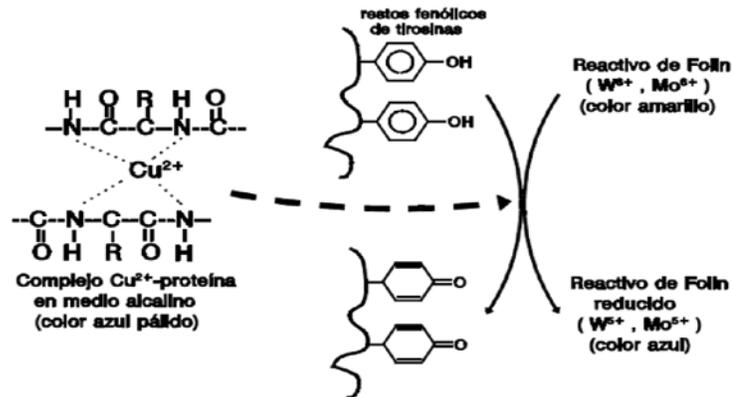


Fig. 1 Reacción de Lowry.

Para la realización de esta práctica se ha elegido en particular el método de Lowry utilizado para la cuantificación de proteínas. En este caso se determinará albúmina de la clara de huevo.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	57/293

Material y Equipo

- Probetas graduadas de 25 mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Vasos de precipitados de 25 mL
- Matraz aforado de 10mL
- 1 desyemador
- Pipeta graduada de 1 mL
- Tubos de ensayo de 13 X 100
- Marcador indeleble de punta extrafina
- Gradilla
- Micropipetas. p200, p1000 y p5000 μ L
- Puntas nuevas y limpias para las micropipetas
- Hojas de papel milimétrico.
- Espectrofotómetro
- Celdas de espectrofotómetro.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	58/293

Reactivos

- Reactivo 1: Na_2CO_3 al 2% p/v, en NaOH al 0.1 N.
- Reactivo 2: 10 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% p/v en tartrato de sodio y potasio al 1% p/v.
- Reactivo 3: Solución cuproalcalina. Mezclar 50 mL del reactivo 1 + 1 mL de reactivo 2.
- Reactivo 4: 10 mL de una dilución 1:3 del reactivo de Folin-Ciocalteu con NaOH al 0.1N.
- Solución patrón de proteínas: 5 mg de albúmina en 50 mL de NaOH 0.1N.
 - Colocar 50 mL de NaOH 0.1N en baño de hielo.
 - Pesar en la balanza analítica aproximadamente 5 mg de albúmina y documentar el peso real.
 - Colocar 10 mL de NaOH 0.1N frío en un vaso de precipitados con capacidad para 50 mL.
 - Adicionar 5 miligramos de albúmina al vaso de precipitados y disolver de forma lenta y suave (no agitar bruscamente).
 - Una vez que la albúmina se encuentre totalmente disuelta, pasar la solución a un matraz volumétrico con capacidad para 50 mL y llevar al aforo con NaOH 0.1N frío.
- Solución diluida de clara de huevo.
 - Separar la clara de huevo con ayuda de un desyemador y colocarla en un vaso de precipitados con capacidad para 100 mL.
 - Tomar 1mL de la clara del huevo con ayuda de una pipeta graduada de 10 mL y colocarla en un vaso de precipitados con capacidad para 25 mL. Adicionar 5mL de NaOH 0.1N frío y disolver.
 - Pasar la solución a un matraz volumétrico con capacidad para 10 mL y llevar al aforo.
 - Tomar 1 mL y aforar a 100 mL con NaOH 0.1N frío.
 - Etiquetar y guardar en refrigeración.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	59/293

Método

1. Para realizar la curva estándar y la determinación de la calidad de proteína contenida en la dilución de la clara de huevo, preparar 8 tubos (tabla 1) y agregar los volúmenes indicados de los reactivos.
2. Para determinar los volúmenes a usar de la solución patrón considere la concentración en la que ésta se encuentra y para determinar el volumen de la muestra problema, considere que la concentración promedio de proteínas en la clara de huevo es de 11 g/100 mL. Asimismo, se deben considerar las diluciones realizadas y que el volumen final de las muestras problema y patrón es de 3.1 mL.

Tabla 1. Contenido de cada tubo de la curva estándar.

Tubo	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Solución problema de proteínas (mL)	-	-	-	-	-	?	?	?
Solución patrón de proteínas (mL)	-	0.1	0.2	0.4	0.8	-	-	-
H ₂ O destilada	2.0	1.9	1.8	1.6	1.2	?	?	?
Reactivo 3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agitar y dejar reposar 10 min.								
Reactivo 4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Agitar inmediatamente y dejar reposar 20 min.								
Medir absorbancia a 640 nm.								



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	60/293

Resultados

- ✓ Con los resultados de los tubos 1, 2, 3 y 4 elaborar en una hoja de papel milimétrico la curva estándar, en la cual se gráfica absorbancia contra la concentración de albúmina.
- ✓ Interpolarse las absorbancias de los tubos problema (albúmina de clara de huevo).
- ✓ Tomar en cuenta las diluciones de la muestra para determinar la concentración de albúmina en 100 mL de clara de huevo y comparar con la concentración teórica.

Cuestionarios

1. ¿Cuál es el fundamento del método de Lowry?
2. ¿Cuál es la concentración teórica de albúmina en la clara de huevo?
3. Qué diluciones se tienen que hacer a una solución de 10 g/100 mL para obtener una concentración de 10 mg/100 mL.
4. ¿En una curva estándar, se debe tener un volumen final igual en todos los tubos? ¿Por qué?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	61/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2007.
2. Ayres G. Análisis químico cuantitativo. México: HARLA; 1970.
3. Bender GT. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. España: Editorial Acribia; 1992.
4. Castaño F. Espectroscopía UV y visible. España: Alhambra; 1970.
5. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. Guía de validación de métodos analíticos; 2002
6. Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8. [on line] Disponible en: <https://acortar.link/OACG2s>. Acceso 2022.
7. Lowry OH, Rosebrouh NJ, Frr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-275.
8. Olsen E. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté; 1990.
9. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de bio comparabilidad. México: Secretaría de Salud; 2013.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	62/293

MICROSCOPIO ÓPTICO

Objetivos

- ✓ Identificar los componentes del microscopio óptico que utilizará durante las prácticas posteriores.
- ✓ Analizar el fundamento de distintos tipos de microscopios.
- ✓ Revisar los cuidados que se deben de tener al utilizar un microscopio.
- ✓ Practicar enfocar adecuadamente muestras fijas y en fresco en el microscopio óptico.

Antecedentes académicos

- ✓ Definición de lo que es un microscopio
- ✓ Qué función tiene cada una de las partes del microscopio
- ✓ Fundamento del funcionamiento del microscopio
- ✓ Aplicaciones de los distintos tipos de microscopio



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	63/293

Introducción

El microscopio óptico fue la primera herramienta utilizada para el esclarecimiento de la estructura celular; la microscopía óptica y el uso de técnicas de preparación de secciones finas de tejido y de tinción permitió a los citólogos la caracterización de estructuras rodeadas por membranas como núcleos, mitocondrias y cloroplastos en diversos tipos celulares. Aunado a lo anterior, los avances tecnológicos vertiginosos relacionados con la mejora de la óptica y la generación de lentes más sofisticados, condujeron a la aparición de potentes microscopios ópticos como confocales, multifotón y de súper resolución.

El límite de resolución de un instrumento óptico hace referencia a la distancia en que deben de estar separados los objetos adyacentes para ser distinguidos como entidades separadas y fue enunciado a finales del siglo XIX por el físico alemán Ernst Abbe aportando la fórmula física para la determinación de esta distancia en la que intervienen tres elementos: la longitud de onda de la luz (λ) que incide sobre el objeto, el índice de refracción del medio (n) y el seno del ángulo desde el cual se observa la muestra ($\sin \alpha$). Por ejemplo, afirmar que el límite de resolución de un microscopio es de 400 nanómetros (nm), significa que los objetos deben de estar separados al menos 400 nm para ser reconocidos como entidades separadas, mientras que una resolución de 200 nm significa que se puede distinguir objetos separados a 200 nm, cuanto más pequeño es el límite de resolución de un microscopio mayor es su poder de resolución. El límite de resolución previsto por Abbe para la luz visible, en un rango de longitudes de onda de 400-700 nm, fue de alrededor de 200-300 nm, hasta que apareció el microscopio óptico de superresolución que posee un límite de resolución diez veces menor (fig. 1).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	64/293

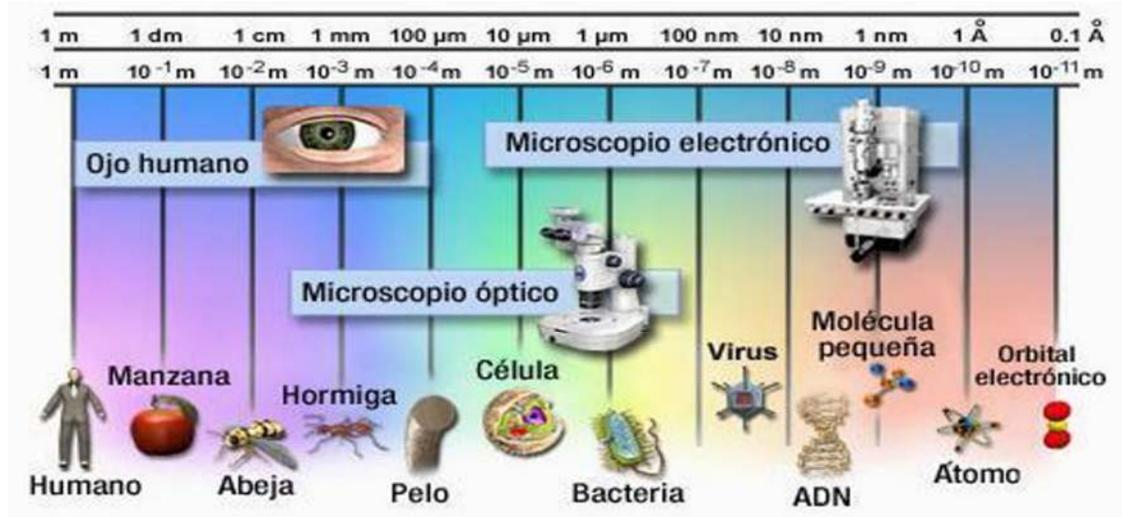


Fig. 1. La figura muestra los tamaños relativos de distintos objetos y seres vivos, así como los instrumentos necesarios para detectarlos.

Los primeros microscopios electrónicos aparecieron en las primeras décadas del siglo XX y su límite de resolución aumentó significativamente mediante la sustitución del haz de luz visible por electrones impulsados por una fuente de voltaje que se comportan como ondas de longitud muy pequeña (Fig. 2).

Descripción del recorrido de la luz de un microscopio óptico compuesto

Este proceso comienza con la fuente de iluminación, normalmente una fuente de luz localizada en la base del instrumento. Los rayos de luz procedentes de esta fuente que pasan a través de lentes condensadores que dirigen la luz hacia la muestra montada en un portaobjetos de vidrio dispuesto en la platina del microscopio. La lente objetivo, localizada inmediatamente sobre la muestra, es responsable de la formación de la imagen primaria. La mayoría de microscopios compuestos tienen diversos objetivos de distintos aumentos ajustados sobre un revolver rotatorio.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	65/293

La imagen primaria es posteriormente aumentada por la lente ocular. En algunos microscopios entre objetivo y el ocular se posiciona una lente intermedia para conseguir aún más aumentos. Los aumentos totales de la imagen se pueden calcular multiplicando los aumentos del objetivo, del ocular y de la lente intermedia, así un microscopio con un objetivo de 10x, una lente intermedia de 25x, y un ocular 10x, aumentará 250 veces la muestra.

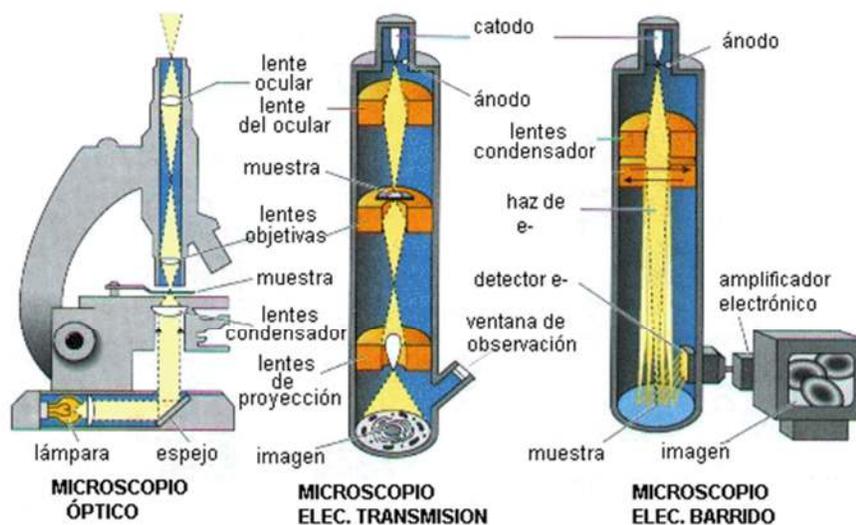


Fig. 2. Funcionamiento de tres tipos de microscopio; microscopio óptico, microscopio de transmisión y microscopio electrónico de barrido.

Los elementos del microscopio descritos hasta ahora constituyen la forma básica de la microscopía de campo claro, porque la luz blanca pasa directamente a través de la muestra, la cual puede estar teñida o no, dependiendo de las características estructurales que se proyecten examinar.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	66/293

Parámetros ópticos

Aumento

Es la relación existente entre el tamaño de un objeto percibido a simple vista y el apreciado con el microscopio, es decir, es el número de veces que se ve el tamaño de un objeto por encima de su valor real.

Límite (poder) de resolución

La resolución de un microscopio es su capacidad de distinguir dos puntos muy cercanos como separados, es una medida de distancia, por lo que es la distancia mínima entre dos puntos que permite distinguirlos como tales, en lugar de como un único objeto. La distancia resoluble es directamente proporcional a la longitud de onda de la luz empleada e inversamente proporcional a la apertura numérica (AN: $n \sin \alpha$).

$$R = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

Fórmula de Abbe

Número de campo

Es el diámetro de la imagen observada a través del ocular, expresado en milímetros.

Profundidad de foco

Al enfocar un objeto por medio del microscopio, hay un margen finito por encima y por debajo de este objeto, en el cual se visualizan nítidamente otros objetos. La profundidad



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	67/293

de foco es el espesor de la muestra que es posible tener enfocado por completo. La profundidad de foco es inversamente proporcional a la abertura del diafragma y a la distancia de enfoque.

Contraste

Es el grado de diferencia entre el tono, el brillo o el color del objeto estudiado y del medio que lo rodea. Si una muestra tiene poco contraste para mejorarlo, se debe disminuir el cono de iluminación procedente del condensador. El cono de iluminación se controla mediante el diafragma de apertura. El contraste puede aumentarse mediante procedimientos de tinción.

Partes del microscopio y sus funciones

Las partes del microscopio se agrupan en cuatro sistemas: sistema óptico, sistema de iluminación, sistema de soporte y sistema de ajuste.

1. Los oculares por lo general están provistos con lentes 10x (el grado de amplificación es 10 veces). Las lentes magnifican la imagen intermedia formada por la lente objetivo en el tubo óptico, también limitan el área de visibilidad. La mayoría de los microscopios tiene un ocular fijo y uno ajustable. Ambos deben utilizarse de modo correcto para un enfoque óptimo. Los oculares son exclusivos de cada marca y modelo de microscopio por lo que no deben intercambiarse.



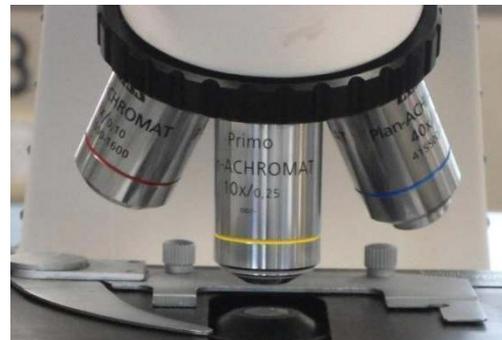


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	68/293

- El control interpupilar se utiliza para ajustar la separación lateral de los oculares para cada individuo. Cuando se ajusta de manera adecuada, el observador debe poder enfocar con ambos ojos con comodidad y visualizar una imagen nítida.
- El tubo óptico conecta los oculares a la lente objetivo. En esta parte se forma la imagen intermedia.
- El cuello o brazo proporciona un sitio estructural de adherencia al porta-objetivos (revólver).
- El pie es el apoyo vertical principal del microscopio. La platina, junto con el condensador y la base, están apoyados sobre el pie.
- El revólver sostiene los objetivos y permite la rotación fácil de una lente objetivo a otra. La distancia de trabajo entre los objetivos y el portaobjeto varía con la marca y el modelo del microscopio.
- Por lo general hay tres o cuatro lentes objetivos cada uno con un poder de aumento específico. En el cilindro de cada lente objetivo está grabado el poder de amplificación y la apertura numérica (AN). La AN se relaciona con el ángulo de luz recolectado por el objetivo e indica la capacidad de apertura a la luz de la lente, recordemos que cuanto mayor es la AN, el límite de resolución aumenta.



- La platina permite el apoyo del portaobjeto que contiene el preparado a observar. Un conjunto de resortes asegura el portaobjeto a la platina.
- Los controles de foco (o ajustes) pueden estar incorporados en una perilla o como dos controles separados. Cuando se utiliza una perilla, movida en una sola dirección, se activa el control grueso: la inversión de la perilla activa el control fino. Un intervalo de la graduación de gire es equivalente a 2 μm . Muchos microscopios están provistos con dos ajustes separados: el grueso y el fino (tornillo



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	69/293

macrométrico y tornillo micrométrico). El orden de uso siempre es el mismo: primero el ajuste grueso y luego el fino.

10. El condensador, que presenta varias lentes reunidas en una unidad, puede estar montado de modo permanente o ser ajustable en sentido vertical con un mecanismo de engranaje. Capta, organiza y dirige la luz de la muestra. Adherido al condensador y en su parte inferior se encuentra la abertura del diafragma, un iris ajustable que contiene varias capas que controlan el ángulo y la cantidad de luz enviada a través de la muestra.
11. La palanca del control gira la lente ubicada arriba del condensador que esta fuera de posición.
12. Los controles de la platina la mueven en ejes X o Y.
13. El diafragma de campo está ubicado debajo del condensador, dentro de la base. Cuando está abierto, permite que un círculo de luz de tamaño máximo ilumine el portaobjeto. El vidrio por encima del diafragma del campo lo protege del polvo y del daño mecánico.
14. Los microscopios utilizan focos monocromáticos halógenos de tungsteno como fuente luminosa. Hay dos tipos de iluminación de campo brillante: 1) iluminación crítica en la que la fuente luminosa está representada en la muestra, lo que genera un brillo incrementado pero desigual y 2) el sistema Koehler en el que la fuente luminosa está representada en el diafragma de apertura del condensador. El resultado final de la iluminación de Koehler es un campo brillante distribuido de manera uniforme a través de la muestra.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	70/293

Conservación del microscopio

1. Transportar el microscopio sujetándolo fuertemente con las dos manos, para evitar el riesgo de que se caiga, colocar una mano debajo de la base como apoyo y con la otra sujetarlo con firmeza alrededor del brazo. Tener cuidado de no dejar caer los oculares.
2. Cuando no está en uso, el microscopio siempre debe de estar cubierto con una funda.
3. Antes de su uso, inspeccionar sus elementos. Si se encuentra polvo, quitarlo con una jeringa con aire, un cepillo de camello o una tela suave que no deje pelusas. Si se utiliza el papel para lente directamente en una lente sucia, sin el retiro del polvo, se puede rayar la lente.
4. Evitar colocar los dedos sobre la superficie de la lente. Las huellas digitales afectan el contraste y la resolución de la imagen. Para limpiar huellas dactilares y manchas de grasa depositadas sobre las lentes se puede usar un algodón humedecido ligeramente en alcohol puro.
5. Para limpiar los lentes, no se recomienda el uso de xilol, debido a que contiene compuesto carcinógeno (benceno) y porque es un agente de limpieza deficiente que deja una película oleosa en la lente. Para limpiar los objetivos puede utilizarse hidróxido de amonio o alcohol isopropílico al 70% en forma escasa sobre un algodón en un palillo aplicador. El alcohol debe mantenerse alejado de las lentes ya que puede disolver el cemento y agregarse a la parte posterior de la lente.
6. Cuando se agrega aceite fresco al aceite residual en el objetivo 100x, puede haber pérdida de contraste. Primero, debe eliminarse todo el aceite residual.
7. No utilizar agua para limpiar las lentes. La respiración condensada del operador en la superficie de la lente puede ser útil en la limpieza de las lentes ligeramente sucias.
8. Limpiar los otros componentes del aparato, que no son las lentes, con un paño



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	71/293

humedecido en agua destilada.

Material y Equipo

- Microscopio
- Papel seda
- Laminillas de muestra

Método

Manejo del microscopio

1. Accionando el revólver se coloca el objetivo adecuado. Se sabe que el objetivo está adecuadamente colocado cuando se percibe un audible clic. Se empieza enfocando con un objetivo de poco aumento y luego se pasa a otro de mayor aumento, al hacerlo, basta con mover ligeramente el micrométrico para enfocar la muestra con este último objetivo.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	72/293

2 Bajar completamente la platina y colocar la preparación sobre ella, teniendo cuidado de no ponerla al revés. Accionando los tornillos reguladores de la platina, desplazar la preparación hasta situar la muestra sometida a estudio sobre el orificio de paso de luz.



3 Encender la fuente de luz y regularla a una intensidad media para evitar que se sobrecaliente.



4. Situar el condensador:

- Bajo, si se utiliza un objetivo de poco poder de ampliación (10x).
- En la mitad de su recorrido, si se emplea un objetivo de mayor poder de amplificación (40x).
- Alto, si usa un objetivo de inmersión (100x).
- También conviene ascender el condensador si se observa una muestra teñida y descender si se estudia una muestra en fresco.





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	73/293

5. Mirando por fuera de los oculares, hacer ascender la platina con el tornillo macrométrico hasta que el objetivo esté muy cercano a la preparación, cuando se utiliza un objetivo de poco poder de ampliación el aparato tiene un tope que impide un acercamiento excesivo de aquel a la preparación. En cambio, el objetivo de inmersión no tiene tope para que pueda estar lo más cercano a la muestra por lo que antes de colocarlo es necesario cuando ya se va a observar con el objetivo depositar una pequeña gota de aceite sobre la preparación moviendo el revólver a la posición intermedia. Después dejarlo caer suavemente en la preparación previamente enfocada con un objetivo de menor aumento.

6. Ajustar la distancia interpupilar.



7. Moviendo el tornillo macrométrico, hacer descender lentamente la platina hasta que se vea, mirando por los oculares, la imagen de la muestra. Cuando se use el objetivo de inmersión, nunca debe separarse de la preparación como para perder el contacto con el aceite.

8. Afinar el enfoque con el tornillo micrométrico. Desplazando horizontalmente la platina con movimientos en zig-zag, recorrer con el objetivo toda la preparación, para realizar una correcta observación de la misma. Durante la observación, mover continuamente el tornillo micrométrico, para enfocar sucesivamente todos los planos de la muestra.





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	74/293

9. Una vez finalizada la observación, hacer descender totalmente la platina y retirar la preparación, limpiar los objetivos y oculares.
10. Apagar la luz de la fuente.

Resultados

- Realizar un diagrama de flujo que muestre los pasos a seguir cuando se enfoca una muestra para la observación al microscopio.

Cuestionario

1. ¿Cómo se dividen los sistemas que componen un microscopio?
2. ¿Menciona que tipo de muestras puedes observar en un microscopio óptico?
3. ¿Qué función tiene el tornillo macrométrico y micrométrico?
4. ¿Qué entiende por límite de resolución? ¿Qué factores influyen para determinarlo?
5. ¿Cuáles son las características de un microscopio de contraste de fases y un microscopio electrónico?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	75/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2008.
2. Anne B. Anne E. Lesak. Libro de laboratorio de Anatomía y fisiología, Barcelona: Paidotribo; 2002.
3. Rodak F. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas, 2ª ed. Buenos aires, Argentina: Médica Panamericana; 2005.
4. Rubio F. Espinosa B. Carrasco M. Fundamentos y técnicas de análisis hematológico y citológico. España: Ediciones Parainfo S.A.; 2004.
5. Wayne M. Becker J. Kleinsmith J. El mundo de la célula, 6ª ed. Madrid: Pearson PLC; 2007.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	76/293

ESTRUCTURA CELULAR

Objetivos

- ✓ Analizar las características específicas de las células eucariotas que le permiten diferenciarla de las procariotas.
- ✓ Describir la estructura de la célula y sus organelos.
- ✓ Realizar preparaciones sencillas de organismos eucariotas y procariotas.
- ✓ Revisar los fundamentos de distintos tipos de tinciones.
- ✓ Observar e identificar en el microscopio algunos componentes celulares.

Antecedentes académicos

- ✓ Teoría celular.
- ✓ Estructura celular de los organismos eucariotas y procariotas.
- ✓ Función de los organelos celulares.
- ✓ Tipos de tinciones usadas frecuentemente en la microscopía óptica.
- ✓ Fundamento y manejo del microscopio.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	77/293

Introducción

La historia de la biología celular comenzó hace más de 300 años cuando algunos científicos europeos comenzaron a enfocar en sus microscopios diversos materiales biológicos, desde la corteza de los árboles hasta el espermatozoide humano. Uno de esos científicos fue Robert Hooke que en 1665, empleó un microscopio construido por él mismo para examinar secciones finas de corcho. Observó una red de pequeños compartimientos en forma de caja que le recordaron a un panal, Hooke denominó a esos pequeños compartimientos *cellulae*, término que en latín significa pequeñas habitaciones del cual deriva el término actual de célula.

En el desarrollo de la teoría celular se distinguen tres periodos: el primero se centró en establecer la estructura de la célula y está muy ligado a la invención y mejoramiento de los microscopios; el segundo se caracteriza por el desarrollo del trabajo experimental para ligar las estructuras celulares con su función y el tercero se refiere a la descripción de las funciones de los elementos celulares a nivel molecular.

La célula es la unidad de la vida; los organismos están formados por células, ya sea una en los organismos unicelulares o muchas especializadas en los organismos multicelulares. Las células se distinguen por realizar dos procesos fundamentales para la vida: transferir información a otras células hijas o vecinas y poseer una maquinaria para la transducción de energía, la cual transforma la energía de una forma a otra, la almacena y la distribuye para su utilización.

La teoría celular moderna apoya cuatro postulados:

- Todos los organismos están formados por células.
- Las reacciones químicas de los seres vivos, incluyendo los procesos de obtención de energía y las reacciones de biosíntesis, tienen lugar en el interior de las células.
- Las células provienen de otras células.
- Las células contienen la información hereditaria de los seres que forman y esta información pasa de las células madres a las hijas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	78/293

Las células no se ven a simple vista; su tamaño se encuentra por lo general en el rango de micras. Para ver las unidades más pequeñas de la vida se debe utilizar el microscopio y al comparar células procariotas y eucariotas se observan diferencias esenciales. Las procariotas, como las bacterias, miden entre 1 a 10 μm , por lo que son mucho más pequeñas que las típicas eucariotas (aproximadamente 10-100 μm) y con ello su volumen es unas mil veces menor. Mientras que el interior de las células procariotas está relativamente desestructurado pues no cuenta con núcleo ni con unidades funcionales claramente delimitadas, la célula eucariota presenta una compartimentación clara en la que domina el núcleo.

Células eucariotas

Las células eucariotas contienen junto con su membrana plasmática, un sistema extenso de membranas intracelulares que delimitan compartimentos que desempeñan funciones especializadas, llamados organelos. El ADN está separado del citoplasma por una envoltura membranal doble que delimita el núcleo.

Hongos

El aspecto de los hongos resulta familiar, pues los hemos visto de forma macroscópica como alimentos o creciendo sobre los limones, las naranjas, los quesos (fig. 1), el pan y la mermelada viejos, así como en las cortinas plásticas de los baños; con apariencia de filamentos (comúnmente conocidos como lama). Aunque su tamaño y morfología presentan mucha variedad, todos los hongos son eucariotas, por tanto, sus células poseen al menos un núcleo, envoltura nuclear y demás organelos.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	79/293

Se reconocen tres grandes grupos de hongos; los mohos u hongos filamentosos (pluricelulares), las setas u hongos de masa también pluricelulares, y las levaduras, generalmente unicelulares.



Fig. 1 Queso contaminado con hongos, se observa el crecimiento de las colonias de hongos de color verde y blanco

Debido a sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y ecológicas; en la actualidad los hongos se ubican en su propio reino llamado fungi. Este reino está compuesto por organismos heterótrofos, quimioorganótrofos, es decir que requieren de compuestos orgánicos para su nutrición, por lo que secretan enzimas que descomponen una gran variedad de sustratos. Cuando se alimentan de materia orgánica muerta se conocen como saprofitos y generalmente no causan enfermedades. Los hongos saprofitos son importantes en las fermentaciones industriales, por ejemplo, en aplicaciones biotecnológicas en la producción de metabolitos secundarios la penicilina y fármacos inmunosupresores (como la ciclosporina) o en la industria láctea en la producción de quesos.

Las levaduras son hongos unicelulares, varían considerablemente en cuanto a tamaño oscilando entre 1 y 5 μm de ancho y 5 a 30 μm de longitud, cada especie tiene una forma característica. Las levaduras no poseen flagelos ni ningún otro tipo de órgano de locomoción, las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y algunos géneros pueden hacerlo de forma sexual formando células especializadas llamadas ascosporas.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	80/293

Los hongos pluricelulares (mohos) están constituidos por filamentos tubulares llamados hifas, cada hifa tiene aproximadamente 5 a 10 μm de anchura y 1 μm de diámetro. En el interior y a lo largo de cada hifa existe un citoplasma común para toda su extensión. La hifa es la unidad estructural y funcional del hongo, según la clase de hongo, la hifa puede ser no septada, septada, septada uninucleada o septada polinucleada.

En los hongos pluricelulares, la reproducción asexual es la más común y no hay contacto de núcleos; puede ser por fisión (separación simétrica), gemación (separación asimétrica) o esporas asexuales. Los hongos que sólo presentan este tipo de reproducción son llamados hongos imperfectos. La reproducción sexual se caracteriza por la fusión de los núcleos que da origen a un cigote. Este tipo de reproducción se relaciona con la evolución y de ella se originan los hongos perfectos. Existen varios tipos de esporas sexuales: zigosporas, ascosporas, basidiosporas y oosporas (fig. 2).

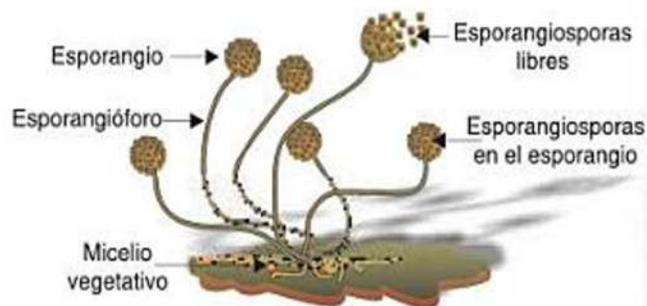


Fig. 2 Esquema general de la reproducción asexual del hongo *Rhizopus nigricans* donde se diferencian claramente cada una de las partes que lo conforman

Protozoarios

Los protozoarios son organismos eucariotas predominantemente unicelulares y de tamaño microscópico. Un protozoario típico es unicelular, sin pared celular, heterótrofo, móvil y capaz de ingerir partículas de alimento. La mayoría de los protozoarios poseen un solo núcleo, pero algunos como los ciliados tienen dos núcleos diferentes. Existen, además, algunos de ellos que pueden presentar dos núcleos iguales y aun otros que

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	81/293

pueden ser multinucleados. El citoplasma de los protozoarios está constituido por dos partes bien diferenciadas, conocidas como el endoplasma y el ectoplasma; en el agua encharcada es muy común encontrar protozoarios del género *Paramecium* (Fig. 3).

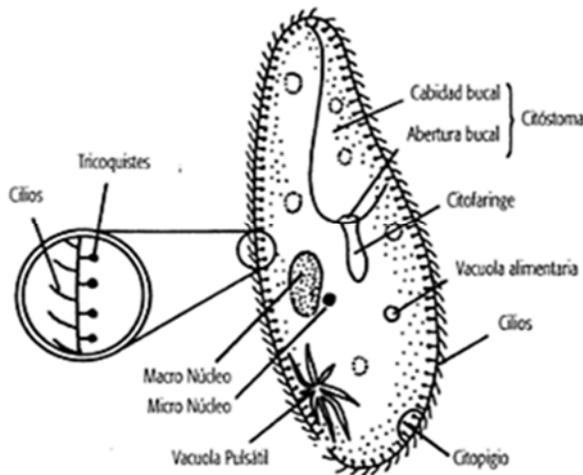


Fig. 3 Esquema de un paramecio y sus principales estructuras.

Células vegetales

Las células vegetales son eucariotas, se caracterizan por tener pared celular, además de la membrana celular, ser autótrofas gracias a la presencia de cloroplastos para realizar la fotosíntesis y poseer una vacuola interna para regular su tamaño contenido por la pared celular.

Células epiteliales

Estas células forman un tejido altamente especializado presente en muchos órganos. Presentan características estructurales distintivas como son la disposición en capas cohesivas, las uniones especializadas entre una y otra célula, la secreción de diversas sustancias y la diferenciación baso lateral y superficial, gracias a las cuales realizan funciones diversas. Puesto que las células epiteliales se encuentran muy juntas, con



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	82/293

sustancia intracelular escasa, o nula, forman láminas continuas que no contienen vasos sanguíneos.

Células sanguíneas

Las células de la sangre que podemos distinguir en un frotis son los eritrocitos (glóbulos rojos), los leucocitos (glóbulos blancos) y los trombocitos (plaquetas). Los eritrocitos se ocupan del transporte sanguíneo de los gases. Entre los leucocitos se encuentran las diferentes formas de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los monocitos y los linfocitos, todos ellos con funciones en el sistema inmunológico de defensa. En cuanto a sus funciones los granulocitos neutrófilos, los monocitos y los macrófagos derivados de los monocitos son células fagocitarias (fagocitos) que pueden captar los agentes patógenos invasores y degradarlos. Los linfocitos pueden ser de dos tipos, los B producen anticuerpos mientras que los linfocitos T dirigen la respuesta inmune celular, destruyen células infectadas por virus y células tumorales. Los granulocitos eosinófilos y basófilos tienen funciones especiales en la defensa contra parásitos y en las alergias. Los trombocitos o plaquetas son restos celulares derivados de grandes células precursoras producidas en la médula ósea, los megacariocitos, cuya función principal es promover la hemostasia.

Células procariotas

Etimológicamente procariota significa con núcleo primitivo, de hecho, el ADN de las células procariotas tiene forma circular y nunca está separado del citoplasma por una membrana.

Las células procariotas difieren de las eucariotas en:

- La presencia de una pared constituida por peptidoglucanos o lipopolisacáridos
- Su tamaño
- Su molécula de ADN libre y circular, siempre en contacto con el citoplasma, desprovista de nucleosoma; sin embargo, este ADN está asociado a una



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	83/293

histona denominada HU, que cumple varias funciones y en particular la de reparar el ADN.

- La ausencia de mitocondrias (la cadena respiratoria se localiza en la membrana plasmática de la bacteria) y de cualquier otro organelo limitado por membrana (Golgi, RE, lisosomas y peroxisomas, entre otros).
- La ausencia de mitosis y de meiosis (los procariontes se reproducen asexualmente por fisión binaria o gemación).
- Sus ribosomas se parecen a los de mitocondrias y cloroplastos, para cuya síntesis no es necesaria la presencia del nucléolo.

Bacterias

Las bacterias son un ejemplo de organismos procariontes. El tamaño de las bacterias está comprendido entre 1 a 10 μ m, las bacterias poseen una pared celular de composición diversa, poseen un citoplasma que soporta al material genético, membranas internas, ribosomas y diversas inclusiones que pueden ser de glucógeno, azufre, polihidroxicarbohidratos, polifosfatos o vacuolas de gas en aquellas fotosintéticas. También pueden poseer pili, que son expansiones cortas y rígidas que se adhieren a la membrana plasmática; uno o varios flagelos, que son expansiones motoras del citoplasma. Las bacterias se reproducen por gemación o por fisión, lo que en algunos géneros da origen a agrupaciones características, al quedar las células unidas de determinada forma. No obstante, cada célula es fisiológicamente independiente. En cuanto a su morfología pueden ser cocos o bacilos.

Cocos

Según los planos del espacio en los que se produzca la división y la incapacidad de las células para separarse completamente; pueden originarse diplococos cuando la división se produce en un sólo plano quedando dos elementos; estreptococos, si la división tiene lugar en un plano, pero en forma sucesiva originando cadenas. Si la división se produce en dos planos, el resultado es una tétrada y cuando la división afecta tres planos en forma



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	84/293

ordenada, se forma una sarcina, la forma irregular conduce a un aspecto comparable con un racimo de uvas o estafilococo. Si los cocos son de tamaño más pequeño y sin agrupación especial, son llamados micrococos.

Bacilos

Las bacterias de formas alargadas reciben el nombre de bacilos (del latín bacillus; bastón); cuando estos se visualizan individualmente, pueden tener extremos redondeados y un diámetro menor bien uniforme; otros géneros muestran sus extremos afilados en forma de huso y se denominan fusiformes. Algunos bacilos poseen una de sus terminaciones abultada en forma de clava o maza. Por último ciertos bacilos parecen cortados a pico o en forma recta. Hay un grupo de bacilos que durante muchos años se consideraron hongos, porque se ven como filamentos y con otras ramificaciones, son los bacilos filamentosos. Los bacilos también pueden quedar agrupados en forma característica; existen agrupaciones en cadenas, estreptobacilos, y cuando los bacilos se presentan unidos uno al lado del otro según su eje mayor, se dice que están en empalizada. Otra forma es la que se origina cuando quedan unidos por algún punto, lo que produce formaciones diferentes (Fig. 4). Entre los cocos y los bacilos hay microorganismos de apariencia intermedia por su tamaño y morfología que se conocen como cocobacilos.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	85/293

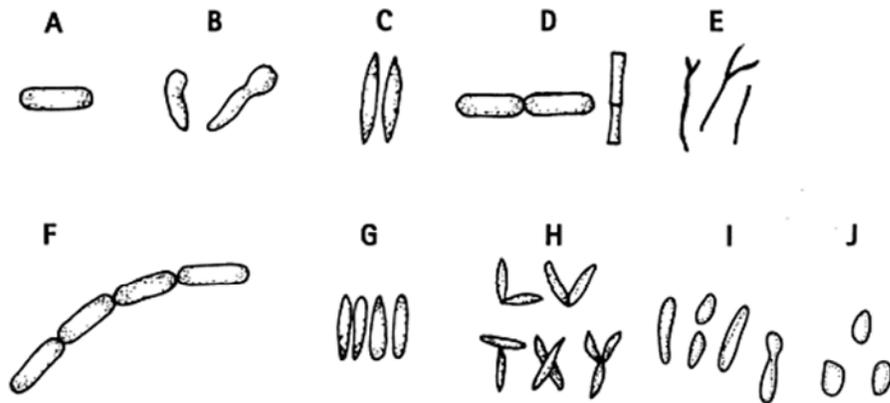


Fig. 4. Formas y agrupaciones de los bacilos. A. Bacilo común B. Claviforme C. Fusiforme D. Cortado a pico E. Filamentoso F. Agrupación en Estreptobacilos G. Agrupación empalizada H. Agrupación en letras I. Pleomórficos J. Cocobacilos.

Morfologías bacterianas prevalentes en la cavidad bucal

Las morfologías bacterianas que prevalecen en la cavidad bucal de las personas sanas consisten en diversos tipos de estreptococos, variados bacilos (especialmente del tipo filamentoso) y diplococos. Cuando cambian las condiciones locales como una disminución de la tensión de oxígeno o el aumento de ciertas sustancias, es posible visualizar casi todos los morfotipos de interés médico.

- **Tinciones**

La tinción es un conjunto de procesos que conducen a la coloración de las estructuras que componen las células, tiene por objeto aumentar el contraste entre esas estructuras y el medio que las rodea permitiendo que las células sean visualizadas microscópicamente con mayor facilidad.

Tipos de tinción



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	86/293

Las tinciones vitales son aquellas que se realizan en células que están vivas sin matarlas, se coloca el colorante sobre un organismo vivo. Ejemplos de colorantes vitales son el verde Jano y el azul de metileno.

Las tinciones supravitales son aquellas que se realizan sobre células o tejidos vivos, pero que están aislados del organismo del que proceden.

Las tinciones no vitales se realizan sobre células muertas por fijación que tiene por objeto el conservar inalterada su estructura y mantener su adhesión al portaobjetos. La fijación puede realizarse mediante calor, aunque habitualmente se realiza con etanol, metanol, glutaraldehído o paraformaldehído.

Tinciones tradicionales y especiales

Tradicionalmente las tinciones se han logrado mediante el uso de colorantes que con frecuencia derivan de la anilina, estos colorantes se reúnen en cuatro grupos:

- Colorantes ácidos: tienen una especial afinidad por las estructuras alcalinas de las células, como por ejemplo la hemoglobina, el más usual de ellos es la eosina.
- Colorantes básicos: tienen una especial afinidad por las estructuras ácidas de las células, como por ejemplo los ácidos nucleicos.
- Colorantes neutros: son sales de un ácido y de una base coloreada. Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro. Por ejemplo el eosinato de azul de metileno.
- Colorantes indiferentes: son los que no tienen afinidad por estructuras ácidas o básicas. Son insolubles en agua y tiñen aquellas sustancias que tienen un poder de disolución superior al del líquido empleado para preparar la solución colorante. Uno de ellos es el Sudan III empleado para teñir grasas.

También hay combinaciones de colorantes que dan lugar a tinciones policromas. Los colorantes de tipo Romanowsky son mezclas que constan de un colorante ácido (eosina) y de colorantes básicos (tiacinas).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	87/293

- Tinciones fluorescentes, emplean colorantes (fluorocromos) que se fijan a las células y que cuando son estimulados por una luz ultravioleta, emiten una radiación visible de un color característico, los fluorocromos más utilizados en esta clase de tinciones son el naranja de acridina y el rojo neutro.
- Tinciones citoquímicas, demuestran la presencia, más o menos abundante, o la ausencia de determinadas sustancias, localizadas en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los leucocitos.

Denominación de las estructuras coloreadas

Las estructuras celulares pueden nombrarse de las siguientes formas:

- Estructuras acidófilas: son aquellas que fijan colorantes de naturaleza ácida, si el colorante ácido que captan es la eosina, se dice que son eosinófilas y adquieren un color rosado.
- Estructuras basófilas: son aquellas que fijan colorantes de naturaleza alcalina, adquieren un color azulado. Si se tiñen de lila o púrpura con colorantes de tipo azul, se llaman azurófilas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	88/293

Material y Equipo

- Microscopio óptico
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asas bacteriológicas y micológicas
- Mechero
- Papel seda
- Lanceta estéril
- Hisopo estéril
- Alcohol al 70%

Material Biológico

- Cepas Bacterianas
- Material orgánico contaminado que contenga hongos (fruta, queso, pan, etc.)
- Planta acuática *Elodea sp*
- Agua de pecera, agua estancada o de un florero



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	89/293

Reactivos

- Colorante de Giemsa
- Colorantes de Gram
 - Cristal violeta:
 - Solución A. cristal violeta 10 g y alcohol de 95% 100 mL.
 - Solución B. oxalato de amonio: 10 g y agua destilada 1000 mL.
 - Solución C. solución A 100 mL + solución B 800 mL.
 - Yodo para Gram (Lugol): disolver 1 g de yoduro de potasio en 70 mL de agua destilada, agregar 0.5 g de yodo y completar hasta 100 mL. Agitar y disolver completamente.
 - Alcohol- Acetona: acetona 30 mL+alcohol de 95% 70 mL.
 - Safranina: Safranina 1.0 g en 100 mL de agua destilada.
- Azul de metileno
- Colorante de Wright
- Metanol
- Agua destilada
- Aceite de inmersión

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	90/293

Método

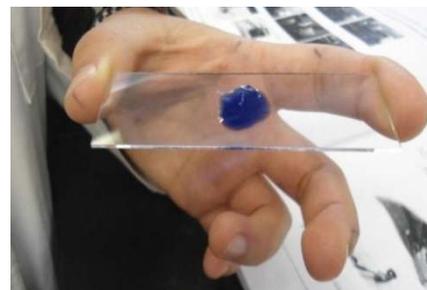
Realizar las siguientes preparaciones y observaciones utilizando la técnica de enfoque del microscopio descrita en la práctica del Microscopio óptico.

1. Levaduras

Colocar una pequeña porción de levaduras en un tubo de ensaye y adicionar agua. Tomar una gota y colocarla en un portaobjetos.



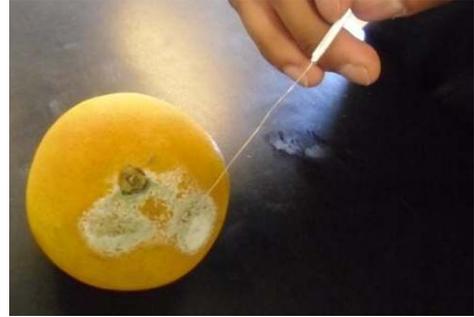
Colocar una gota de azul de metileno y colocar el cubreobjetos. Realizar la observación al microscopio con objetivos 10x y 40x.



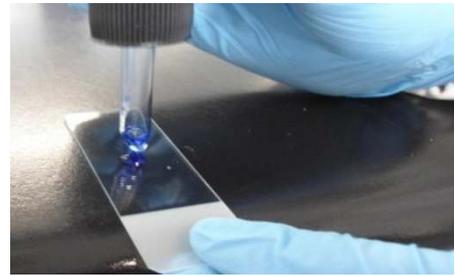
Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	91/293

2. Hongos

Colocar en un portaobjetos una gota de agua, tomar cuidadosamente con el asa bacteriológica poco de los hongos que se encuentran sobre los alimentos contaminados y colocarlos sobre la gota de agua.



Colocar una gota de azul de metileno y el cubreobjetos. Realizar la observación al microscopio con los objetivos 10x y 40x.



Planta *Elodea sp*

En un portaobjetos colocar una gota de agua y una hoja de la planta, cubrir con un cubreobjetos.





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	92/293

Observar al microscopio con los objetivos 10x y 40x.

Identificar las estructuras: pared celular, membrana plasmática, cloroplastos.

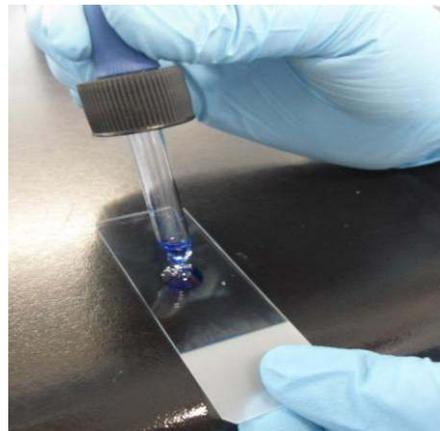


4. Células de descamación

En un portaobjetos, colocar una gota de agua y utilizando un hisopo frotar el interior de la mejilla, mezclar la muestra tomada con la gota de agua.



Adicionar una gota de azul de metileno y cubrir con un cubreobjetos. Observar la muestra al microscopio objetivo 10x y 40x.





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	93/293

5. Protozoarios

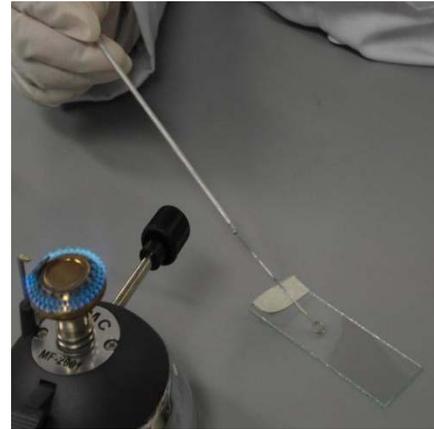
En un portaobjetos, colocar una gota de agua estancada. Colocar un cubreobjetos.

Observar la muestra al microscopio, objetivos 10x y 40x.



6. Bacterias (Tinción de Gram)

Realizar un frotis de las distintas cepas bacterianas siguiendo las instrucciones del asesor. Dejar secar y fijar al calor.



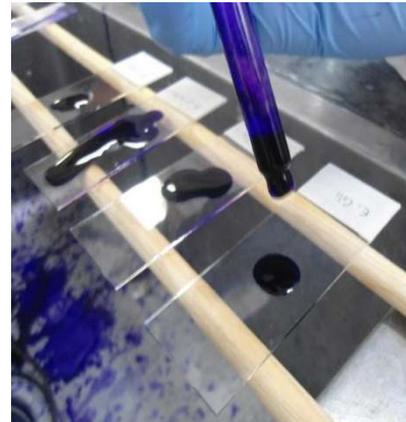


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I

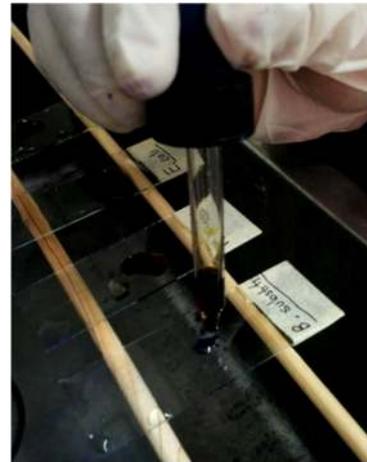


Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	94/293

Teñir el frotis agregando cristal violeta durante 1 minuto. Enjuagar con agua.



Agregar lugol y dejarlo durante 1 minuto. Enjuagar con agua.



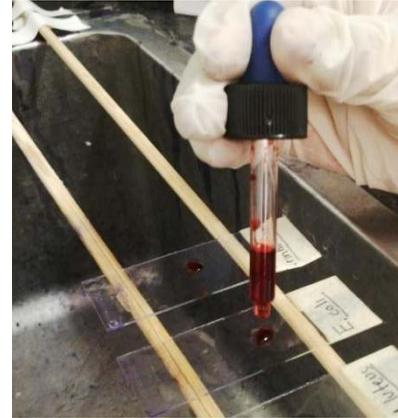
Enjuagar con alcohol-acetona para quitar exceso de colorante durante unos segundos.





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	95/293

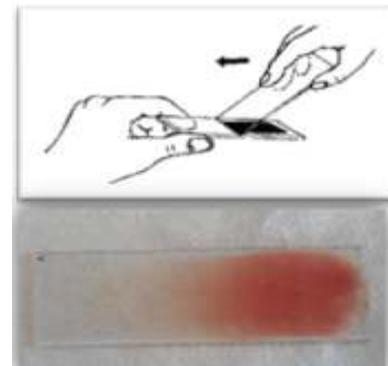
Adicionar el colorante safranina y dejarlo actuar durante 1 minuto, enjuagar con agua y dejar secar el frotis. Realizar la observación de los frotis utilizando el objetivo 100x, utilizar aceite de inmersión.



7. Células sanguíneas

Tomar una muestra de sangre mediante la punción de la yema del dedo con una lanceta.

Realizar un frotis sanguíneo con la ayuda de otro portaobjetos, dejando una fina capa extendida en el portaobjetos.



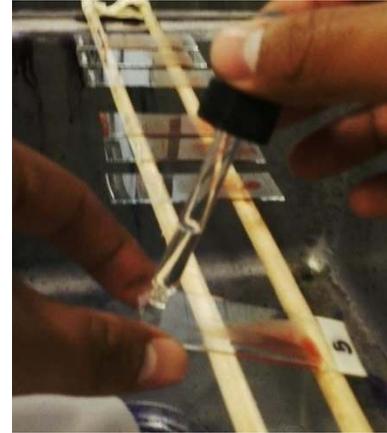


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I

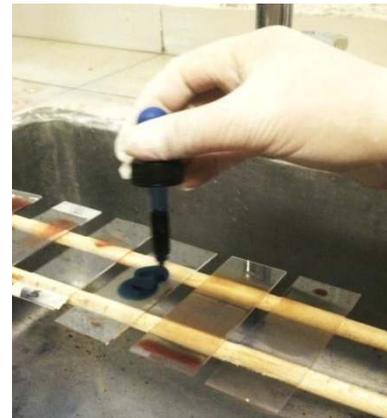


Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	96/293

Dejar secar la sangre y fijar con metanol durante 6 minutos



Teñir con colorante Giemsa durante 15 minutos (dilución 39:4 con agua), enjuagar con agua.



Observar la muestra al microscopio con el objetivo 100x, utilizar aceite de inmersión.





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	97/293

Resultados

Realizar los esquemas de las observaciones realizadas, indicando el aumento del objetivo utilizado, el tipo de tinción y las estructuras que se observaron. NO DIBUJAR EL CAMPO VISUAL DEL MICROSCOPIO. Comparar con referencias bibliográficas lo observado.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las diferencias entre células eucariotas y procariotas?
2. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram y para qué sirve cada uno de los reactivos que se utilizan?
3. ¿Qué estructuras celulares tiñe el azul de metileno?
4. ¿Cómo se realiza un frotis sanguíneo?
5. ¿Cuáles son las estructuras de los hongos que se pueden observar en el microscopio?
6. ¿Cómo se diferencian los distintos tipos de células sanguíneas en un frotis?
7. Menciona 5 ejemplos de células eucariotas, y 5 ejemplos de células procariotas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	98/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2008.
2. Campal F. Espinosa B. Carrasco M. Fundamentos y Técnicas de Análisis Hematológicos y Citológicos. Madrid: Parainfo S.A.; 2004.
3. García V. Introducción a la microbiología. 2ª ed. Costa Rica: EUNED; 2004.
4. Gustavo L. Biología celular y molecular. 2ª ed. Colombia: Universidad de la Sabana; 2010.
5. Koolman J. Bioquímica: Texto y atlas, 13ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2004.
6. Maillet M. Biología Celular. México: Masson S.A.; 2002.
7. Navarro C. Cirugía oral. España: Aran; 2008.
8. Negrori M. Microbiología estomatología: fundamentos y guía práctica. 2ª ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2009.
9. Thibodeau P. Estructura y función del cuerpo humano. 13ª ed. Barcelona: Elsevier mosby; 2008.
10. Villafañe H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Colombia: Universidad de Antioquina; 2008.
11. Wayne M. Becker J. Kleinsmith J. El mundo de la célula, 6ª ed. Madrid: Pearson PLC; 2007.
12. Werner M. Bioquímica fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Barcelona: Reverté; 2008.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	99/293

PRINCIPALES CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA MATERIA VIVA

Objetivos

- ✓ Analizar la importancia del agua como el constituyente más abundante de la materia viva.
- ✓ Cuantificar el contenido de minerales en una muestra biológica.
- ✓ Identificar lípidos y proteínas de diferentes tejidos de la rata.
- ✓ Comparar los contenidos de proteínas, lípidos y humedad de diferentes tejidos de la rata.
- ✓ Aprender el manejo de la rata como animal de experimentación.

Antecedentes académicos

- ✓ La importancia del agua en los seres vivos.
- ✓ Los minerales y sus funciones en los seres vivos.
- ✓ Composición, propiedades, función y distribución de las Biomoléculas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	100/293

Introducción

Los principales constituyentes de la materia viva son agua, proteínas, lípidos, minerales, ácidos nucleicos y carbohidratos. El componente más abundante de los seres vivos es el agua con un promedio en el peso húmedo de 60% y su determinación permite comparar los resultados obtenidos con base a peso seco de cualquier muestra. El agua es el disolvente de la mayoría de los compuestos biológicos y sin ella no podría existir la vida. Después del agua, los componentes de la materia viva más abundantes son las proteínas presentes en promedio del 17% del peso de un organismo.

Las proteínas proporcionan soporte para muchas estructuras y son clave en el metabolismo, haciendo funciones de transporte, señalización, y comunicación, entre otras. Son las unidades estructurales básicas de la arquitectura celular que dan a la célula y organelos su forma y aspecto. Además, catalizan la mayoría de las reacciones químicas del organismo, las cuales comprenden tanto los procesos de síntesis como los de degradación de las moléculas orgánicas.

Con similar abundancia en los seres vivos que las proteínas (15%), los lípidos son biomoléculas cuya característica en común es la de ser insolubles en agua y solubles en disolventes no polares. Los más abundantes y más ampliamente distribuidos son los triglicéridos. Es común clasificarlos en lípidos complejos o saponificables (acilglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras) y simples o insaponificables (terpenos, esteroides y prostaglandinas). Además de ser reserva de energía almacenados como grasa, proporcionan protección como ceras, conforman la estructura básica de las membranas biológicas y poseen actividades importantes en el metabolismo como segundos mensajeros.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	101/293

En menor cantidad (5%) pero sumamente importantes son los minerales como Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} . Las funciones de los minerales en el cuerpo son muy variadas; por ejemplo, la formación de la sustancia cristalina de los huesos, la participación como cofactores de muchas enzimas y la generación de corriente eléctrica en los nervios y células musculares. La mayoría de estas funciones dependen del hecho de ser estos iones, partículas relativamente pequeñas y de una gran carga eléctrica.

Los ácidos nucleicos presentes en los organismos vivos (2% en promedio) son el ribonucleico (ARN) y el desoxirribonucleico (ADN). Entre sus funciones biológicas se encuentran el almacenamiento, replicación, recombinación y transmisión de información genética.

Aunque son los menos abundantes (1%), los carbohidratos son la principal sustancia alimenticia para la mayoría de los organismos. Se encargan de proporcionar la mayor parte de la energía y el carbono necesarios para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros carbohidratos.

Material y Equipo

- Estuche de disección
- Tabla de disección
- Mechero
- Pinzas para crisol
- Charolas de papel aluminio de 2 X 2 cm
- Desecador
- Soporte universal y anillo de hierro
- Mortero con pistilo
- Tubos de 13 X 100 mm y 16 X 100 mm
- Centrifuga
- Vasos de precipitados de 50 mL



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	102/293

Reactivos

- Cloroformo
- Solución salina isotónica de NaCl al 0.9%
- Etanol 96°
- Peróxido de hidrógeno
- Metanol

Material Biológico

- Rata Wistar de peso aproximado de 200 g.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	103/293

Método

1. Preparación de la muestra.

- a. Sacrificar la rata Wistar de 200 g de peso mínimo, en la cámara de CO₂
- b. Colocar la rata muerta en la tabla de disección y amarrar cada una de sus patas a las esquinas correspondientes de la tabla de disección (Fig.1A).
- c. Con la ayuda del estuche de disección; disectar los siguientes órganos: hígado, cerebro, corazón, riñón y bazo (Fig.1B).
- d. De cada órgano tomar tres porciones:
 - i. Dos porciones, de aproximadamente 0.3 g se colocarán en charolas de papel aluminio rotuladas y llevadas a peso constante, para determinar humedad.
 - ii. Una porción, de aproximadamente 1 g, será colocada directamente en un mortero para la extracción e identificación de lípidos y proteínas.

2. Cuantificación de humedad.

- a. Pesar las dos porciones de tejido colocadas en las respectivas charolas de papel aluminio (previamente puestas a peso constante).
- b. Determinar el peso exacto de la muestra por diferencia de pesos; es decir, el peso de la charola de aluminio con muestra menos el peso de la charola de aluminio sin muestra.
- c. Agregar a cada muestra 1 mL de etanol 96°.
- d. Colocar en la estufa a 100-110° C durante 90 minutos, enfriar en desecador y pesar.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	104/293

e. Calcular el % de humedad.

$$\% H = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

P_i masa inicial en g
 P_f masa final en g

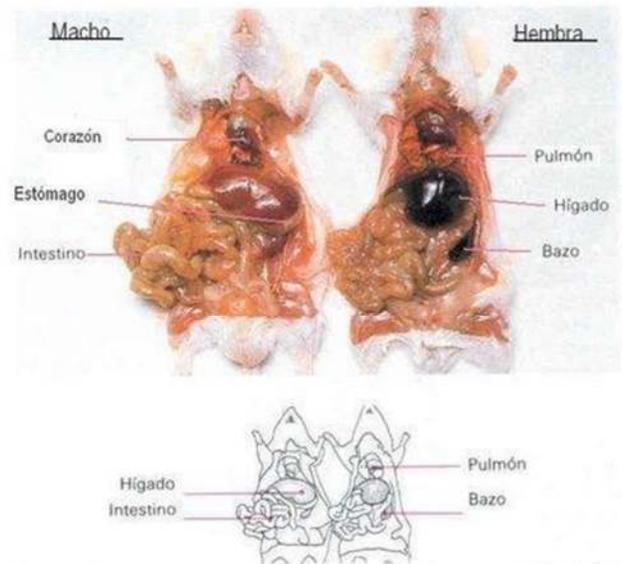
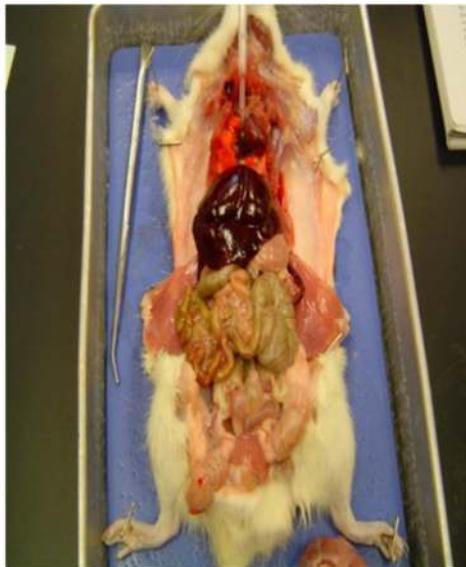


Fig. 1. Colocación de la rata (A) y posición de órganos de rata Wistar (B).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	105/293

3. Identificación de Lípidos y Proteínas.

- a. Triturar severamente con arena tratada o con vidrio molido la porción de muestra que fue colocada en un mortero (fig.2).



Fig. 2. Homogenización del tejido.

Agregar a la muestra 10 mL de la mezcla cloroformo-metanol 2:1 v/v.

- b. Homogeneizar y recolectar el sobrenadante en un vaso de precipitados de entre 20 y 50 mL. Agregar otros 5 mL al mortero, de cloroformo-metanol 2:1 v/v con la finalidad de lavar los restos de tejido, homogeneizar y colocar en el mismo vaso. Pasar la mezcla a tubos de ensayo de 13 X 100 mm y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- c. Separar los sobrenadantes en un vaso de precipitados de 50 mL limpio.
- d. Agregar 10 mL de agua destilada al vaso de los sobrenadantes y dejar reposar 10 minutos. Con esto se separarán la fase clorofórmica (lípidos), de la fase acuosa (proteínas).

e. Identificación de proteínas.

Tomar una alícuota (1 mL) de la fase acuosa y determinar proteínas según el método de Lowry utilizado en la práctica de curva estándar.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	106/293

f. Identificación de lípidos.

Tomar una alícuota de la fase clorofórmica (1 mL) e identificar colesterol según el método de Liebermann-Burchard: añadir 15 gotas de anhídrido acético al tubo; mezclar, dejar enfriar y finalmente añadir 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Observar la coloración de la reacción.

Nota: Esta reacción es altamente exotérmica por lo que se debe efectuar con guantes y lentes de seguridad en una campana de extracción.

OPCIONAL SE PUEDE REALIZAR

Cuantificación de cenizas.

- Calcinar las muestras colocadas en los crisoles con la flama de un mechero Fisher (fig. 3), hasta que se obtengan cenizas blancas o grises y sin residuos visibles de carbonización (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de peróxido de hidrógeno y se vuelven a calcinar).



Fig. 3. Calcinación de muestra.

- Colocar los crisoles en la mufla y calentar hasta alcanzar la temperatura de 500°C, mantenerlos a esta temperatura un mínimo de 40 minutos o hasta que las cenizas estén completamente blancas o grises, de no ser así humedecer nuevamente con peróxido de hidrógeno y volver a calcinar en la mufla.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	107/293

c. Dejar enfriar los crisoles y pesar (Fig. 4).



Fig. 4. Desecador con muestras.

d. Calcular el % de cenizas.

$$\% \text{ de ceniza} = \frac{P_2 - P}{P_1} * 100$$

donde:

P: Peso del crisol

P₁: Peso de la muestra

P₂: Peso final (crisol + cenizas)

De manera optativa pueden determinarse en las muestras la presencia de cationes sodio, amonio, potasio y calcio y aniones sulfuros, cloruros, yoduros, cianuros y fosfatos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	108/293

Resultados

- Realice sus cálculos para obtener el % de humedad y (con base al peso seco).
- Mediante cruces (+) comparar lo obtenido para cada órgano indicando el grado de reacción en la identificación de lípidos y proteínas.
- Elabore en el pizarrón un cuadro comparativo con los resultados obtenidos de humedad, cenizas, proteínas y lípidos para cada órgano.
- Compare los resultados del cuadro con la bibliografía y discuta sus resultados.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia biológica del agua en un ser vivo?
2. ¿Cuál es la función de cada uno de los minerales presentes en una muestra?
3. ¿En qué tejido esperarías encontrar mayor cantidad de lípidos? ¿Por qué?
4. ¿Cómo calcula el % de humedad de una muestra?
5. ¿Cómo calcula el % de cenizas de una muestra?
6. Para cada biomolécula, mencione en forma breve su composición, así como su función.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	109/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2008.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
3. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
4. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4^a ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	110/293

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA EN ANIMALES Y PLANTAS

Objetivos

- ✓ Analizar la importancia biológica de los carbohidratos de reserva.
- ✓ Extraer polisacáridos de muestras diferentes.
- ✓ Identificar a éstos con la prueba de lugol y Benedict, antes y después de su hidrólisis.

Antecedentes académicos

- ✓ Composición química de los carbohidratos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los carbohidratos.
- ✓ Funciones de los carbohidratos en la célula y en un organismo intacto.
- ✓ Pruebas para la identificación de carbohidratos



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	111/293

Introducción

Los carbohidratos son compuestos orgánicos químicamente formados por la unión de átomos de Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O), dispuestos en formas específicas. Se obtienen como producto de la fotosíntesis que se realiza en las plantas. Los únicos carbohidratos de origen animal son: la lactosa (presente en la leche de los mamíferos) y el glucógeno (presente en hígado y músculos).

Entre las principales funciones que cumplen los carbohidratos en el organismo humano, están:

- Aportar energía de utilización inmediata en forma de glucosa.
- Constituir una reserva energética en forma de glucógeno. Si el exceso de carbohidratos es desmedido, entonces la reserva se incorpora en forma de grasa corporal.
- Aportar la fibra necesaria para el normal funcionamiento del sistema digestivo.

Los carbohidratos de reserva son básicamente mono, di y polisacáridos, siendo el almidón el más importante en las plantas de origen tropical.

Los polisacáridos son carbohidratos de elevado peso molecular que mediante hidrólisis se desdoblán en un gran número de restos de monosacáridos, ejemplo de éstos son la celulosa, el glucógeno y el almidón.

El glucógeno se almacena en el hígado principalmente formando hasta el 10% del peso húmedo, es un material de reserva que puede mantener el nivel de glucosa en sangre durante 12 a 24 horas. Su peso molecular va de 1×10^6 a 1×10^8 Daltons. Está formado por monómeros de glucosa, unidos mediante enlaces alfa (1-4) y enlaces laterales alfa (1-6) en las ramificaciones, presenta estructura en forma de abanico (fig. 1). Es soluble en agua y en contacto con el I_2 da una coloración café pardo.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	112/293

El almidón es el material de reserva de la mayoría de las plantas, existen dos formas de almidón: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es soluble en agua y está formada por cadenas lineales de D-glucosa con enlaces alfa (1-4) y la amilopectina además de ser insoluble en agua, se encuentra ramificada por cadenas de D-glucosa iguales a las anteriores pero que se unen entre sí por enlaces cruzados alfa (1-6), la separación entre cada ramificación es de 19 a 26 unidades de glucosa aproximadamente. La amilosa presenta una conformación helicoidal y en presencia de I_2 toma una coloración azul, en cambio la amilopectina debido a sus ramificaciones retiene menos I_2 , dando una coloración café pardo.

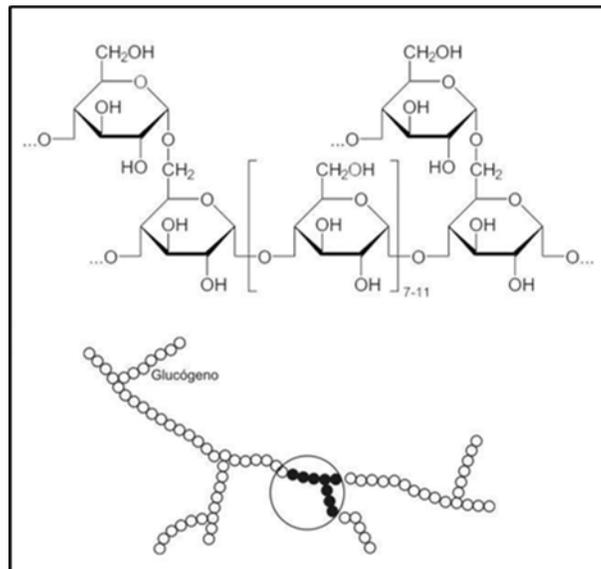


Fig.1. Estructura del glucógeno



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	113/293

Material y Equipo

- Estuche de disección.
- Tabla de disección
- Gradilla
- Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
- Papel filtro de poro abierto
- Embudo
- Vidrio de reloj
- Mortero con pistilo
- Perlas de ebullición
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL
- Soporte universal
- Anillo de hierro
- Pipetas de 1 y 5 mL
- Goteros
- Parrilla
- Centrifuga



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	114/293

Reactivos

- Ácido acético
- HCl concentrado
- Etanol 96%
- NaOH solución concentrada
- Lugol: añada I_2 a una solución saturada de yoduro de potasio en agua, filtre y diluya con agua destilada hasta obtener una solución de color pardo dorado, consévelo en frasco ámbar.
- Reactivo de Benedict: disuelva 17.3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 mL de agua caliente. Por separado disuelva 173 g de citrato de sodio anhidro en 800 mL de agua fría. Vierta ésta última solución en la primera y complete a un volumen de 1000 mL con agua destilada.

Material Biológico

- Rata Wistar de 200 g de peso



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	115/293

Método

Experimento 1

1. Sacrificar una rata Wistar de aproximadamente 200 g de peso.
2. Colocar la rata muerta en la tabla de disección y amarrar cada una de sus patas a las esquinas correspondientes de la tabla de disección.
3. Realizar la disección del hígado con ayuda del estuche de disección.
4. Cortar el hígado por la mitad y colocarlo en un vidrio de reloj; de aquí en adelante ésta será la porción de hígado que se utilizará.
5. Cortar la porción de hígado en trozos medianos y colóquelos en 80 mL de agua destilada a temperatura de ebullición y manténgalo así por 4 minutos.
6. Pasar el tejido a un mortero y tritúrelo con arena fina (fig. 2).



Fig.2. Trituración del hígado con arena fina

7. Colocar el homogenizado en la misma agua y déjelo hervir durante 15 minutos. Acidifique agregando ácido acético hasta un pH de 4 a 5.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	116/293

8. Filtrar en caliente (nótese la opalescencia del filtrado) (fig. 3) y agregar al filtrado su mismo volumen de etanol al 96% frío. Dejar reposar la suspensión en refrigeración durante 24 horas.



Fig.3. Filtración en caliente

9. Sin resuspender, decantar el líquido y centrifugar el sedimento a 2000 rpm, durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante y dejar los tubos boca abajo para eliminar el exceso de etanol.
10. Disolver el contenido de un tubo de glucógeno libre de etanol, en 4 mL de agua destilada; realizar las pruebas de Lugol y Benedict antes y después de la hidrólisis.
11. Glucógeno antes de hidrolizar; realizar las pruebas de Lugol y Benedict (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas de Lugol y Benedict para glucógeno antes de la hidrólisis.

Tubo	1 Prueba de Lugol	2 Prueba de Benedict
Solución de glucógeno (mL)	0.5	0.5
Lugol	2 gotas	-----
Reactivo de Benedict (mL)	-----	0.5 (10 gotas)
Solución concentrada de NaOH	-----	1-2 gotas
Ebullición en baño María	-----	2-5 min
Observaciones (color obtenido)		



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	117/293

12. Para la hidrólisis del glucógeno: agregar 3 gotas de HCl concentrado al resto de la solución de glucógeno contenida en un tubo de ensayo y calentar a ebullición en baño María durante 15-20 minutos. Transcurrido el tiempo, neutralizar con solución concentrada de NaOH utilizando papel pH como indicador.

13. Glucógeno después de la hidrólisis; realizar las pruebas de Lugol y Benedict (Tabla 2).

Tabla 2. Pruebas de Lugol y Benedict para glucógeno después de la hidrólisis.

Tubo	1 Prueba de Lugol	2 Prueba de Benedict
Solución neutralizada de glucógeno (mL)	0.5	0.5
Lugol	2 gotas	-----
Reactivo de Benedict (mL)	-----	0.5 (10 gotas)
Solución concentrada de NaOH	-----	1-2 gotas
Ebullición en baño María	-----	2-5 min
Observaciones (color obtenido)		

14. Testigos negativos (Tabla 3).

Tabla 3. Testigos negativos

Tubo	1 Testigo de Lugol	2 Testigo de Benedict
Agua destilada (mL)	0.5	0.5
Lugol	2 gotas	-----
Reactivo de Benedict (mL)	-----	0.5 (10 gotas)
Solución concentrada de NaOH	-----	1-2 gotas
Ebullición en baño María	-----	2-5 min
Observaciones (color obtenido)		

15. Comparar los resultados de glucógeno antes y después de la hidrólisis (fig. 4).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	118/293



Fig. 4. Resultados de las pruebas de Lugol y Benedict para glucógeno antes y después de la hidrólisis.

Experimento 2.

Corte una papa en rodajas, colóquelas sobre un vidrio de reloj o sobre un trozo de papel aluminio y adicione 2 a 3 gotas de Lugol y observe la coloración (fig. 5).

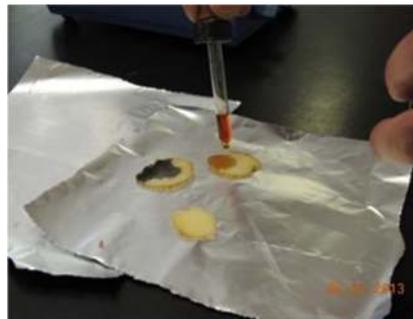


Fig.5. Adición de Lugol.

Experimento 3.

1. Colocar una pequeña porción de arroz molido en agua caliente, para obtener un extracto de almidón.
2. Realizar las pruebas de Lugol y Benedict antes de la hidrólisis.

Almidón antes de la hidrólisis; realizar las pruebas de Lugol y Benedict



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	119/293

(Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas de Lugol y Benedict para almidón antes de la hidrólisis.

Tubo	1 Prueba de Lugol	2 Prueba de Benedict
Extracto de Almidón (mL)	0.5	0.5
Lugol	2 gotas	-----
Reactivo de Benedict (mL)	-----	0.5 (10 gotas)
Solución concentrada de NaOH	-----	1-2 gotas
Ebullición en baño María	-----	2-5 min
Observaciones (color obtenido)		

3. Para la hidrólisis, tomar 2 mL del extracto de almidón y agregar 3 gotas de HCl concentrado calentar a ebullición en baño María durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, neutralizar con solución concentrada de NaOH utilizando papel pH como indicador.
4. Almidón después de hidrolizar; realizar las pruebas de Lugol y Benedict (Tabla 5).

Tabla 5. Pruebas de Lugol y Benedict para almidón después de la hidrólisis.

Tubo	1 Prueba de Lugol	2 Prueba de Benedict
Solución neutralizada de Almidón (mL)	0.5	0.5
Lugol	2 gotas	-----
Reactivo de Benedict (mL)	-----	0.5 (10 gotas)
Solución concentrada de NaOH	-----	1-2 gotas
Ebullición en baño María	-----	2-5 min
Observaciones (color obtenido)		

5. Comparar los resultados para almidón antes y después de la hidrólisis.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	120/293



Fig. 6. Resultados de las pruebas de Lugol y Benedict para almidón antes y después de la hidrólisis.

Resultados

- Realizar un cuadro con los resultados obtenidos para las pruebas de Lugol y Benedict en cada una de las muestras analizadas.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las propiedades del glucógeno que se aprovechan para su extracción?
2. ¿Cuál es el fundamento de la reacción de Benedict y a qué se deben sus resultados antes y después de la hidrólisis?
3. ¿Cuál fue el polisacárido identificado en los experimentos 2 y 3? Mencione sus diferencias con respecto al glucógeno.
4. ¿Qué es un azúcar reductor?
5. ¿Puede un polisacárido ser reductor? ¿Por qué?
6. ¿En qué otros tejidos se puede encontrar glucógeno?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	121/293

Referencias

1. Acuña F. Química Orgánica. Costa Rica: UENED; 2006.
2. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
3. Campbell MK, Farrell SO. Bioquímica. 6a ed. México DF: Cengage Learning; 2010.
4. Clark JM. Bioquímica experimental. Madrid: Acribia; 1996.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: McGraw Hill-Interamericana; 2009.
6. Stryer L, Berg JM, Timoczko JL. Bioquímica. 6ª ed. Barcelona, España: Editorial Reverté. 2008.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	122/293

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO

Objetivos

- ✓ Analizar las propiedades de los lípidos.
- ✓ Extraer los lípidos de la yema de huevo.
- ✓ Cuantificar fosfatos de lípidos fosforilados y no fosforilados.
- ✓ Analizar la importancia biológica de los lípidos presentes en la yema de huevo.

Antecedentes académicos

- ✓ Definición y clasificación de los lípidos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los lípidos.
- ✓ Métodos de extracción e identificación de lípidos.
- ✓ Métodos de cuantificación de fósforo.
- ✓ Componentes lipídicos de la yema de huevo



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	123/293

Introducción

Los lípidos representan uno de los cuatro grupos principales de macromoléculas presentes en todas las células. Llevan a cabo múltiples funciones en el organismo, como: almacenamiento de energía, transporte, estructura, especialmente en membranas, confiriéndoles la propiedad de permeabilidad selectiva, al permitir el paso o no de algunas sustancias y en determinada dirección, así como la conducción nerviosa y el transporte activo como la bomba de Na^+/K^+ . Además, actúan como hormonas y algunas vitaminas.

A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos, los lípidos no son poliméricos. Sin embargo, se agregan entre sí y es en este estado en el que llevan a cabo su función estructural en las membranas biológicas.

Los lípidos exhiben mayor variedad estructural que las otras clases de macromoléculas biológicas. Hasta cierto grado, los lípidos son una categoría general de sustancias similares únicamente por ser en gran medida hidrófobas y sólo escasamente solubles en agua. En general, los lípidos llevan a cabo tres funciones biológicas:

1. Ser componentes esenciales de las membranas biológicas.
2. Servir como depósitos de energía.
3. Participar en numerosos acontecimientos de señalización intra e intercelular.

Debido a su naturaleza hidrófoba los lípidos son fáciles de separar de otros materiales biológicos mediante extracción con disolventes orgánicos.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	124/293

Propiedades fisicoquímicas de los lípidos

Los lípidos son insolubles en agua, cuando se agitan fuertemente en ella se dividen en gotas formando una emulsión que es transitoria, pues desaparece en reposo por reagrupación de las gotitas de grasa en una capa que, por su menor densidad, se sitúa sobre el agua. Por el contrario, son solubles en disolventes orgánicos, como éter, cloroformo, acetona, benceno, etc. Su solubilidad en alcoholes dependerá del tamaño de él mismo, así como de su ramificación (a mayor número de carbonos más soluble será el lípido no así con la ramificación).

Fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que contienen un alcohol (glicerol), dos ácidos grasos y un grupo fosfato (fig. 1). Son los componentes lipídicos principales de las membranas biológicas. Se organizan como glicerol-3-fosfato y las posiciones C₁ y C₂ están esterificadas con ácidos grasos, comúnmente uno saturado y otro insaturado con una longitud promedio de 18 carbonos. Adicionalmente, el grupo fosforilo está unido a un hidrógeno (ácido fosfatídico) o a otro grupo, en general polar (Cuadro 1).

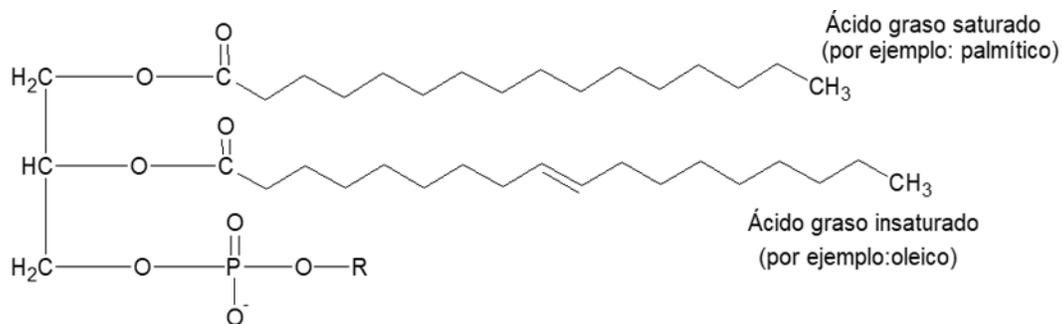


Fig. 1. Glicerofosfolípido.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	125/293

Cuadro 1. Sustituyentes en el glicerofosfolípido.		
R	Estructura de R	Nombre
Hidrógeno	$\text{H}-\text{H}$	Ácido fosfatídico
Etanolamina	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina
Colina	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina
Serina	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HO} \quad \text{O} \end{array}$	Fosfatidilserina

Los fosfolípidos son componentes estructurales importantes de las membranas, varios fosfolípidos son agentes emulsionantes y agentes superficiales activos (un agente superficial activo es una sustancia que disminuye la tensión superficial de un líquido, normalmente el agua, de forma que se dispersa por una superficie).

Pueden realizar estas funciones ya que son anfipáticos, esto es que son simultáneamente hidrofílicos e hidrofóbicos. Es la parte hidrofílica donde se encuentran el grupo fosfato y el aminoalcohol o base nitrogenada. Esta característica estructural hace posible que los fosfolípidos participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y el sistema lipídico separando y aislando a los dos sistemas, a la vez que los mantiene juntos.

Cuando los fosfolípidos se suspenden en agua, se reagrupan espontáneamente en estructuras ordenadas, los grupos hidrofóbicos quedan enterrados en el interior para excluir el agua, simultáneamente, los grupos de cabeza polar se orientan de forma que

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	126/293

se exponen al agua. Cuando están presentes las moléculas de fosfolípidos en una concentración suficiente, forman capas bimoleculares. Esta propiedad de los fosfolípidos es la base de la estructura de la membrana (fig. 2).

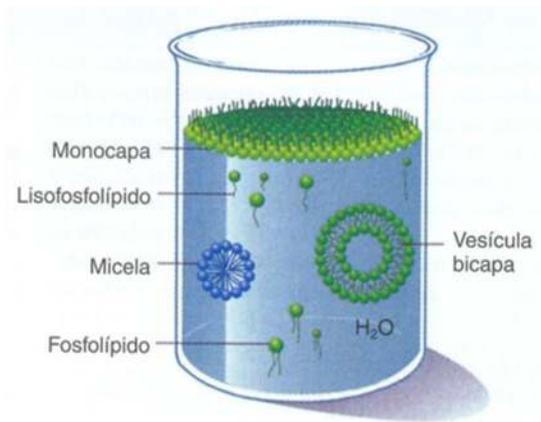


Fig. 2. Moléculas de fosfolípidos en solución acuosa.

La fosfatidilcolina (lecitina), es el fosfolípido más abundante de la yema de huevo, por lo que se toma como referencia para analizar las propiedades y cuantificar los lípidos presentes en la yema de huevo.

La yema de huevo es una fuente rica en lípidos, en el cuadro 2 se muestra el contenido de los principales fosfolípidos en ella.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	127/293

Cuadro 2. Fosfolípidos en 100 g de yema de huevo

Fosfolípidos totales	10.34 g
Fosfatidilcolina	6.79 g
Fosfatidiletanolamina	1.93 g
Fosfatidilinositol	64.00 mg
Esfingomielina	488.00 mg

Digestión por el método de Kjeldahl

Este método fue desarrollado para separar el nitrógeno contenido en las proteínas y cuantificarlas de forma indirecta. En esta práctica debido a que el fósforo se encuentra en combinación con materia orgánica en los lípidos, la determinación de fósforo total debe necesariamente contemplar una oxidación efectiva de la materia orgánica.

Por lo anterior se calienta el compuesto que contiene fósforo con ácido sulfúrico concentrado, durante el proceso se agregan gotas de H_2O_2 el cual acelera la reacción. Se lleva a cabo la operación en matraces de cuello largo (matraces Kjeldahl) sobre un digestor de alto calentamiento.

Los compuestos orgánicos se carbonizan por la acción del ácido sulfúrico, los elementos carbono, hidrógeno, fósforo y azufre son oxidados a CO_2 , CO , H_2O , $P_2O_7^{4-}$ y SO_2 . El abundante desprendimiento de dióxido y trióxido de azufre exige efectuar el proceso en la campana de extracción. Se continúa la digestión hasta que la muestra reaccionante sea completamente incolora.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	128/293

Determinación de fósforo por el método de Fiske & Subbarow

Se utiliza este método con la finalidad de cuantificar el fósforo contenido en los lípidos de la muestra. Los iones fosfato reaccionan con molibdato de amonio en medio ácido para producir el complejo fosfomolibdato de amonio, el cual, en presencia de un agente reductor, produce un complejo heteropolimérico de color azul, azul de molibdeno, cuya absorbancia se mide a los 615 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de fósforo de la muestra.

Material y Equipo

- Anillo de hierro
- Embudo de separación de 125 mL
- Embudo de tallo corto
- Marcador indeleble de punta extrafina
- Matraces aforados de 10, 50 y 100mL
- Matraces MicroKjeldahl de 30 mL
- Micropipetas. p200, p1000 y p5000 μ L
- Papel filtro de poro grueso
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL 1/100
- Probetas graduadas de 25 y 100 mL
- Puntas nuevas para las micropipetas
- Soporte universal
- Vasos de precipitados de 25, 50, 150 y 250 mL
- Baño maría
- Parrilla de calentamiento
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro
- Celdas para espectrofotómetro



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	129/293

Reactivos

- Reactivo 1: Con mucha precaución añadir 26 mL de H₂SO₄ concentrado en 70 mL de agua destilada (enfriar con flujo de agua en la parte externa del recipiente), posteriormente agregar y disolver 2.5 g de molibdato de amonio, completar a 100 mL con agua destilada.
- Reactivo 2: Disolver en agua: 14 g de bisulfito de sodio, 0.5 g de sulfito de sodio, 0.25 g de ácido 1 amino-2 naftol- 4 sulfónico, es importante disolver en ese orden y no agregar el siguiente reactivo hasta que se disuelva el anterior, finalmente llevar a 200 mL con agua destilada. Conservar en refrigeración donde es estable durante 2 semanas.
- Solución estándar de fosfato: Disolver 0.4394 g de fosfato monopotásico en agua destilada y aforar a 1000 mL con agua (Solución Stock). Posteriormente realizar una dilución 1:10 de la solución Stock.
- Mezcla Cloroformo-Metanol 2:1 V/V
- Acetona
- Cloruro de sodio al 1%
- Sulfato de sodio anhidro
- Éter de petróleo
- Ácido sulfúrico
- H₂O₂ al 30%
- Hidroxiquinona
- NaOH 1N



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	130/293

Material Biológico

-Huevo de gallina

Método

Extracción y separación de fosfolípidos y lípidos no fosforilados.

1. Romper un huevo de gallina a la mitad y separar la clara de la yema utilizando un desyemador.
2. Pasar la yema a un vaso de precipitados de 250 mL, adicionar 90 mL de una mezcla de disolventes: cloroformo-metanol 2:1 V/V, agitar suavemente mezclando bien la yema con el disolvente. Dejar reposar 10 minutos.
3. Filtrar el homogenizado a través de un filtro de poro grueso. Dividir el filtrado en dos partes para que sea utilizado por dos equipos de trabajo y continuar.
4. Colocar el filtrado en un embudo de separación con 25 mL de solución acuosa de NaCl al 1%, invertir cuidadosamente dos veces el embudo para lavar el filtrado y dejar reposar 10 minutos para permitir la separación de ambas fases. Finalmente obtener sólo la fase clorofórmica.
5. Eliminar el agua que pueda haber en la fase clorofórmica mediante la adición de aproximadamente 2 g de Na₂SO₄ anhidro, agitar vigorosamente y filtrar. En caso de que la solución continúe turbia, repetir la operación.
6. Evaporar el disolvente en baño maría, hasta que se observe un residuo espeso, sin olor a disolvente, adicionar 15 mL de acetona fría y colocar en baño de hielo.
7. Lavar precipitado (lípidos fosforilados) con 5 mL de acetona fría, eliminar el disolvente por decantación y disolver el precipitado en 10 mL de éter de petróleo. Guardar en un frasco ámbar, etiquetar y dejarlo en refrigeración.
8. Guardar la solución cetónica (lípidos no fosforilados) en un frasco ámbar, etiquetar y dejar en refrigeración.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	131/293

Precaución: Etiquetar bien sus recipientes y adicionar trazas del antioxidante hidroxiquinona para guardar las muestras. Guardar en refrigeración.

Determinación del contenido de fósforo en fosfolípidos y lípidos no fosforilados.

1. Evaporar las dos soluciones a sequedad en baño maría.
2. Pesar en dos papeles filtro pequeños, 10 mg de fosfolípidos y lípidos no fosforilados. Colocar cada papel en un matraz microkjeldahl, realizar la digestión, con ayuda de la parrilla de calentamiento (para matraz microkjeldahl), agregando a cada matraz, 1.0 mL de H₂SO₄ concentrado, adicionar durante el calentamiento gotas de H₂O₂ al 30 %. Continuar con la digestión hasta que el líquido se encuentre incoloro. Tener cuidado al momento de agregar el peróxido evitando que el matraz esté muy caliente, para evitar que la muestra se proyecte.
3. Aforar los líquidos resultantes a 50 mL con agua destilada.
4. Tomar alícuotas de 1 mL y aforar a 10 mL con agua destilada.
5. Vaciar cada muestra a un vaso de precipitados de 25 mL y agregar a cada una 0.4 mL del reactivo de molibdato (reactivo 1), dejar reposar 10 minutos.
6. Agregar 0.2 mL del reactivo 2, dejar reposar 5 minutos.
7. Leer en el espectrofotómetro a 615 nm, contra un blanco de reactivos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	132/293

Curva estándar de fósforo

1. Tomar 5 alícuotas de la solución patrón de fosfatos: 0.2, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0 mL respectivamente y aforar a 10 mL con agua destilada.
2. Adicionalmente se afora 10 mL de agua destilada, esta será donde se preparará el blanco de reactivos.
3. Vaciar cada solución estándar a un vaso de precipitados de 25 mL y agregar a cada uno 0.4 mL del reactivo de molibdato (reactivo 1), dejar reposar 10 minutos.
4. Agregar 0.2 mL del reactivo 2, dejar reposar 5 minutos.
5. Leer en el espectrofotómetro a 615 nm, utilizando el blanco de reactivos.

Resultados

- Graficar la curva estándar de fosfatos e interpolar las absorbancias de las muestras (fosforilados y no fosforilados).
- Calcular el contenido de fósforo en los 10 mg de muestra, tomando en cuenta las diluciones de las muestras después de la digestión.
- A partir de la concentración de fósforo, obtener el contenido de Fosfatidilcolina en los 10 mg de muestra.

Cuestionario

1. Menciona 5 funciones de los lípidos en los organismos biológicos.
2. Explica el fundamento del método de Kjeldahl.
3. Justifica el uso de los disolventes cloroformo-metanol en la práctica.
4. Indica en qué consiste el método de cuantificación de fosfatos (Fiske & Subbarow) y su importancia para la práctica.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	133/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Facultad de Química. UNAM. Licenciatura de Química en alimentos. Análisis de alimentos fundamentos y técnicas. [on line] Disponible en: dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTécnicasdeAnálisisdeAlimentos_6501.pdf.
3. García-del Valle A, Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT. Protocolos de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.
4. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	134/293

ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Objetivos

- ✓ Identificar los lípidos de la yema de huevo, por medio de la técnica de cromatografía en capa fina.
- ✓ Estudiar los fundamentos de la cromatografía en capa fina.

Antecedentes académicos

- ✓ Clasificación de los lípidos.
- ✓ Componentes lipídicos de la yema de huevo.
- ✓ Fundamentos de la cromatografía en capa fina.
- ✓ Métodos de identificación de lípidos.

Introducción

Los lípidos constituyen un complejo grupo de compuestos relacionados principalmente porque son insolubles en agua, solubles en disolventes no polares, como el éter, acetona, cloroformo, benceno y alcohol, y que se encuentran en tejidos animales y vegetales. Entre los muchos tipos de lípidos que existen podemos citar grasas, ácidos grasos, ceras,



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	135/293

esteroides, fosfolípidos, glucolípidos y terpenos, como ejemplos de sustancias biológicamente importantes. Los lípidos presentes en los seres vivos pueden dividirse en dos grandes grupos, en función de sus estructuras químicas: simples y complejos.

A) Lípidos simples.

Los lípidos simples no contienen ácidos grasos por lo que no son saponificables y se derivan de moléculas de cinco carbonos. Los lípidos simples son:

- **Esteroides.** Los esteroides más comunes son el colesterol, los ácidos biliares y las hormonas sexuales en los vertebrados, la mayoría de los esteroides se encuentran como alcoholes libres o como ésteres de ácidos grasos de cadena larga. El esteroide más común es el colesterol, que es un componente de la membrana citoplasmática de los tejidos animales.
- **Terpenos.** Son constituyentes notables de ciertos vegetales, y a ellos se debe su olor y sabor característicos, éstos se sintetizan a partir de la acetilcoenzima A y son los precursores de los esteroides.
- **Prostaglandinas.** Moderadores de la actividad hormonal, son ácidos carboxílicos de 20 átomos de carbono, que contienen un anillo ciclopentano, grupos hidroxilo, uno o más dobles enlaces y en ocasiones un grupo cetona.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	136/293

B) Lípidos complejos

Los lípidos son un grupo complejo contienen ácidos grasos y son saponificables, se dividen en triacilglicéridos, esfingolípidos, fosfoacilglicéridos y ceras.

Los ácidos grasos presentes en la naturaleza son cadenas de hidrocarburos no ramificadas con un grupo carboxilo en un extremo, éstos son sintetizados a partir de unidades de acetilo de dos carbonos. Cuando todos los átomos de carbono de una cadena de ácido graso están unidos por enlaces covalentes simples, el compuesto es “saturado”, un ácido graso “no saturado” tiene uno o más enlaces dobles entre los átomos de carbono del esqueleto de la cadena.

Los triacilglicéridos, llamados grasas neutras, son ésteres del alcohol glicerol y ácidos grasos, estos son la principal forma de almacenamiento de lípidos tanto en vegetales como en animales, pueden formarse a partir del exceso de carbohidratos, proteínas o lípidos en las células y tejidos (fig. 1).

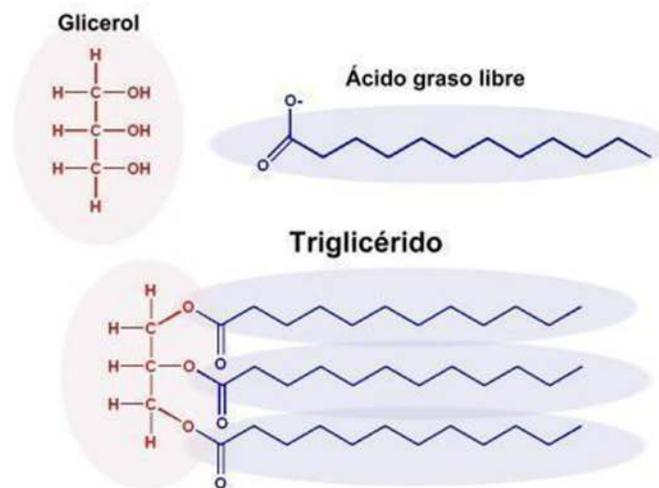


Fig.1. Estructura de triglicéridos (triacilglicéridos)

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	137/293

Los fosfolípidos son constituyentes importantes de las membranas celulares. En una molécula de fosfolípido, un ácido graso está unido a uno de dos grupos hidroxilo del glicerol y un residuo de ácido fosfórico lo está al tercer hidroxilo, en lugar de un tercer ácido graso, como en una grasa neutra (fig.2). Así, todos los fosfolípidos tienen una “cola” hidrófoba que consta de dos cadenas de ácidos grasos y una “cabeza” hidrófila constituida por un residuo de ácido fosfórico cargado positivamente. Los fosfolípidos son, por lo tanto, moléculas anfipáticas, debido a que en la misma molécula existen las dos regiones: hidrófila e hidrófoba. Debido a su naturaleza anfipática, un fosfolípido puede actuar con fases acuosas y no acuosas y funciona, así como enlace entre la célula y su entorno.

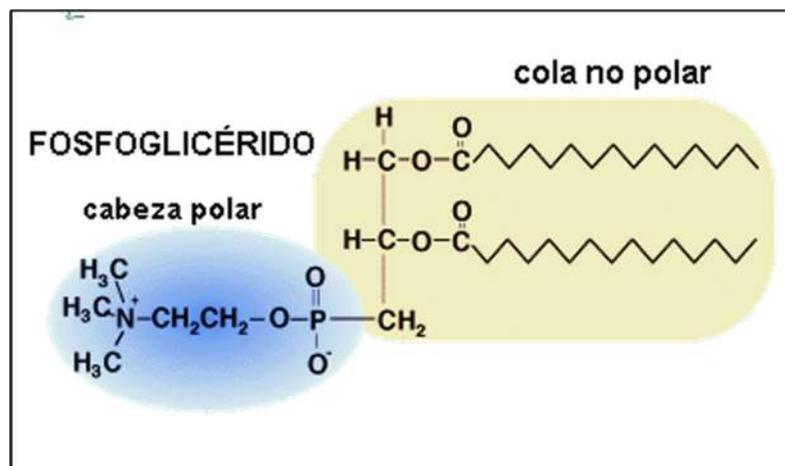


Fig. 2. Fosfolípido.

Cuando los fosfolípidos interactúan con agua, se congregan espontáneamente en dos capas, en dichas capas bimoleculares de fosfolípidos, las cabezas hidrófilas de las moléculas están en el agua y las colas hidrófobas son excluidas de ésta. Dichos agregados bimoleculares se asemejan notablemente a la disposición de los fosfolípidos en las membranas celulares. Se parecen aún más a las membranas cuando una mezcla de proteínas y fosfolípidos se añade a un sistema con fase acuosa y aérea. Las propiedades anfipáticas de los fosfolípidos son muy importantes en la conformación de

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	138/293

la membrana, así como en sus funciones en las interacciones que comprenden agua, lípidos y proteínas.

En medio acuoso las colas de los fosfolípidos se disponen de tal manera que forman un ambiente local hidrofóbico. Esto deja a los grupos fosfatos "de cara" al ambiente hidrofílico. Existen tres estructuras que los fosfolípidos pueden formar en razón de naturaleza anfipática (fig. 3).

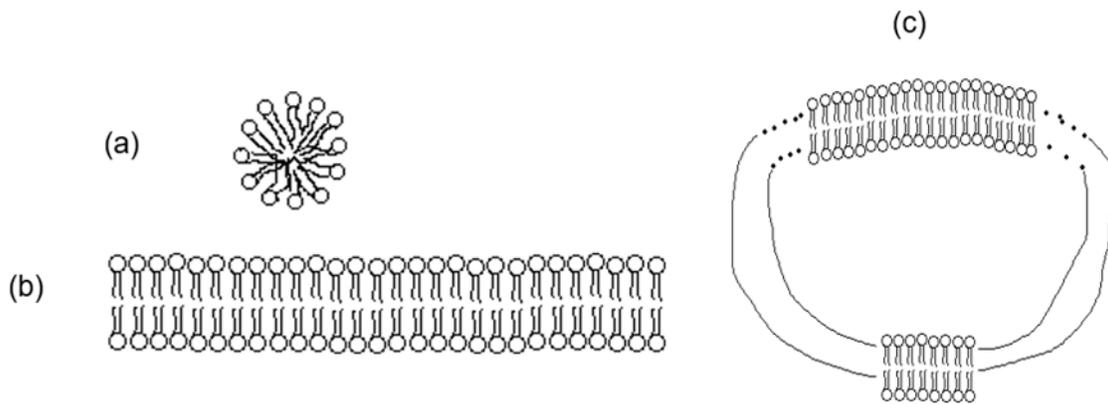


Fig 3. a) micelas, b) bicapas lipídicas, c) bicapas lipídicas esféricas liposomas.

Todos los fosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico (Fig.4) y se nombran según sus grupos polares de cabeza (Fig.5).

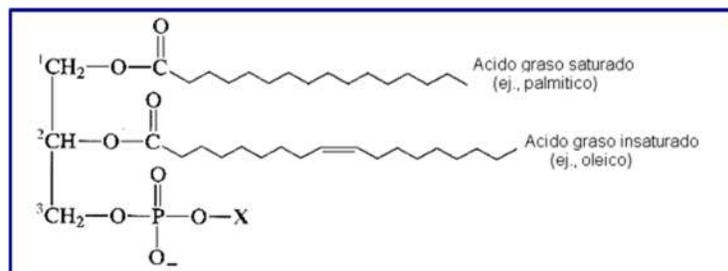


Fig 4. Ácido fosfatídico.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	139/293

Todos tienen una carga negativa sobre el grupo fosfato a pH 7. El alcohol del grupo de cabeza también puede aportar una o más cargas a pH próximo a 7.

X	Estructura de X	Nombre de los Glicerofosfolípidos
(a) hidrógeno	—H	ácido fosfatídico
(b) etanolamina	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	fosfatidiletanolamina
(c) colina	—CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	fosfatidilcolina
(d) serina	—CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	fosfatidilserina
(e) inositol		fosfatidilinositol

Fig 5. Ejemplos de Fosfolípidos.

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas, éstos también se conocen como fosfolípidos debido a la presencia del grupo fosfato (fig. 6). Esta clase de lípidos se presentan en las membranas celulares del encéfalo y el tejido nervioso, aunque pueden encontrarse en otras partes (fig. 7).

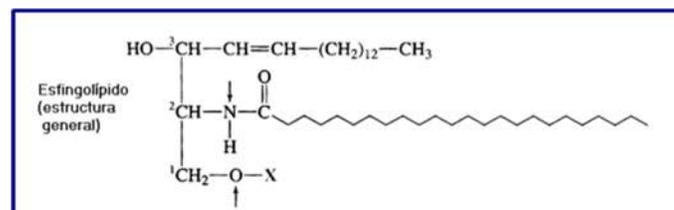


Fig. 6. Estructura general de un esfingolípido

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	140/293

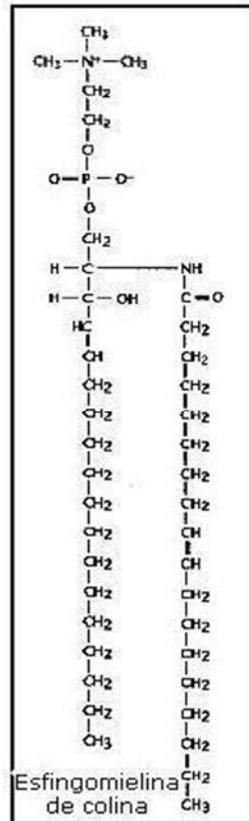


Fig. 7. Esfingomielina de colina

Separación e identificación de Lípidos

Los antiguos métodos para separar e identificar los lípidos basados en procedimientos químicos clásicos de cristalización, destilación y extracción por solventes, han sido en gran parte remplazados por métodos cromatográficos, siendo la cromatografía en capa fina la más útil para la separación de las diversas clases de lípidos. Por medio de esta técnica pueden separarse una mezcla de sustancias en sus componentes sobre un medio de soporte, las moléculas son arrastradas a distintas velocidades. La relación que existe entre la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación, sobre la distancia que recorre el eluyente, da un valor denominado R_f , el cual es característico para cada sustancia.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	141/293

La separación de varios fosfolípidos empleando la cromatografía de capa fina se indica en la siguiente figura (fig. 8), utilizando como sistema de disolventes, la mezcla: Cloroformo, metanol, ácido acético y agua destilada (65, 25, 8, 4):

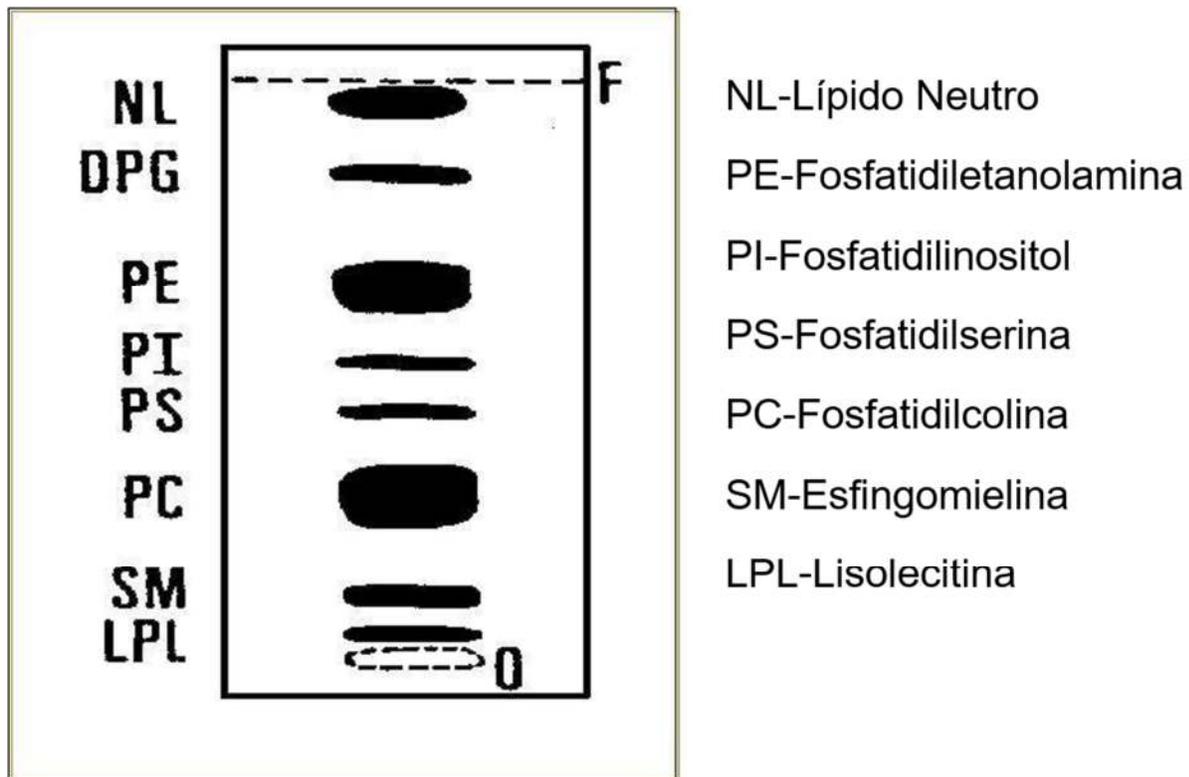


Fig. 8. Cromatografía en capa fina de lípidos



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	142/293

Material y Equipo

- Vasos de precipitados de 250 y 500 mL
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL 1/100
- Probetas graduadas de 100 y 250 mL
- Cámara de cromatografía
- Cámara para revelado con Yodo metálico
- Tubos capilares o aplicadores
- Placas de vidrio 20X20 cm, grosor 0.5 cm.
- Aspersores
- Agitadores de vidrio
- Estufa

Reactivos

- Sílica gel
- Molibdato de sodio
- Sulfato de hidracina
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ninhidrina
- Butanol
- Nitrato de bismuto
- Yoduro de potasio
- Ácido acético
- Hidróxido de sodio
- Yodo (cristales)
- Sistema de disolventes para la cromatografía: Cloroformo, metanol, ácido acético y agua destilada (65, 25, 8, 4)



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	143/293

Preparación de Disoluciones Reveladoras

1. Reactivo de molibdato (para fosfolípidos). Pesar 6.85 g de molibdato de sodio y 0.4 g de sulfato de hidracina y disolverlos en 100 mL de agua destilada. Añadir lentamente 100 mL de ácido sulfúrico concentrado, enfriar y aforar a 1000 mL con agua destilada.

2. Reactivo de ninhidrina (para amino-fosfolípidos). Pesar 0.5 g de ninhidrina y disolverlos en 100 mL de butanol.

3. Reactivo de bismuto (para fosfolípidos con colina).
 - a. Preparar dos soluciones:
 - i. Solución A: Pesar 1.7 g de nitrato de bismuto y disolverlos en 100 mL de ácido acético al 20% en agua destilada (V/V).
 - ii. Solución B: Pesar 40 g de yoduro de potasio (KI) y disolverlos en 100 mL de agua destilada.
 - b. Antes de utilizar el reactivo:
 - i. Mezclar 4 mL de la Solución A, 20 mL de ácido acético al 20% y 1 mL de la Solución B.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	144/293

Método

1. Preparación del adsorbente.

- Pesar 2.5 g de sílica gel en un vaso de precipitado de 25 mL.
- Añadir lentamente y con agitación NaOH 0.01 N, hasta obtener una pasta uniforme libre de burbujas, de una consistencia que permita derramar el adsorbente, pero sin ser demasiado fluida (aproximadamente 6 mL).

2. Preparación y activación de placas.

- Lavar exhaustivamente con detergente las placas de vidrio, enjuagar con suficiente agua y secar con papel absorbente.
- Verter el adsorbente formando una capa uniforme en las placas.
- Dejar secar por 5 minutos a temperatura ambiente
- Activar las placas en horno a 100-120 °C durante una hora.
- Proteger las placas de vapores de laboratorio y del deterioro mecánico, debiendo presentar un aspecto uniforme sin granulaciones de gran tamaño.

3. Aplicación de la muestra.

Colocar a 1.5 cm de uno de los extremos tres aplicaciones equidistantes correspondientes a lípidos totales, lípidos fosforilados y lípidos no fosforilados en cuatro placas cromatográficas, dejando secar después de cada aplicación y cuidando de no perforar la capa de sílica.

4. Desarrollo del cromatograma.

Desarrollar la placa cromatográfica en una cámara de cromatografía saturada y sellada, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol-ácido acético-agua (65:25:8:4, en volumen).



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	145/293

5. Revelado del cromatograma.

- Colocar una placa en una cámara que contenga cristales de yodo para revelar lípidos con insaturaciones, marcar cuidadosamente cada mancha con un lápiz.
- Rociar otra de las placas con reactivo de ninhidrina en la campana de extracción para revelar lípidos que contienen grupos amino primario y secundario (calentar la placa a 100 °C durante 2 o 3 minutos en el horno).
- Rociar la tercera placa con el reactivo de bismuto en la campana de extracción para revelar lípidos que contienen colina.
- Rociar la cuarta placa cromatográfica con el reactivo de molibdato de sodio para fosfolípidos en general.

Resultados

- Hacer un esquema de las cromatoplasmas obtenidas con los diferentes reveladores.
- Comparar con los esquemas de cromatografía presentados en la literatura.
- Correlacionar los R_fs reportados en la literatura y los obtenidos en la práctica.

Cuestionario

- ¿Qué clases de lípidos se encuentran en la yema de huevo y cuál es su proporción?
- ¿Cuáles son los métodos que se utilizan para el análisis de lípidos?
- ¿Cuál es el fundamento de la cromatografía en capa fina?
- ¿El reactivo de bismuto, ninhidrina y molibdato para que tipo de fosfolípidos son cada uno y que coloración se observa?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	146/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Cartwright IJ. Separation and Analysis of phospholipids by thin layer chromatography. En Methods in Molecular Biology, Vol 19: Biomembrane protocols: Isolation and Analysis. Humana Press INC. pp 153-167.

García-del Valle A, Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT. Protocolos de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.
3. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
4. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
5. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2^a ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	147/293

TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Objetivos

- ✓ Determinar los pKa's de un aminoácido (aa) problema.
- ✓ Determinar de qué aminoácido se trata.
- ✓ Comprobar por medio de la reacción de Sørensen que los aminoácidos se comportan como iones dipolares.

Antecedentes académicos

- ✓ Propiedades de ácidos y bases.
- ✓ Curvas de titulación.
- ✓ Preparación de soluciones valoradas.
- ✓ Clasificación de los aminoácidos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.

Introducción

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que conforman la unidad fundamental de las proteínas; poseen dos grupos funcionales característicos: un grupo amino $-NH_2$ y un grupo carboxílico $-COOH$.

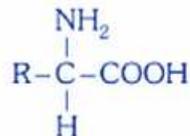


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	148/293

En general, todos los aminoácidos obtenidos de la hidrólisis de una proteína son del tipo alfa, que corresponden a la siguiente fórmula general:



Donde R representa el esqueleto de carbono característico de cada aminoácido.

Un aminoácido simple (con grupo R polar), a pH neutro, es una molécula eléctricamente neutra. Esta neutralidad no se debe a que no tenga cargas sino a que su grupo carboxilo está cargado negativamente y el grupo amino positivamente, confiriendo al aminoácido una carga global nula.

Existen dos propiedades de los aminoácidos que indican que su comportamiento no es el que presenta un ácido carboxílico y una amina como compuestos orgánicos, una de ellas es la solubilidad que presentan (con algunas excepciones) en agua y la otra son los puntos de fusión altos, característicos de sustancias de tipo inorgánico.

Estas dos propiedades indican que los grupos de los aminoácidos se encuentran cargados, que son compuestos polares y además que en solución su estructura es de zwitterión o ion dipolar. Así por ejemplo la glicina presenta en solución la siguiente estructura: $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$.

Lo que significa en este caso y de acuerdo con la definición de Brönsted, el grupo amino actúa como ácido ya que puede ceder un protón y el grupo carboxilo actúa como base ya que puede aceptar un protón.

Cada grupo amino o carboxilo de un aminoácido presentará un pKa (Tabla 1) que puede determinarse por la ecuación de Henderson-Hasselbach:

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	149/293

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

de donde si: $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ tenemos que: $\log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \log 1 = 0$; entonces: $\text{pH} = \text{pK}_a$

Lo que significa que el pK_a de un ácido o una base es el pH en el cuál se encuentra titulado a la mitad (fig. 1).

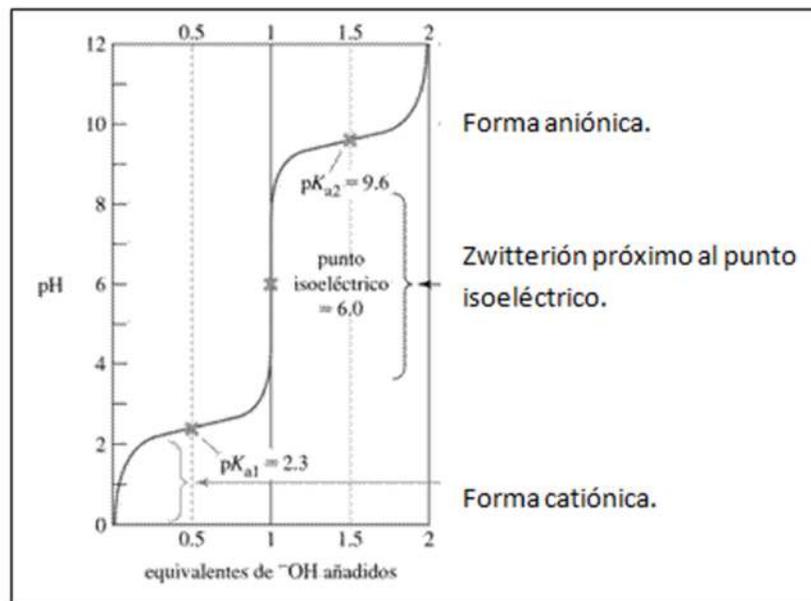


Fig. 1. Curva de titulación de glicina.

Tabla 1. Valores de pK de los aminoácidos más comunes			
alfa-aminoácido	pK₁ alfa-COOH	pK₂ alfa-NH₃⁺	pK_R Cadena lateral
Alanina	2.35	9.87	
Arginina	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Asparagina	2.1	8.84	
Ácido aspártico	1.99	9.9	3.90 (beta-COOH)
Cisteína	1.92	10.78	8.33 (sulfhidrilo)



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	150/293

Ácido glutámico	2.1	9.47	4.07 (gamma-COOH)
Glutamina	2.17	9.13	
Glicina	2.35	9.78	
Histidina	1.8	9.33	6.04 (imidazol)
Isoleucina	2.32	9.76	
Leucina	2.33	9.74	
Lisina	2.16	9.18	10.79 (epsilon-NH ₃ ⁺)
Metionina	2.13	9.28	
Fenilalanina	2.16	9.18	
Prolina	2.95	10.65	
Serina	2.19	9.21	
Treonina	2.09	9.1	
Triptófano	2.43	9.44	
Tirosina	2.2	9.11	10.13 (fenol)
Valina	2.29	9.74	



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	151/293

Material y Equipo

- Gotero
- Bureta de vidrio con llave de teflón de 25 mL
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Soporte universal
- Pinza para bureta
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Potenciómetro

Reactivos

- Glicina 0.1N
- Hidróxido de sodio, (NaOH) 0.1N
- Ácido Clorhídrico, (HCl) solución concentrada
- Formol neutro
- Aminoácido básico 0.1 N
- Aminoácido ácido 0.1 N

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	152/293

Método

1. Se repartirán a los alumnos las soluciones de los aminoácidos: glicina, el aminoácido básico y el ácido; etiquetados arbitrariamente como aa1, aa2 y aa3; de manera que cada equipo trabaje con un aminoácido sin saber de cuál se trata.
2. Llevar la muestra a pH ácido mediante la adición de gotas de ácido clorhídrico concentrado. En caso de conocer el pKa del aminoácido, llevar 0.2 unidades por debajo de este valor. En caso de desconocer de qué aminoácido se trata, llevar a pH de 1.2 (Fig. 2).



Fig. 2. Adición de HCl.

4. Titular la muestra de 20 mL de aminoácido con una solución de 0.1 N de NaOH hasta llegar a pH 13, tomando lecturas de pH después de cada adición de 0.5 o 1 mL (Fig. 3).



Fig. 3. Titulación de la solución de aminoácido.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	153/293

5. Repetir la titulación con otros 20 mL de aminoácido (previamente llevado a pH 1.5 con HCl) adicionando a cada muestra 10 mL de formol neutro. Registrar el pH de la misma forma que en la primera titulación.

Resultados

- Con los datos obtenidos durante las titulaciones, graficar:
 - o pH contra meq (miliequivalentes) gastados de NaOH.
 - o pH contra meq gastados de NaOH en la titulación del aa en presencia de formol.
- Determinar los pKa's de su aa problema.
- Señalar las diferencias observadas en las curvas de titulación del aa en presencia de formol.
- Realizar todo lo anterior con las otras muestras de aminoácidos trabajadas por los otros equipos.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los aminoácidos básicos? Escriba su estructura a pH ácido.
2. ¿Cuáles son los aminoácidos ácidos? Escriba su estructura a pH ácido.
3. ¿Qué es el pKa? ¿Cómo se obtiene?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	154/293

4. En la gráfica de titulación de un aminoácido, con NaOH y HCl señale dónde se localiza el pKa de cada grupo.
5. ¿Cómo determina el punto isoeléctrico de un aminoácido neutro, de uno ácido y de uno básico?
6. ¿Cómo se aplicaría la ecuación de Henderson-Hasselbach para preparar una solución amortiguadora de pH 4?
7. ¿Cómo esperaría los resultados de la titulación de un aminoácido en presencia de formol? ¿Por qué?

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2008.
2. Blanco D., Garrido A., Teijón J. et al. Fundamentos de Bioquímica estructural. México: Alfaomega; 2005.
3. Fornaguera J, Gómez G. Bioquímica: la ciencia de la vida. Costa Rica: EUNED; 2004.
4. Giraldo G, Loango N, Mejía C. Laboratorio de Bioquímica: una visión práctica. Colombia: Universidad de Quindío; 2010.
5. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 28a ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
6. Quesada S. Manual de experimentos de laboratorio para Bioquímica. Costa Rica: EUNED; 2007.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	155/293

CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS

Objetivos

- ✓ Aplicar la técnica de cromatografía para la separación de una mezcla de aminoácidos.
- ✓ Explicar los fundamentos de la separación en la cromatografía en capa fina.
- ✓ Analizar los factores que modifican la resolución de ésta técnica.

Antecedentes académicos

- ✓ Fundamentos de la cromatografía.
- ✓ Estructura química de los aminoácidos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.
- ✓ Clasificación de los aminoácidos.
- ✓ Pruebas para la identificación de aminoácidos.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	156/293

Introducción

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que conforman la unidad fundamental de las proteínas; poseen dos grupos funcionales característicos: un grupo amino $-NH_2$ y un grupo carboxílico $-COOH$.

En general, todos los aminoácidos de un hidrolizado de proteína son del tipo alfa, que corresponden a la siguiente fórmula general (fig. 1). Un carbono con un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxílico ($-COOH$) y un grupo lateral R (fig. 1).

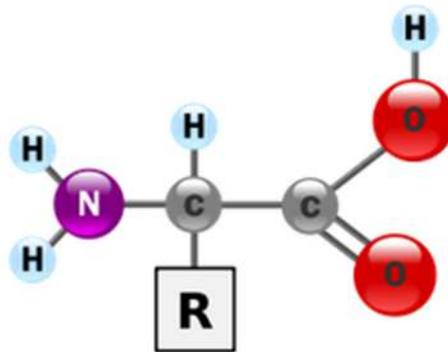


Fig. 1. Estructura general de los aminoácidos.

El grupo R representa el esqueleto carbonado característico del aminoácido en cuestión y que es el que le distingue de los demás.

Los aminoácidos pueden ser clasificados de acuerdo a su carácter ácido o básico. Así podrían ser:

- Neutros: alifáticos, aromáticos, azufrados, secundarios.
- Ácidos.
- Básicos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	157/293

No obstante; tiene más interés y significación para su análisis conformacional, el método de clasificación basado en la polaridad de sus grupos R, cuando se hallan en disolución acuosa en un pH próximo a 7.0 (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de aminoácidos de acuerdo a su polaridad			
	Tipo	Ejemplo	Estructura
Aminoácido	Con grupo R no polares	Alanina (ALA)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Valina (VAL)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \left\} \begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Leucina (LEU)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \left\} \begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Isoleucina (ILE)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
		Metionina (MET)	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$
	Con grupo R polares sin carga	Glicina (GLY)	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Serina (SER)	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Treonina (THR)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Tirosina (TYR)	$\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$
		Glutamina (GLN)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Con grupo R cargados negativamente	Ácido aspártico (ASP)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
		Ácido glutámico (GLU)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Con grupo R cargados positivamente	Lisina (LYS)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \text{NH}_2 \end{array} \left\} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
		Arginina (ARG)	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2\text{N} \end{array}$

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	158/293

Precisamente por sus características de polaridad, los aminoácidos o mezclas de ellos son susceptibles a análisis cromatográficos. Entre los métodos de cromatografía en un plano están la cromatografía en capa fina (CCF) y la cromatografía en papel (CP). En ambos casos se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a la vez es la fase de soporte, o bien, cubre una superficie de vidrio, plástico o metal. La fase móvil se desplaza por la fase estacionaria por acción capilar, a veces ayudada por la gravedad o por la aplicación de un potencial eléctrico.

Por medio de la cromatografía pueden separarse una mezcla de aminoácidos sobre un medio de sostén, los distintos aminoácidos presentes en la mezcla son arrastrados a distintas velocidades sobre un soporte que puede ser papel, sílica gel o una columna con resina adsorbente o de intercambio iónico.

Cuando se utiliza la cromatografía en placa fina, la relación entre la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación sobre la distancia que recorre el eluyente da un valor denominado R_f (razón de frentes), que es característico para cada sustancia y en nuestro caso para cada aminoácido (fig. 2.).

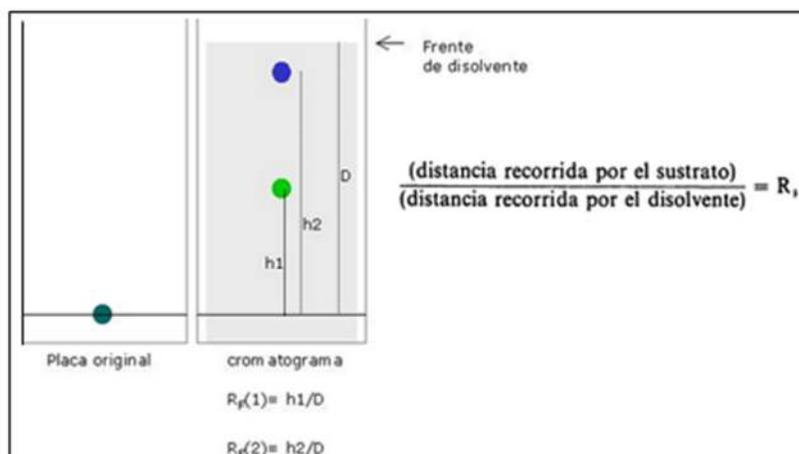


Figura. 2. Representación del cálculo de R_f



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	159/293

Debido a que en general, los aminoácidos son solubles en agua y mucho menos solubles en disolventes orgánicos, los valores de Rf (Tabla 2) se incrementan con el contenido de agua en el eluyente y disminuyen con el aumento de peso molecular y el punto de ebullición del eluyente.

Valores Rf de algunos aminoácidos	
Alanina	0.38
Arginina	0.28
Ácido aspártico	0.24
Ácido glutámico	0.3
Glicina	0.26
Histidina	0.48
Isoleucina	0.85
Leucina	0.73
Lisina	0.14
Metionina	0.4
Fenilalanina	0.71
Serina	0.27
Treonina	0.35
Tirosina	0.47
Valina	0.6

Tabla 2. Valores de Rf de aminoácidos, usando como eluyente butanol-ácido acético-agua en proporción 12:3:5.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	160/293

Material y Equipo

- Placa de vidrio de 20x20 cm
- Estufa
- Papel filtro de poro abierto
- Cámara de elución
- Capilares sin heparina
- Aspersores
- Guantes desechables
- Vaso de precipitado de un litro
- Agitador de vidrio

Reactivos

- Mezcla eluyente. Butanol: Ácido Acético: Agua (4:1:1)
- Soluciones de aminoácidos a una concentración de 1 mg/10 mL
- Mezcla problema de algunos aminoácidos de las soluciones anteriores.
- Solución de ninhidrina al 0.2% (0.2 g/100 mL) en acetona o butanol)
- Sílica gel
- Hidróxido de sodio 0.01N.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	161/293

Método

1. Previamente preparar la placa cromatográfica sobre un vidrio de 20 x 20 cm, colocando una solución espesa de sílica gel en hidróxido de sodio 0.01N y dejar secar (Fig. 3).



Fig. 3. Placa cromatográfica.

2. Activar con anticipación las placas cromatográficas dentro de una estufa a 90°C por 1 hora (Fig.4).



Fig. 4. Estufa para la activación de placas.

3. Con un día de anticipación llenar la cámara de elución con aproximadamente 200 mL de la mezcla eluyente e introducir un cuadro de papel filtro de 20 x 20 cm, con el objetivo de que al usarla se encuentre saturada (Figs.5 y 6).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	162/293



Fig. 5. Llenado de cámara de elución



Fig. 6. Saturación de la cámara

4. Colocar la placa activada sobre una hoja cuadrículada de manera que sirva de referencia para aplicar las muestras 2 cm por encima del borde inferior de la placa (Fig. 7) con la ayuda de un capilar estirado con calor. Las muestras deben tener 2 cm de separación entre sí; después de cada aplicación se deberá esperar a que el estándar o mezcla de aminoácidos seque perfectamente para volver a aplicar. Con la finalidad de ahorrar tiempo para permitir la elución al menos 4 horas, la aplicación de aminoácidos también puede hacerse con anticipación.



Fig. 7. Aplicación de estándares y mezclas de aminoácidos.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	163/293

5. Una vez aplicados los estándares y la mezcla de aminoácidos, colocar la placa dentro de la cámara cromatográfica que a partir de este momento se encontrará fija y nivelada (fig. 8).



Fig. 8. Introducción de la placa dentro de la cámara de elución

6. Dejar correr la elución y sacar las placas de la cámara cuando el eluyente esté aproximadamente 2 cm antes del borde (Fig. 9). Inmediatamente después de sacar las placas, marcar con un lápiz el frente del eluyente (Fig. 10).



Fig. 9. Elución.



Fig. 10. Frente del eluyente.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	164/293

7. Dejar secar las placas en la campana de extracción y después con ayuda de un aspersor aplicar la solución de ninhidrina. Colocar en estufa a 110°C por 10 minutos para revelar la presencia de aminoácidos (Fig. 11).



Fig.11. Manejo de Ninhidrina.

Precaución: La ninhidrina debe manipularse con guantes debido a su toxicidad.

Resultados

- Tomar una fotografía de la placa revelada.
- Calcular los Rf de cada uno de los estándares de aminoácidos y determinar qué aminoácidos contenía la mezcla problema.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	165/293

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las aplicaciones de la cromatografía?
2. Indique cómo realizaría una cromatografía bidimensional.
3. ¿Cuál es la reacción de los aminoácidos con la ninhidrina?
4. ¿Qué otros reactivos pueden utilizarse para desarrollar color en una cromatografía de aminoácidos?
5. ¿Qué ventajas presenta la ninhidrina en comparación de los otros reactivos que desarrollan el color?

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2008.
2. Blanco D, Garrido A, Teijón J, et al. Fundamentos de bioquímica estructural. México: Alfaomega; 2005.
3. Crouch D, Holler F, Skoog D. Principios de análisis instrumental. México: Cengage Learning. 6° ed.; 2008.
4. Aguilar L., Escalante R. Manual de prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2008.
5. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 28a ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2010.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	166/293

SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Objetivos

- ✓ Separar albúmina y globulina a partir de una muestra de sangre.
- ✓ Determinar cuantitativamente por medio de una curva estándar la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas presentes en el plasma por el método de Biuret.

Antecedentes académicos

- ✓ Método de obtención de muestra sanguínea.
- ✓ Diferencias entre suero y plasma sanguíneo.
- ✓ Características generales de anticoagulantes.
- ✓ Clasificación y funciones de las proteínas plasmáticas.
- ✓ Concentración plasmática de las principales proteínas.
- ✓ Principales técnicas de separación y cuantificación de proteínas.
- ✓ Cálculo de diluciones utilizadas en el protocolo de la práctica.

Introducción

La sangre es el fluido corporal más utilizado con fines analíticos; para su extracción existen tres procedimientos habituales, las punciones cutánea, venosa y arterial; cada tipo de extracción proporciona una composición ligeramente diferente.

La composición de la sangre venosa varía según la actividad metabólica del organismo o tejido perfundido por lo que el punto en el que se extrae la muestra puede influir. La



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	167/293

sangre venosa tiene menos oxígeno que la arterial, pero también se diferencia de ésta por el pH, su concentración de dióxido de carbono y su hematocrito. A veces también varían las concentraciones de glucosa, ácido láctico, cloro y amonio.

Las proteínas plasmáticas constituyen un grupo de aproximadamente cincuenta proteínas contenidas en el fluido sanguíneo, para diferenciarlas de las que pueden aparecer de forma transitoria deben cumplir los siguientes requisitos:

- a) Ser secretadas activamente en la sangre.
- b) No derivar de lesiones ni alteraciones de tejidos o células.
- c) Ejercer su función fundamental en el sistema vascular.
- d) Presentar mayor concentración en el plasma que en cualquier otro tejido.

La concentración presente de cada una de las proteínas plasmáticas es muy variable oscilando desde los 0.01 g/100 mL hasta los 5 g/100 mL, siendo el contenido total de proteínas en el plasma de 6–8 g/100 mL. Además, por su importancia las proteínas plasmáticas se clasifican en tres grupos principales: albúmina, globulinas y fibrinógeno. Para la obtención y separación de las proteínas plasmáticas se hace uso de varias técnicas acordes a sus propiedades, como son: tamaño, solubilidad, forma molecular, especificidad inmunológica y carga eléctrica, entre otras.

La albúmina se sintetiza en forma de proalbúmina en el retículo endoplasmático del hígado. Transporta tanto sustancias anionicas como catiónicas, entre las que cabe destacar la bilirrubina, fármacos como el ácido acetilsalicílico, aminoácidos como el triptófano y algunas hormonas esteroideas y tiroideas. Su otra gran función es la del mantenimiento del volumen vascular, a ella se debe el 80% de la presión osmótica del plasma al existir unas 17 cargas negativas en su estructura a pH fisiológico. Las globulinas en conjunto representan aproximadamente el 38% del total de las proteínas plasmáticas, algunas de sus funciones son el transporte de lípidos y la secreción de anticuerpos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	168/293

En la presente práctica obtendremos de forma directa la concentración de proteínas totales y albúmina mediante el método de Biuret, el cual se basa en la formación de un compuesto de color violeta provocado por la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos en medio alcalino presentando un máximo de absorción a 540 nm. Para obtener la albúmina eliminaremos las globulinas con la técnica de precipitación por salado (salting out), la diferencia del contenido de proteínas totales y albúmina será la cantidad aproximada de globulinas que fueron eliminadas.

Material y Equipo

- Probeta graduada de 10 mL.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Gradilla.
- Termómetro.
- Tubo Vacutainer® con anticoagulante (EDTA).
- Aguja para Vacutainer®.
- Papel parafilm.
- Tubos de ensayo de 13 X 100.
- Tapón para tubo de 13 X 100 de neopreno o similar.
- Marcador indeleble de punta extrafina.
- Micropipetas p20, p200, p1000y p5000, microlitros.
- Pipetas de 0.2, 1 y 5 mL.
- Puntas nuevas para las micropipetas.
- Pipetas Pasteur.
- Centrífuga.
- Balanza analítica.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	169/293

- Espectrofotómetro.
- Parrilla de calentamiento o estufa.
- Baño María a 35 °C.

Reactivos

- Solución de sulfato de sodio al 23% P/V en agua.
- Eter etílico.
- NaOH 0.1 N.
- Solución estándar de albúmina 350 mg/100 mL de NaOH 0.1 N.
- NaOH 1 N.
- Reactivo de Biuret.
 - Pesar 4.5 g de tartrato doble de sodio y potasio, 2.5 g de yoduro de potasio y 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado. Disolver por separado en vasos con aproximadamente 50 mL de agua destilada. De ser necesario calentar para disolver. Una vez disueltos los tres reactivos dejar enfriar. Colocar en un matraz aforado de 500 mL, 100 mL de NaOH 1 N, después agregar en orden cada una de las soluciones (el cobre al final) mezclar cuidadosamente después de cada adición y aforar con agua destilada. Se conserva en un frasco ámbar.

Método

1. Obtener una muestra sanguínea (3-5 mL) por venopunción con un sistema Vacutainer® usando como anticoagulante (EDTA).
 - a. Preparar el material: tubos, ligadura, torundas, aguja estéril y dispositivo Vacutainer® para fijarla.
 - b. Identificar el tubo.
 - c. Colocar adecuadamente al donador.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	170/293

- d. Solicitar al paciente que cierre al puño para que las venas resulten más palpables.
 - e. Seleccionar la vena adecuada para la punción.
 - f. Limpiar la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol isopropílico al 70%, o yodopovidona al 1%. Se comienza en el punto de la punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento en espiral.
 - g. Aplicar si es necesario un torniquete varios centímetros por encima de la zona de punción. No dejarlo más de un minuto.
 - h. Fijar la vena tanto por encima como por debajo del lugar de punción, con ayuda de los dedos pulgar y medio o índice y pulgar.
 - i. Realizar la venopunción penetrando la piel con la aguja formando un ángulo de 15° con el brazo y con el bisel hacia arriba se sigue la dirección de la vena; introducir la aguja con suavidad pero con rapidez para reducir las molestias. No hay que “enterrar” la aguja. En cuanto la aguja haya penetrado en la vena se dirigirá el tubo todo lo posible hacia delante apoyándose en el dispositivo de sujeción (de la misma forma en que se introduce el émbolo de una jeringa). Al mismo tiempo mantenga firmemente la aguja en su lugar. Una vez que se haya llenado el tubo, se retira tomándolo por su extremo y tirando suavemente de él. Se mezcla la sangre con el anticoagulante por inversión suave del tubo de 8 a 10 veces. Cuando la sangre comienza a fluir se libera el torniquete. Una vez obtenida la muestra, hay que indicar al paciente que relaje el puño y que no “bombee” con la mano.
 - j. Coloque suavemente una torunda de algodón sobre el punto de punción. Se extrae la aguja (con un movimiento rápido) y a continuación se ejerce presión sobre la zona. NO aplique masaje.
 - k. Mezclar suavemente el tubo por inversión.
2. Centrifugar el tubo a 3000 rpm durante 5 minutos y separar con cuidado el plasma.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	171/293

- Colocar 0.25 mL de plasma en un tubo de ensayo, adicionar 4.75 mL de sulfato de sodio al 23% P/V. Tapar y mezclar por inversión tres veces. Tomar 1 mL de la suspensión y colocarlo en un tubo, etiquetar como proteínas totales. Agregar 1.5 mL de éter etílico al resto de la suspensión, tapar y mezclar por inversión (sin agitar), centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
- Después de centrifugar, tomar 1 mL de la capa inferior y colocarlo en un tubo, etiquetar como albúminas.
- Preparar 8 tubos y numerarlos del 1 al 7 y a otro nombrarlo blanco (tabla 1). Agregar a cada tubo lo indicado e incubar el tiempo mencionado.
- Leer en el espectrofotómetro a 540 nm y registrar los valores.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	173/293

Resultados

- Grafique la curva estándar con los resultados de absorbancia de los tubos 1 al 5, contra la concentración de albúmina en masa contenida en los mismos.
- Interpole las absorbancias de los tubos de proteínas totales y albúmina para obtener su concentración en masa dentro de cada tubo.
- Determine la concentración de proteínas totales y albúmina contenida en 100 mL de plasma tomando en cuenta las diluciones de la muestra.
- Calcule la concentración de globulinas que fueron eliminadas de las proteínas totales.

Cuestionario

1. Mencione las funciones de las principales proteínas plasmáticas.
2. Si utilizara el método de Lowry para detectar las proteínas plasmáticas ¿diluiría más la muestra? Si o no y por qué.
3. Escriba la reacción del cobre contenido en el reactivo de Biuret con el nitrógeno de los enlaces peptídicos en un medio alcalino.
4. ¿Qué propiedades de las globulinas se utilizan para separarlas de las proteínas totales?
5. Mencione dos técnicas diferentes a las usadas para determinar proteínas y explique sus fundamentos.
6. ¿Por qué razón se usa anticoagulante?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	174/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2008.
2. Jain, B. P., Pandey, S., & Goswami, S. K. (2024). Protocols in biochemistry and clinical biochemistry. Elsevier.
3. Toma de muestra sanguínea.
https://www.msmanuals.com/es/professional/cuidados-cr%C3%ADticos/c%C3%B3mo-hacer-procedimientos-vasculares-perif%C3%A9ricos/c%C3%B3mo-hacer-una-muestra-de-sangre-venosa#Contraindicaciones_v50241973_es Recuperado el 30 de junio de 2025
4. Delgado Arcaño, Y. (2021). Bioquímica Clínica para Ciencias de la Salud (p. 95). Ediciones Mawil.
5. Sari, N. P. Y. P., Amril, A., & Muttaminnah. (2024). Total protein examination using the Biuret method. IJSCIA, 5(6), 1081–1085.
6. Yong, S., Ng, C. Y., Liu, H., Chen, Y., Liu, Q., Teo, T. L., & Sethi, S. K. (2024). Expedient measurement of total protein in human serum and plasma via the biuret method using fiber optic probe for patient samples and certified reference materials. Analytical and bioanalytical chemistry, 416(28), 6611-6620.
7. Liu, B., Dong, D., Wang, Z., Gao, Y., Yu, D., Ye, S., & Li, C. (2022). Analysis of influencing factors of serum total protein and serum calcium content in plasma donors. PeerJ, 10, e14474.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	175/293

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Objetivos

- ✓ Separar las proteínas plasmáticas, mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) en un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD.
- ✓ Manejar adecuadamente el equipo y reactivos necesarios para realizar la electroforesis PAGE-SDS.
- ✓ Identificar el tipo de proteína al que corresponden cada una de las bandas observadas en el gel de electroforesis.

Antecedentes académicos

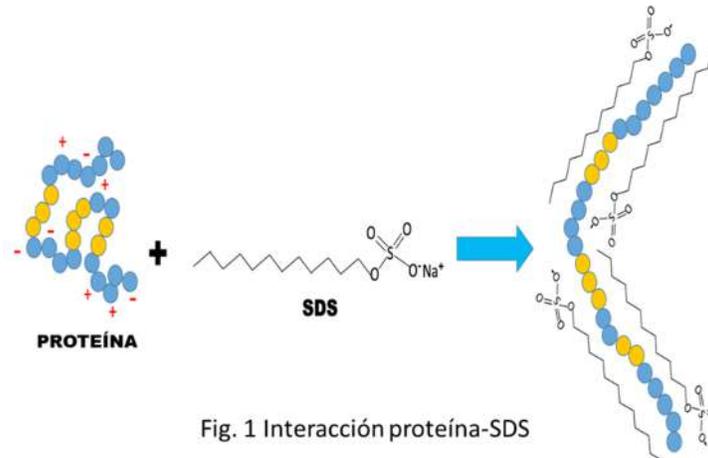
- ✓ Estructura y carga eléctrica de las proteínas
- ✓ Métodos de purificación de proteínas
- ✓ Fundamento de la técnica de electroforesis
- ✓ Componentes proteicos del plasma y suero de la sangre

Introducción

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) es un método de separación de proteínas que utiliza un detergente aniónico

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	176/293

(dodecilsulfato de sodio, SDS) el cual interacciona con las proteínas en una proporción aproximada de 1.4 gramos de SDS por cada gramo de proteína, independientemente de la secuencia de aminoácidos. Esta interacción además de desnaturalizar a las proteínas rompiendo todas las interacciones débiles presentes, las recubren con carga negativa (fig.1).



El método es aplicado para separar proteínas en muestras complejas. La interacción del detergente con las diferentes proteínas que conforman la muestra, es proporcional al tamaño de cada una de ellas, por lo que a mayor número de aminoácidos mayor número de cargas negativas. Esta relación genera que independientemente del tamaño de las proteínas, la relación carga/masa sea constante y en consecuencia, sean separadas, al responder a un campo eléctrico, en función de su peso molecular.

La mezcla de proteínas es colocada en un pozo en uno de los extremos de un gel de poliacrilamida (fig. 2), el cual es sumergido en un buffer adecuado (buffer de migración) que permite el paso de corriente eléctrica a través del gel, moviendo a las proteínas que ahora presentan carga negativa.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	177/293

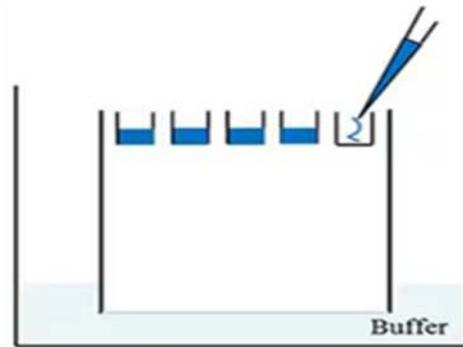


Fig. 2. Colocación de las proteínas a separar en el pozo del gel de poliacrilamida

El gel es sometido a un campo eléctrico, bajo el cual las proteínas más pequeñas avanzan más rápido que las proteínas grandes que encuentran mayor resistencia en su paso a través de la red tridimensional que conforma el gel de poliacrilamida (fig. 3).

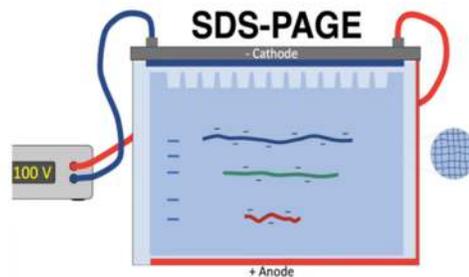


Fig. 3 Separación en función del peso molecular de las proteínas

Para conocer el peso molecular de las proteínas separadas, es necesario incluir en el gel una referencia. Se utiliza un marcador de peso molecular, el cual consiste en una mezcla de proteínas de peso molecular conocido, las cuales, al migrar, dejan un determinado patrón de bandas contra el cual se compara cada una de las bandas de proteínas separadas de la muestra problema. Cabe mencionar que existe una gran diversidad de opciones de marcadores de peso molecular para electroforesis, eligiéndose según las necesidades (fig. 4).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	178/293

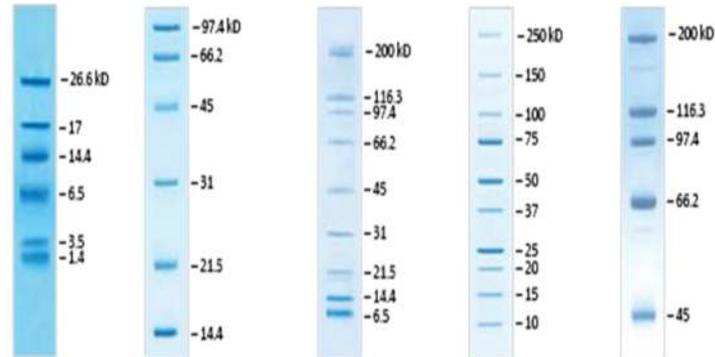


Fig. 4. Ejemplos de diferentes rangos de marcador de peso molecular.

El gel es incoloro, y las proteínas también, por lo que para monitorear tanto la aplicación de la muestra, como el avance de la electroforesis, es necesario el uso del buffer de carga, un buffer tris-HCl-glicina que contiene diferentes componentes que permiten: primero, la desnaturalización completa de las proteínas al romper los puentes disulfuro y las interacciones débiles (agente reductor y SDS), además de proveer de determinada densidad a la muestra (glicerol) con la que adquiere la consistencia adecuada para su aplicación en el gel de poliacrilamida (fig. 5), y la tinción de la muestra (azul de bromofenol) cuya presencia facilita la aplicación y permite monitorear el frente de la electroforesis sin riesgo de perder la muestra (fig. 6).

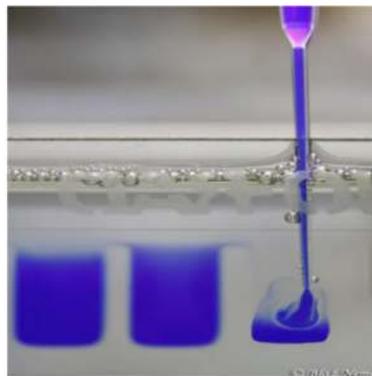


Fig. 5. Aplicación de la muestra, facilitado por la composición del buffer de carga

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	179/293

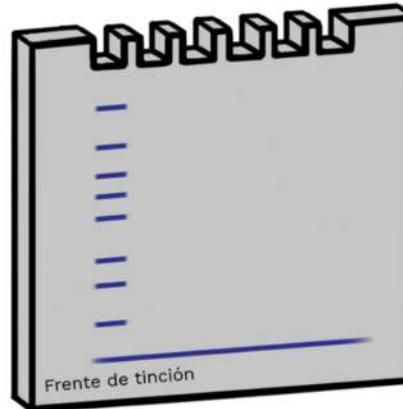


Fig. 6. Función del buffer de carga en el monitoreo del frente de migración.

Al término de la electroforesis, las proteínas distribuidas en el gel, de acuerdo a su reparto en éste por su peso molecular, son transparentes (fig. 7), por lo que el gel debe someterse a un proceso de tinción, que permite revelarlas, para ser identificadas. El método de tinción más común es el azul de Coomassie, el cual utiliza el colorante azul de Coomassie R-250 o azul de Coomassie G-250.



Fig. 7. Gel SDS-PAGE al final de la migración, se aprecia el frente de migración pero no las proteínas.

Para la tinción, el gel se sumerge en una solución de azul de Coomassie, el cual se une a las proteínas a través de interacciones electrostáticas. Esta interacción es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente, por lo que la intensidad del color azul

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	180/293

resultante es proporcional a la concentración de proteína presente, presentando un límite de detección de aproximadamente 0.1-0.5 μg de proteína. En este paso todo el gel es azul, (fig. 8 A).

El proceso de tinción requiere de un paso de destinción, en el cual elimina el exceso de colorante hasta que las bandas de proteínas se hagan visibles contra un fondo claro (fig. 8 B).

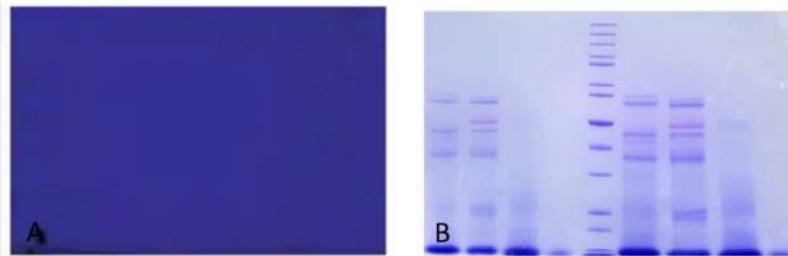


Fig. 8. Gel SDS-PAGE A) al final de la tinción B) al final de la destinción.

El gel teñido se puede fotografiar o escanear para documentar los resultados y, en algunos casos, las intensidades de las bandas se pueden utilizar para estimar la cantidad de proteína presente.

La electroforesis SDS-PAGE es una herramienta útil para el análisis de proteínas, con numerosas aplicaciones en diversas áreas de la ciencia y la medicina. Es fundamental para el análisis de mezclas proteicas complejas, verificación de pureza, estimación de pesos moleculares, y en estudios de expresión génica y proteómica.

Además del SDS-PAGE, existen otros tipos de electroforesis de proteínas como: la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (NATIVE-PAGE), la cual aprovecha la carga intrínseca de las proteínas a separar, el isoelectroenfoco (IEF), que permite la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico. La



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	181/293

electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE), la cual usa dos propiedades para separar a las proteínas, su punto isoeléctrico y su peso molecular.

El plasma sanguíneo es una muestra compleja, conformado por una gran diversidad de proteínas que desempeñan funciones vitales en el cuerpo, incluyendo el transporte de sustancias, el soporte del sistema inmunológico y la regulación de diversas funciones fisiológicas. De acuerdo a su patrón de migración electroforética, estas proteínas pueden agruparse en:

- a) albúmina (constituye el 55% del total de las proteínas plasmáticas con una cantidad aproximada de 4 g/100 mL).
- b) α 1-globulinas: α 1-glicoproteína ácida, α 1-antitripsina, α 1-fetoglobulina, α 1-antiquimiotripsina, transcortina, inhibidor inter- α 1- de la tripsina, proteína transportadora de retinol, α 1-lipoproteínas, α 1-B y α 1-T glicoproteínas (5% del total, de 0.3-0.6 g/100 mL).
- c) α 2-globulinas: haptoglobina, α 2-macroglobulina, ceruloplasmina, hemopexina y transferrina (9% del total, de 0.4-0.9 g/100 mL).
- d) β -globulinas: β -globulina ligadora de esteroides, β 2-microglobulina, fibrinógeno, β 1-glicoproteína específica del embarazo, β -lipoproteínas y proteína C reactiva (13% del total, de 0.6-1.1 g/100 mL).
- e) γ -globulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE (11% del total, de 0.7-1.5 g/100 mL) (fig. 9).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	182/293

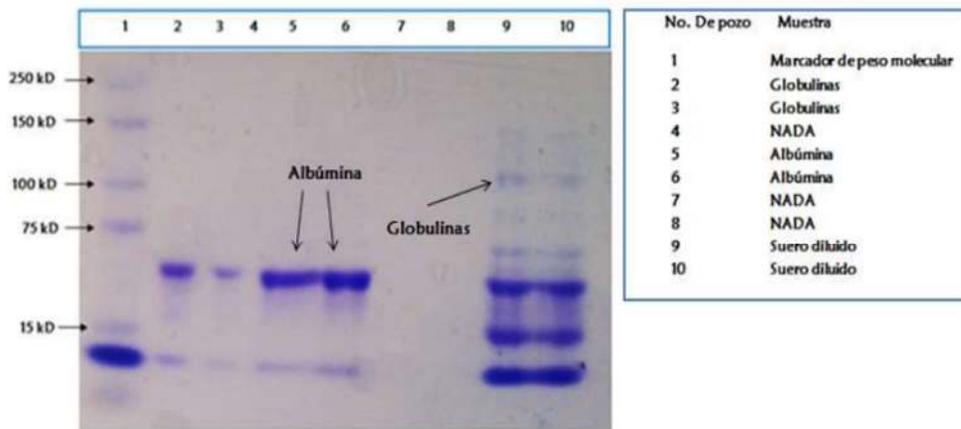


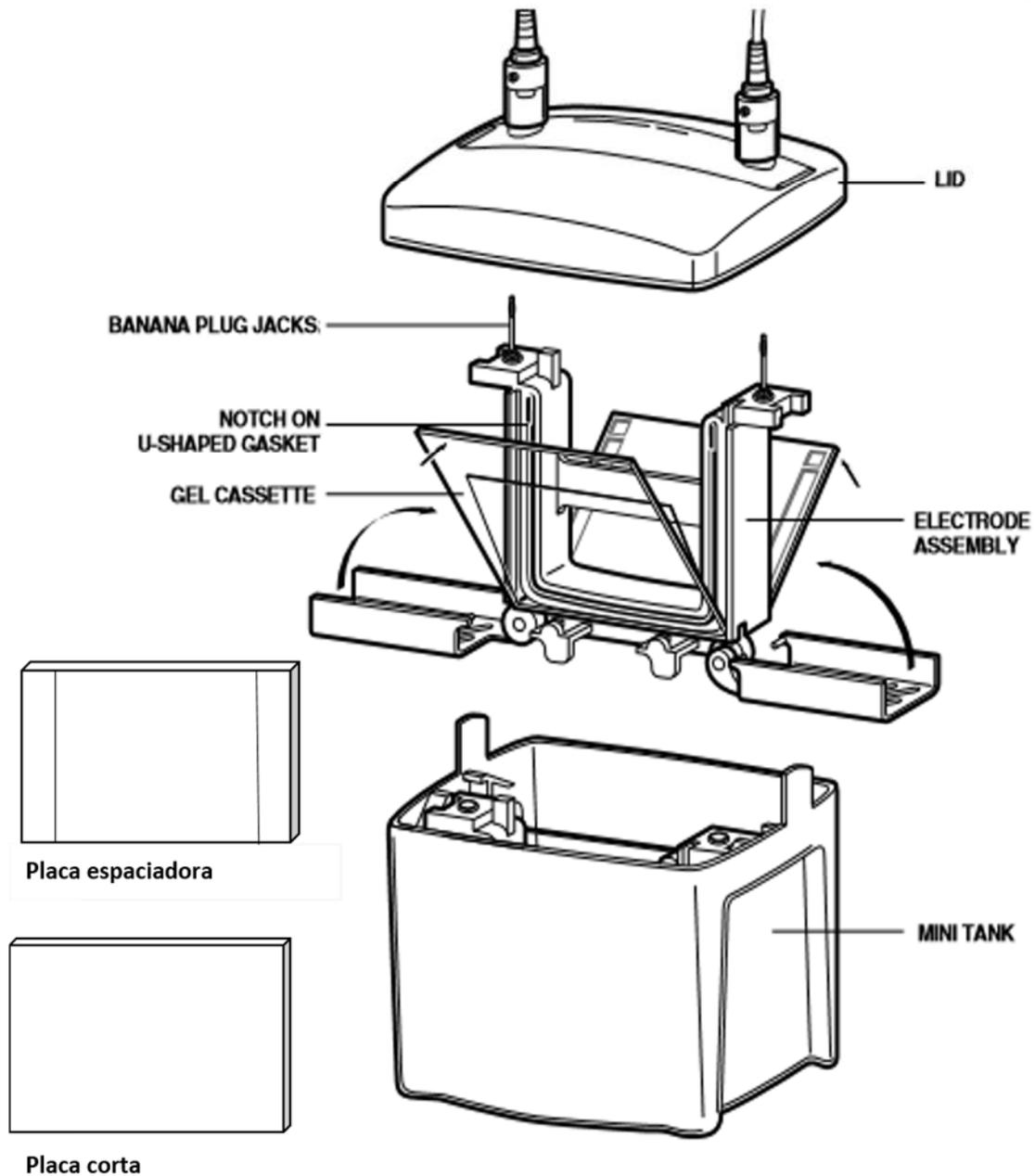
Fig. 9. Gel SDS-PAGE teñido. Se observan los principales grupos de proteínas repartidas en el gel.

Hay otras proteínas, cuya abundancia se encuentran por debajo del límite de sensibilidad del método, por lo que de ser de interés se debe hacer un paso de enriquecimiento de las proteínas de interés y depleción de las proteínas más abundantes para evitar que éstas enmascaren a las de menor abundancia.

Para realizar la electroforesis se utilizará una cámara BIO RAD Modelo Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems (Esquema 1).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	183/293

Esquema 1. Cámara de electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD y partes que la componen.



Nota: Esquema sacado del manual de BIO-RAD



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	184/293

Material y Equipo

- Micropipetas de p20, p200, p1000 y p5000.
- Puntas nuevas para cada tipo de micropipeta.
- Puntas especiales para electroforesis vertical para micropipeta de p20.
- Guantes, Cubrebocas.
- Tubos eppendorf.
- Balanza analítica.
- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems.
- Fuente de poder.
- Regla y plumón negro, Papel filtro.
- Tubos de plástico con tapa de 15 mL de capacidad.
- Gradilla.
- Vasos de precipitados.
- Recipiente rectangular de plástico.
- Agitador orbital

Reactivos

- **Hidróxido de sodio 1 N.** Pesar 0.4 g de hidróxido de sodio en la balanza analítica. Colocar aproximadamente 30 mL de agua destilada en un matraz aforado de 100 mL y colocar el hidróxido, disolver y aforar con agua destilada.
- **Plasma sanguíneo** en dilución 1:15.
- **Dilución de albúmina** 1:10.
- **Dilución de albúmina estándar** 1:20.
- **Dilución de globulinas** 2:10.
- **Dilución de proteínas totales** 2:20.
- **Marcador de peso molecular para proteínas.**



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	185/293

- **TRIS 1.5M (pH 8.8).** Pesar 18.2 g de TRIS, disolver en aproximadamente 75 mL de agua, ajustar a pH 8.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.
- **TRIS 1M (pH 6.8).** Pesar 12.1 g de TRIS, disolver en aproximadamente 75 mL de agua, ajustar a pH 6.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.
- **Duodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%.** Pesar 1 g de SDS y disolver en 10 mL de agua destilada.
- **Persulfato de amonio al 10%.** Pesar 0.5 g de persulfato de amonio y adicionar 5 mL de agua destilada, hacer alícuotas de 1 mL y guardar en congelación.
- **Mezcla acrilamida-bisacrilamida (30%).** Pesar 0.8 g de bisacrilamida y 30 g de acrilamida. Disolver la bisacrilamida en 100 mL de agua destilada, una vez disuelta se adicionan los 30 g de acrilamida y se calienta el matraz hasta que se haya disuelto la acrilamida. **Ambos reactivos son altamente tóxicos, usar cubrebocas y guantes durante su manipulación.**
- **Buffer de electroforesis 5X o buffer de migración.** Pesar 2.5 g de SDS, 72 g de glicina y 15.15 g de TRIS. Disolver primero SDS en 800 mL de agua, a continuación, adicionar la glicina y el TRIS. Ajustar el pH a 8.3 con HCl y aforar a 1000 mL.
- **Buffer de Laemli o buffer de carga.** Usar 6.6 mL de TRIS 1M pH 6.8, 0.21 g de SDS, 0.001 g de azul de bromofenol, 2.63 mL de glicerol y 0.5 mL de mercaptoetanol. Completar a 10 mL con agua destilada. **Se puede usar DTT al 0.1 M, en una proporción de 12.5 µL de buffer de Laemli y añadir 2.5 µL de DTT a cada 25 µL de muestra, en lugar del mercaptoetanol. NOTA: Si se cuenta con buffer de Laemli 2X Bio-Rad® catálogo 161-0737 agregar 5 µL de β-mercaptoetanol por cada 100 µL de Buffer.**

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	186/293

- **Solución azul de Coomassie R-250 al 0.1%.** Pesar 0.1 g de azul de Coomassie y disolverlo en una solución de metanol-ácido acético-agua 50:7:43.
- **Solución desteñidora.** Mezclar 500 mL de metanol, 20 mL de ácido acético y 480 mL de agua destilada.
- **Tetrametiletileno-diamina (TEMED).**
- **Mercaptoetanol o DTT** al 0.1 M.

Material Biológico

- Plasma sanguíneo

Método

1. Montaje para la preparación de los geles de poliacrilamida.

- Localizar las partes que integran el módulo para montaje de geles (fig.10)

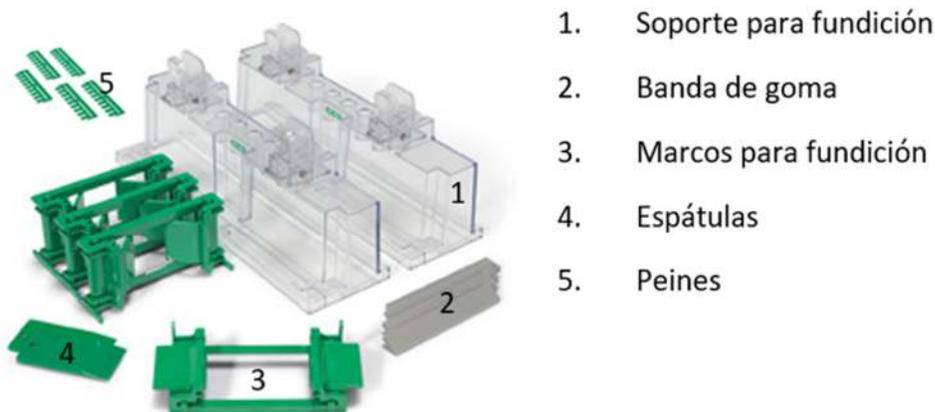


Fig. 10. Componentes y módulo para la elaboración de geles de poliacrilamida

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	187/293

- b. Colocar la banda de goma en la parte inferior del soporte para polimerización (fig. 11).



Fig. 11 Soporte de polimerización con banda de goma.

- c. Limpiar la placa corta y placa espaciadora con un poco de agua destilada (fig. 12).

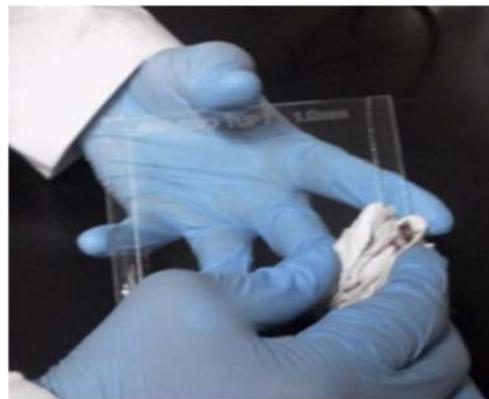


Fig. 12. Limpieza de placas.

- d. Marcar en la placa corta el límite entre el gel concentrador y el gel separador, colocando el peine en el extremo de la placa corta y con ayuda de un plumón realizar una marca un centímetro debajo del límite del peine (fig. 13).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	188/293

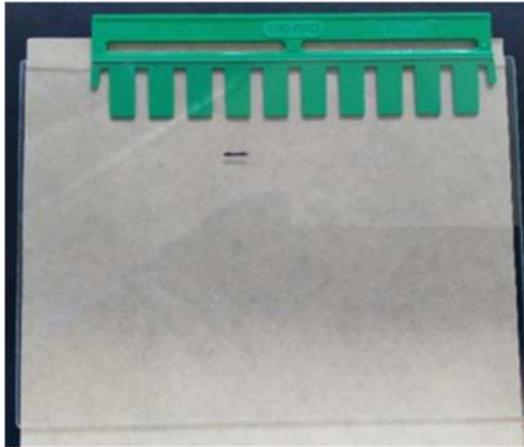


Fig. 13. Placa corta con marca.

- e. Alinear ambas placas, de manera que las muescas de la placa espaciadora queden hacia dentro (fig. 14) y colocar dentro de los marcos de polimerización, cuidando que no se desalineen las placas (fig. 15).

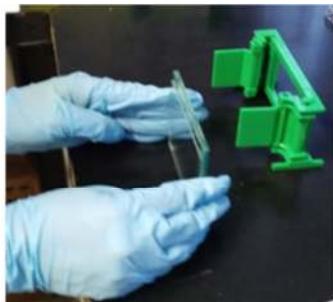


Fig. 14. Alineación de las placas



Fig. 15. Marcos de polimerización con placas

- f. Colocar los marcos de polimerización que contienen las placas en el módulo de polimerización (fig. 16). **Cuidar que las placas queden completamente selladas sobre la banda de goma.**

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	189/293

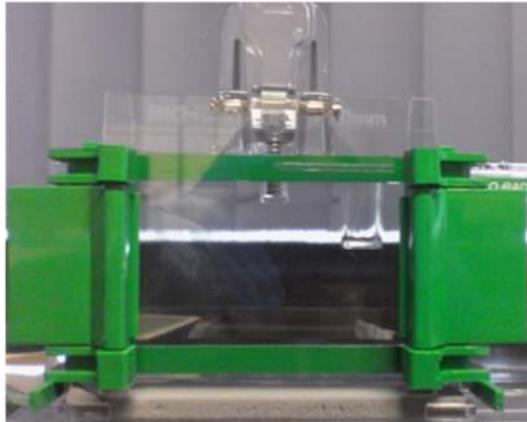


Fig. 16. Marcos de polimerización con placas en el módulo.

2. Preparación de gel para electroforesis PAGE-SDS.

El gel está conformado por dos secciones (gel concentrador y gel separador), cada uno de los cuales presenta diferente tamaño de poro (controlado con el % de acrilamida) y diferente pH, ambas características favorecen la migración de las proteínas en determinado sentido.

- a. Preparar el gel separador en un tubo de plástico con tapa de 15 mL con las cantidades expresadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Orden de adición y cantidades para preparación de gel separador.

Reactivos	Gel separador 10% (10 mL)
Agua destilada	4.0 mL
Acrilamida-bisacrilamida 30%	3.3 mL
TRIS 1.5 M pH 8.8.	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL
TEMED	0.004 mL

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	190/293

- b. Mezclar rápidamente y adicionar la mezcla entre las dos placas (fig. 17) hasta alcanzar la marca puesta en la placa corta. Colocar una capa de agua destilada sobre el gel, la cual evitará la entrada de aire, favoreciendo la polimerización del gel (fig. 18). **Si no se vierte la mezcla con rapidez el gel puede polimerizar en el tubo.**



Fig. 17. Adición del gel separador en las placas.

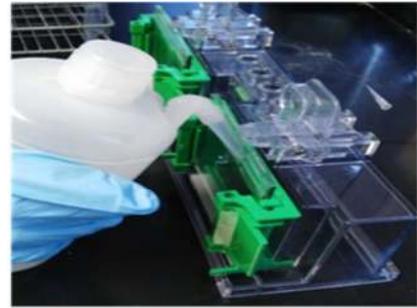


Fig. 18. Adición de la capa de agua

- c. Cuando el gel separador haya polimerizado, vaciar la capa de agua con cuidado en la tarja (Fig. 19) y quitar el exceso de agua con papel filtro (fig. 20). **Usar la solución sobrante en el tubo como referencia para monitorear la polimerización.**



Fig. 19. Retirar la capa de agua.

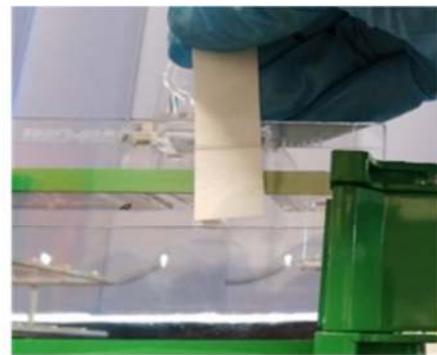


Fig. 20. Retirar exceso de agua .

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	191/293

- d. Preparar el gel concentrador en un tubo de plástico con tapa de 15 mL con las cantidades expresadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Orden de adición y cantidades para preparación de gel concentrador.

Reactivos	Gel concentrador 5% (5 mL)
Agua destilada	3.4 mL
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0.83 mL
TRIS 1 M pH 6.8.	0.63 mL
SDS 10%	0.05 mL
Persulfato de amonio 10%	0.05 mL
TEMED	0.005 mL

NOTA: El gel separador y el gel concentrador pueden prepararse al mismo tiempo, pero sin añadir el TEMED al gel concentrador hasta que el gel separador haya polimerizado.

- e. Mezclar rápidamente y adicionar la mezcla entre las dos placas, llenando hasta el ras (Fig. 21), colocar el peine evitando la entrada de aire (Fig. 22). Si no se vierte la mezcla con rapidez el gel puede polimerizar en el tubo.



Fig. 21. Adición del gel concentrador.



Fig. 22. Colocación de peine para la formación de los pocillos.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	192/293

- f. Cuando el gel concentrador haya polimerizado retirar el peine con cuidado de no romper los pocillos formados. Usar el gel sobrante del tubo como patrón para observar la polimerización.
- g. Retirar los marcos para fundición del soporte para fundición (Fig. 23) y posteriormente retirar las placas de los marcos de fundición con cuidado de no desalinearse las placas, para evitar la entrada de aire (Fig. 24).

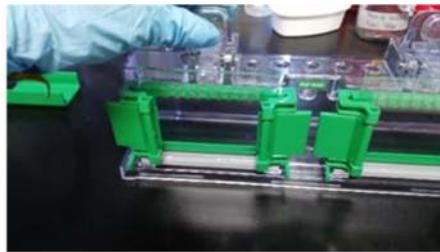


Fig. 23. Retirar marco con las placas del módulo de polimerización.

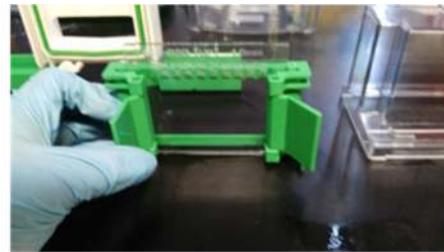


Fig. 24. Retirar las placas con el gel del marco.

- h. Colocar las placas que contienen el gel en el ensamble de electrodos y ajustar (fig. 25), posteriormente, colocarlos en el tanque de electroforesis (Fig. 26). **La placa corta debe quedar hacia el interior para permitir cerrar el circuito. De no alinear adecuadamente las placas, pueden romperse al ajustarse en el ensamble de electrodos.**



Fig. 25. Gel en ensamble de electrodos.



Fig. 26. Ensamble dentro de tanque.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	193/293

- i. Llenar la cámara interior con buffer de electroforesis 1X hasta el ras de la placa espaciadora, cubriendo totalmente los pocillos (Fig. 27), posteriormente llenar el tanque de electroforesis con buffer de electroforesis 1X (Fig. 28).

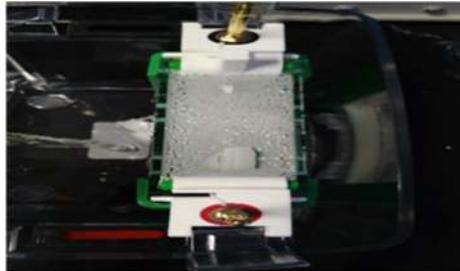


Fig. 27. Llenado de cámara.

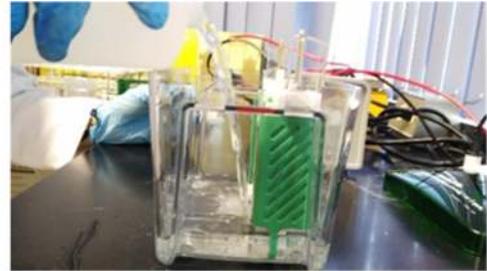


Fig. 28. Llenado de tanque.

NOTA. El buffer de electroforesis 1X debe de estar frío y el tanque de electroforesis se llenará según la cantidad de geles en migración siguiendo las marcas en el tanque.

3. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas.

- a. Diluir las muestras según la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas

Muestra	Cantidad de muestra	Volumen añadido de NaOH 0.1N
Plasma	10 μ L	140 μ L
Proteínas totales	10 μ L	90 μ L
Albúmina	20 μ L	80 μ L
Albúmina estándar	5 μ L	95 μ L
Globulinas	20 μ L	80 μ L

- b. Tomar 20 μ L de cada muestra diluida por separado (plasma, proteínas totales y albúmina) adicionar a cada una 12.5 μ L de buffer de Laemli y mezclar, hervir

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	194/293

inmediatamente durante cinco minutos en baño María y cubrir de la luz cuando se retiren las muestras del baño María y colocar en un baño de hielo (cuidar que las muestras no se congelen).

Nota: Las diluciones son poco estables por lo que es importante realizarlas el mismo día que se correrán las muestras o máximo un día antes.

- c. Con ayuda de una micropipeta p20 tomar 8 μL de marcador de peso molecular para proteínas y colocarlos en el primer pocillo, en los siguientes pocillos colocar 25 μL de cada una de las muestras, si es posible usar un blanco de reactivos (Fig. 29 y 30). Usar las puntas especiales para electroforesis vertical.

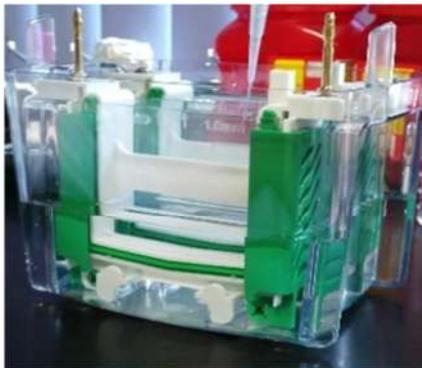


Fig. 29. Cargado de muestras en gel.



Fig. 30. cámara con geles cargados.

- d. Al terminar de cargar los geles colocar la tapa del tanque de electroforesis, conectar los electrodos a la fuente de poder, usando los colores como guía, y correr las muestras a 87 V por aproximadamente 30 min, permitiendo que las muestras queden alineadas. Una vez transcurrido el tiempo aumentar la corriente a 110-125 V y correr las muestras por aproximadamente 3 h (fig. 31). **Supervisar el proceso para evitar que el frente de corrimiento salga del gel.**

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	195/293

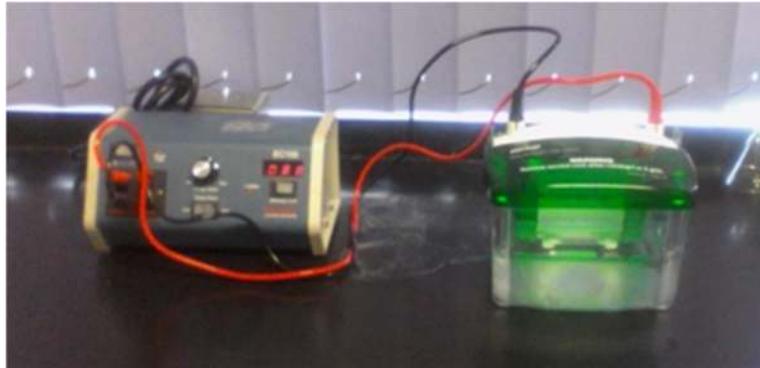


Fig. 31. Cámara conectada a la fuente de poder.

- e. Una vez transcurrido el tiempo, apagar la fuente de poder, desconectar los electrodos de la fuente de poder, quitar la tapa del tanque de electroforesis sacar el ensamble de electrodos y vaciar el buffer de electroforesis de la cámara interior.

4. Tinción del gel de electroforesis resultante.

- a. Desmontar las placas del ensamble de electroforesis, retirar con ayuda de una espátula (fig. 32) la placa corta, cuidando de no romper el gel o rayar el vidrio, retirar el gel concentrador con la misma espátula. **Realizar lo anterior en un recipiente que contenga buffer de electroforesis 1X.**



Fig. 32. Recuperación del gel de las placas.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	196/293

- b. Retirar el gel separador de la placa espaciadora y dejar en el buffer de electroforesis 1X. Retirar el buffer y añadir solución de azul de Coomassie al recipiente y dejar en tinción el gel durante 30 min, en agitación constante (fig. 33).



Fig. 33. Tinción con azul de Coomassie.

- c. Retirar la solución de azul de Coomassie y colocar el gel en solución desteñidora, durante aproximadamente 1 h, cambiando la solución desteñidora ocasionalmente (fig. 34).



Fig. 34. Destinción de gel.

- d. Retirar la solución desteñidora y observar las bandas presentes en el gel de electroforesis.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	197/293

Resultados

- ❖ Comparar las bandas obtenidas en el gel de electroforesis contra la escalera del marcador de peso molecular.
- ❖ Investigar el peso molecular esperado de las proteínas plasmáticas y analizar si coinciden con los pesos moleculares determinados por comparación con la escalera del marcador de peso molecular.

Cuestionario

1. ¿Qué significa que una electroforesis se realice en condiciones desnaturalizantes? ¿Qué reactivos se utilizan para lograrlo?
2. ¿Cuál es la función del SDS (dodecil sulfato sódico) en esta técnica?
3. ¿Por qué es importante añadir un agente reductor como el β -mercaptoetanol o el DTT a las muestras proteicas?
4. ¿Qué diferencias existen entre un gel de agarosa y un gel de poliacrilamida en cuanto a su uso y resolución?
5. ¿Qué ocurre al modificar la concentración del gel?
6. ¿Qué tipo de información se puede obtener al analizar un gel teñido con azul de Coomassie?
7. ¿Qué controles positivos o marcadores moleculares se utilizan comúnmente en SDS-PAGE y para qué sirven?
8. ¿Cómo se puede cuantificar la concentración de proteínas a partir del gel obtenido en una electroforesis de proteínas?
9. ¿Qué aplicaciones tiene esta técnica en investigación biomédica o biotecnológica? Menciona al menos dos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	198/293

Referencias

- García HP. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnóstico [Internet].2000. [citado mayo 2015];1(2): pp. 31-41. Disponible desde: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.html
- Merck KGaA. (s.f.). Introduction to SDS-PAGE: Separation of proteins based on molecular weight. Sigma-Aldrich. Recuperado el 26 de junio de 2025, de: <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page>
- SDS PAGE. Recuperado el 30 de junio de 2025 de: https://espanol.libretexts.org/Biologia/Biotecnologia/Manual_de_Laboratorio%3A_Introducci%C3%B3n_a_la_Biotecnolog%C3%ADa/01%3A_T%C3%A9cnicas/1.1_5%3A_SDS-PAGE
- Hoffman, R., Benz, E. J., Silberstein, L. E., Heslop, H., Weitz, J., & Salama, M. E. (Eds.). (2022). Hematology E-Book: Basic Principles and Practice. Elsevier Health Sciences.
- Rose, N. R., Hamilton, R. G., & Detrick, B. (Eds.). (2021). Manual of Clinical Laboratory Immunology (15th ed.). ASM Press.
- Rifai, N., Chiu, R.W.K., Young, I., Wittwer, C.T. (2023). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Health Sciences.
- Práctica 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Universidad Miguel Hernández, Alicante, España. Recuperado el 30 de junio de 2025 de: https://shaker.umh.es/jmgr/PDF/p5_print.pdf



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	199/293

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE GERMEN DE TRIGO

Objetivos

- Analizar el fundamento de la obtención y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN).
- Obtener y Purificar ADN de germen de trigo
- Evaluar el grado de pureza del ADN obtenido.

Antecedentes académicos

- Estructura del ADN.
- Propiedades fisicoquímicas del ADN.
- Técnicas de extracción y purificación del ADN.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	200/293

Introducción

El ADN está formado por dos cadenas de polinucleótidos enrolladas una alrededor de la otra para formar una doble hélice. Cada nucleótido monómero del ADN está formado por una base nitrogenada (púrica o pirimidínica), un azúcar desoxirribosa y fosfato. Los mononucleótidos están unidos mediante enlaces 3,5-fosfodiéster. Estos enlaces unen el grupo 5-hidroxilo de la desoxirribosa de un nucleótido con el grupo 3-hidroxilo del azúcar de otro nucleótido mediante un grupo fosfato. La orientación antiparalela de las dos cadenas de polinucleótidos permite que se formen enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas que están orientadas hacia el interior de la hélice.

Existen dos clases de apareamiento de bases en el ADN: la adenina se aparea con la timina a través de dos enlaces de hidrógeno y la guanina con la citosina con tres enlaces. Debido a que cada par de bases está orientado en ángulo con el eje largo de la hélice, la estructura global del ADN se parece a una escalera de caracol.

- **Técnicas de extracción y purificación de ADN**

Las técnicas que se utilizan para el aislamiento, purificación y caracterización de las biomoléculas aprovechan sus propiedades físicas y químicas. La mayoría de las técnicas que se emplean en la investigación sobre los ácidos nucleicos se fundamentan en las diferencias de peso molecular, secuencias de bases o apareamiento complementario de bases. Las técnicas como la cromatografía, la electroforesis y la ultracentrifugación, que se han utilizado con éxito en la investigación proteica, se han adaptado también para su uso con los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos en las células se encuentran fuertemente unidos a proteínas catiónicas que las protegen llamadas histonas que una vez que las células han sido lisadas requieren ser separadas. Esto puede lograrse por medio de la agitación de la mezcla proteína-ácidos nucleicos con una solución de fenol, de modo que las proteínas se precipitan y pueden eliminarse por centrifugación. En forma alternativa, las proteínas



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	201/293

pueden disociarse de los ácidos nucleicos ya sea usando detergentes, cloruro de guanidinio o alta concentración de sal, o pueden degradarse enzimáticamente por proteasas.

Podemos encontrar métodos que aprovechan las propiedades desnaturalizantes que tienen ciertos disolventes orgánicos como cloroformo, fenol, etc. y aquellos fundamentados en el cambio de solubilidad que experimentan las proteínas cuando son sometidas a modificaciones en la concentración salina del medio. Así, en presencia de bajas concentraciones de sales, existe un ligero aumento en la solubilidad de las proteínas (salting-in) por aumento de la fuerza iónica del medio respecto de soluciones acuosas. Por otro lado, en presencia de altas concentraciones de sales, la solubilidad de las proteínas disminuye y terminan por precipitar (salting-out).

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos del resto de las células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido vegetal o animal, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica, etc.)
- Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc.)
- Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.)

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener detergentes que solubilizan las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que inactivan las enzimas intracelulares. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	202/293

Para prevenir que el ADN extraído presente coloración gris o parda, la cual se debe a la actividad de polifenoloxidasas presentes en algunos tejidos, se puede incluir en el buffer de extracción PVP (polivinil pirrolidona).

El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar en etanol frío o isopropanol y recuperar mediante centrifugación.

Las fuerzas de unión que mantienen juntas las cadenas complementarias del ADN pueden romperse. Este proceso, se denomina desnaturalización, se estimula por el calor, las concentraciones salinas bajas y los valores de pH extremos.

- **Técnicas que explotan las características estructurales singulares de los ácidos nucleicos.**

Diversas propiedades singulares de los ácidos nucleicos (p. ej., absorción de la luz UV de longitudes de onda específicas y su tendencia a formar reversiblemente complejos de doble cadena) se explotan en la investigación de los ácidos nucleicos. Debido a que las bases púricas y pirimídicas poseen estructuras aromáticas absorben la luz UV, por lo que es posible cuantificar el ADN a 260 nm, ya que una unidad de absorbancia equivale a 50 $\mu\text{g/mL}$; asimismo para evaluar la pureza del ADN se utilizan las relaciones de absorbancia a 260/230 y 260/280.

- **Efecto hipercrómico.**

La desnaturalización del ADN se puede detectar observando el aumento de la capacidad de una disolución de ADN de absorber la luz ultravioleta de una longitud de onda (λ) de 260 nm (A_{260}). Las bases de los ácidos nucleicos absorben fuertemente la luz de 260 nm. La cantidad de luz que absorbe un número de bases dado depende de su proximidad. Cuando las bases están altamente ordenadas (muy próximas entre sí) como en el ADN



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	203/293

de doble hebra, la A260 es menor que en un estado menos ordenado como el ADN de una sola hebra o las bases nitrogenadas libres en disolución.

Material y Equipo

- Mortero con pistilo.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Agitador de vidrio.
- Embudo de tallo corto
- Gasa estéril.
- Frasco ámbar de tapón esmerilado de 250 mL.
- Tubos de ensaye de 13 X 100.
- Centrífuga.
- Micropipetas P200, P1000, P5000 μ L
- Puntas nuevas y estériles para las micropipetas.
- Vidrio de reloj.
- Biofotómetro.
- Celda para biofotómetro.
- Recipientes para baño de agua y baño de hielo.
- Pipetas Pasteur.
- Parrilla de agitación y calentamiento.
- Termómetro.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	204/293

Material Biológico

- Germen de Trigo seco y sin tostar

Reactivos

- Etanol absoluto.
- Amortiguador TSM: TRIS 0.1 M, Sacarosa 0.3 M, Cloruro de magnesio 0.005M y Mercaptoetanol 0.005M (PM= 78, densidad 1.114 g/mL).
- TRIS base 0.4 M pH 8.5
- EDTA salino pH 8: EDTA 0.1 M y Cloruro de sodio 0.15M.
- SDS o LSS: Lauril sulfato de sodio al 4% en agua (p/v).
- Amortiguador CSC: Citrato de Sodio 0.15M y Cloruro de sodio 1.5M.
- Amortiguador DSC. Dilución 1:100 del amortiguador CSC.
- Mezcla Sevag: Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Difenilamina: Disolver 1.5g de Difenilamina en 100 mL de ácido acético concentrado y agregar 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (guardar en frasco ámbar).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	205/293

Método

1. Moler en un mortero 2.5 g de germen de trigo junto con un trozo de hielo seco hasta homogeneizar (Figs. 1 y 2).



Figs. 1 y 2. Macerar con hielo seco

0. Pasar este homogeneizado a un vaso de precipitados de 100 mL, añadir 25 mL de amortiguador TSM, homogeneizar con un agitador de vidrio y colocar un trozo pequeño de hielo seco (Fig. 3).



Fig. 3. Homogenizado en vaso de precipitados

3. Dejar congelar por 10 minutos y descongelar en un baño de agua a temperatura ambiente (fig.4).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	206/293



Fig. 4. Congelación (izquierda) y descongelación (derecha) de la muestra.

4. Filtrar este homogenizado sobre un trozo de gasa y exprimirla con la ayuda de un embudo y guantes, pasar el líquido filtrado a 3 tubos de ensayo.

5. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, desechar el sobrenadante y agregar a cada tubo: 6 mL de amortiguador TRIS, 0.6mL de EDTA salino y 1.2 mL de CSC, mezclar bien y añadir 2 mL de LSS.

6. Mezclar y centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Verter el sobrenadante lentamente por las paredes de un vaso que contenga 60 mL de etanol absoluto frío (Fig.5).



Fig. 5. Sobrenadante trasvasado a un recipiente con

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	207/293

7. El ADN aparecerá como una nata ascendente que puede recuperarse con una varilla de vidrio o por centrifugación (fig.6).

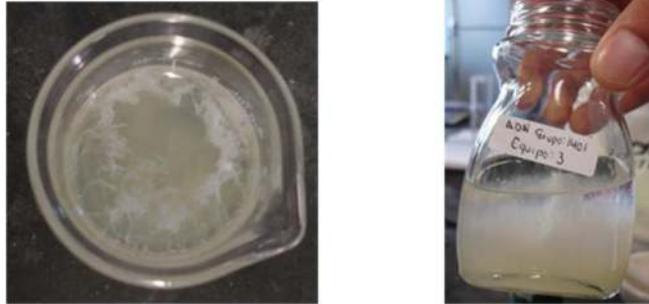


Fig. 6. Precipitación de ADN.

8. Una vez obtenido el ADN, proceder a su purificación. La nata se coloca en un vidrio de reloj (fig.7), se deja secar en la campana de extracción, hasta que desaparezca el olor a etanol. Posteriormente disolver la nata con la mínima cantidad de DSC, pasar a un frasco de tapón esmerilado, agregar la cantidad necesaria de cloruro de sodio para obtener una concentración de 1 M (no considerar la concentración de NaCl que contiene el DSC). Añadir un volumen igual de la mezcla Sevag y agitar fuertemente contra las paredes de un frasco de tapón esmerilado durante 15 minutos (Fig. 8).



Fig. 7. Nata de ADN



Fig. 8. Agitación en frasco esmerilado.

Nota: Durante la agitación destapar el frasco para permitir la salida de los gases generados.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	208/293

9. Centrifugar el líquido a 3000 rpm durante 5 minutos, se obtendrán tres fases, en la superior el ADN purificado, en la media las proteínas precipitadas y en la inferior la mezcla Sevag.

10. Tomar la capa superior de cada tubo con una pipeta Pasteur y verterla en un vaso que contenga 60 mL de etanol absoluto frío. Nuevamente ascenderá una nata de ADN que se recuperará para evaluar su pureza, y efecto hipercrómico.

11. Recuperar la nata de ADN en un vidrio de reloj y dejar secar en la campana de extracción, disolver en la cantidad mínima de DSC, si es necesario calentar un poco sin exceder 50°C.

A partir de este momento se realizarán los siguientes experimentos:

A. **Cuantificación y Pureza.** Con la solución del paso 11 determinar la concentración: Tomar 100 μ L de la solución de ADN y adicionar 900 μ L de DSC y determinar con un biofotómetro su concentración y pureza, obteniendo las relaciones de absorción en ultravioleta 260/230 y 260/280. Utilizar como blanco DSC (Fig. 9).



Fig. 9. Biofotómetro



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	209/293

B. **Efecto hipercrómico.** Calentar gradualmente la solución anterior hasta 75-80°C en baño María durante 5 minutos, enfriar rápidamente en un baño de hielo y volver a medir la absorción a 260 nm para observar el efecto hipercrómico.

C. **Reacción de la Difenilamina.** Utilizar un mililitro de la solución de ADN, agregar 1 mL de ácido tricloroacético al 10% y 1 mL de la solución de Difenilamina; hacer otro tubo como blanco de reactivos, taparlos con una canica para evitar la evaporación y colocarlos en baño María a ebullición durante 15 minutos. Observar un color azul característico debido a la presencia de desoxirribosa.

Resultados

- Cuantificar el ADN obtenido con el biofotómetro a 260 nm.
- Evaluar la pureza del ADN obtenido de acuerdo a las lecturas hechas a 260/280 nm y 260/230 en el biofotómetro.
- Interpretar los resultados del efecto hipercrómico.
- Interpretar los resultados de la reacción con la difenilamina.

Cuestionario

1. Mencione una aplicación para la extracción de ADN de una planta
2. Describa qué sucede al utilizar cada reactivo para la obtención de ADN en germen de trigo.
3. ¿Qué propiedades posee la mezcla Sevag??
4. ¿Qué importancia tiene la relación de absorbancias de 260/280 nm y 260/230 nm?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	210/293

- ¿Qué moléculas absorben luz UV a 230, 260 y 280 nm?
- Dibuje la reacción de la desoxirribosa con la difenilamina y explique si pudiera usarse para ARN?

Referencias

- De los Monteros-Silva, N. E., Montesdeoca, Á. O., Zambrano, A. A., Carrera, J. C., Fukushima, E. O., Llerena, S., & Mora, M. C. P. (2025). A Streamlined Plant DNA Extraction Method with Liquid Nitrogen-Free Approach. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 10(2), jtbb12766-jtbb12766.
- Galla, G., Praeg, N., Rzehak, T., Sprecher, E., Colla, F., Seeber, J., ... & Hauße, H. C. (2024). Comparison of DNA extraction methods on different sample matrices within the same terrestrial ecosystem. *Scientific Reports*, 14(1), 8715.
- De Silva, S., Cagliero, C., Gostel, M. R., Johnson, G., & Anderson, J. L. (2024). Versatile DNA extraction from diverse plant taxa using ionic liquids and magnetic ionic liquids: a methodological breakthrough for enhanced sample utility. *Plant Methods*, 20(1), 91.
- Emaus, M. N., Cagliero, C., Gostel, M. R., Johnson, G., & Anderson, J. L. (2022). Simple and efficient isolation of plant genomic DNA using magnetic ionic liquids. *Plant Methods*, 18(1), 37.
- Russo, A., Mayjonade, B., Frei, D., Potente, G., Kellenberger, R. T., Frachon, L., ... & Schlüter, P. M. (2022). Low-input high-molecular-weight DNA extraction for long-read sequencing from plants of diverse families. *Frontiers in Plant Science*, 13, 883897.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	211/293

- Lau, P. J., & Botella, J. R. (2023). Advancing the automation of plant nucleic acid extraction for rapid diagnosis of plant diseases in space. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194753.
- Yu, Z., Zhou, L., & Wang, Y. (2024). Extraction and analysis of high-quality chloroplast DNA with reduced nuclear DNA for medicinal plants. *BMC Biotechnology*, 24, 20.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	212/293

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN HUMANO

Objetivos

- Analizar el fundamento de la extracción de ADN.
- Extraer el ADN de una muestra de sangre humana utilizando el equipo de reactivos “Wizard® Genomic DNA Purification”.
- Revisar las distintas aplicaciones que tiene la obtención de ADN.

Antecedentes académicos

- Función del ADN.
- Estructura del ADN.
- Propiedades fisicoquímicas del ADN.
- Métodos de extracción y purificación del ADN.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	213/293

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero que contiene varios millones de pares de nucleótidos organizados siguiendo una secuencia lineal, en el humano consta de aproximadamente 3000 millones, en los que se encuentra la información genética. La molécula de ADN presenta diferentes grados de compactación de la cromatina durante la interfase del ciclo celular. Las secuencias codificantes del ADN se conocen con el nombre de genes que son transcripcionalmente activas y se encuentran en la cromatina menos condensada, eucromatina, mientras que la cromatina altamente condensada, heterocromatina, es en apariencia genéticamente inactiva. El ADN se duplica de forma semi-conservativa, durante el periodo S del ciclo celular, replicando la eucromatina tempranamente y la heterocromatina más tarde. El nucléolo es una estructura basófila que se encuentra en el núcleo de eucariontes que corresponde al sitio donde se expresan los genes que codifican para el ARN ribosomal. La molécula de ADN se forma por enlace covalente de miles de desoxinucleótidos. El desoxinucleótido, o unidad estructural del ADN, contiene un ácido fosfórico, un azúcar de cinco átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada.

El ADN contiene cuatro bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), que derivan de la purina y citosina (C) y timina (T) que derivan de la pirimidina (Fig.1). El enlace entre una desoxirribosa y una base nitrogenada forma una molécula denominada desoxinucleósido. La unión de un ácido fosfórico a esta molécula forma el desoxinucleótido.

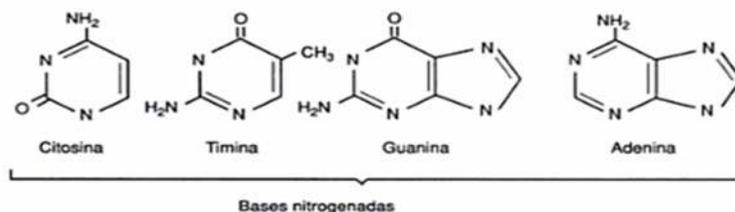


Fig. 1. Estructura química de las cuatro bases nitrogenadas que componen el ADN

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	214/293

Los desoxinucleótidos se unen para formar el polímero lineal, en el cual el grupo fosfato en posición 5' de la desoxirribosa se une por un enlace éster con el hidroxilo 3' de la desoxirribosa del desoxinucleótido vecino, y así sucesivamente (Fig. 2).

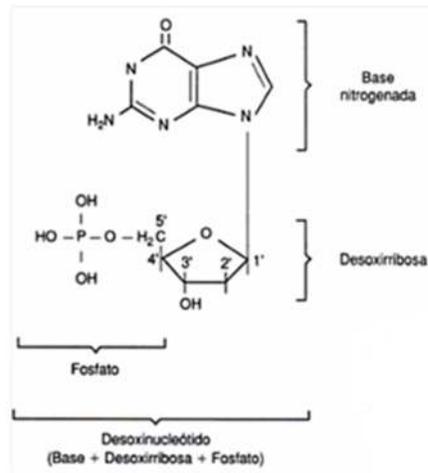


Fig. 2. Esquema del enlace químico que forma el polímero lineal de un desoxinucleótido

El polímero forma una hebra donde se alternan una desoxirribosa y un fosfato, mientras que las bases se unen perpendicularmente a éste (Fig.3). La proporción relativa de cada una de las bases del ADN, así como el orden o secuencia en que se encuentran, varía de organismo a organismo, ya que la secuencia de bases es específica para cada uno, y contiene la información genética que lo define.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	215/293

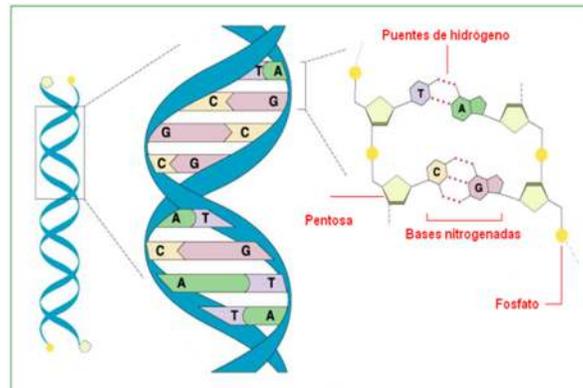


Fig. 3. Estructura secundaria del ADN

Extracción y purificación

El primer paso en cualquier análisis genético suele ser el aislamiento del material genético. Los métodos de extracción del ADN se remontan a 1869 cuando Miescher consiguió extraer del espermatozoide de salmón y de los leucocitos humanos lo que entonces denominó nucleína y que hoy es el ADN. Para aislar el ADN a partir de una muestra de sangre se procede a lisar los eritrocitos que no poseen núcleo con choque hipotónico y en presencia de detergentes para eliminar el exceso de hemoglobina. Después se tratan los núcleos de los leucocitos con proteinasa K y se procede a la purificación del ADN a través de la extracción de las proteínas y la precipitación del ADN con etanol.

El ADN extraído de esta forma es apto para la mayoría de los análisis moleculares. A parte de este método existen numerosas variantes metodológicas para purificar el ADN dependiendo de los distintos materiales de partida (sangre, tejidos, bacterias, levaduras) basados en solubilidad, precipitación diferencial de ADN o basados en su afinidad a distintos tipos de matrices.

Generalmente el ADN se extrae a partir de muestras que contienen células nucleadas, ya que en el núcleo es donde está el ADN genómico. No obstante en algunos métodos se analiza el ADN circulante presente en el plasma, que es un ADN degradado en forma de fragmentos del tamaño del mononucleosoma, y que procede de los fenómenos apoptóticos que ocurren en distintos tejidos del organismo.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	216/293

Material y Equipo

- Tubos Vacutainer® con EDTA (tapón lila)
- Soporte de aguja
- Aguja para toma múltiple 21G x 38 mm
- Torundas
- Ligadura
- Guantes de latex
- Microtubos de 1.5 mL
- Tubos de 15 mL
- Equipo de reactivos “ Wizard® Genomic DNA Purification”
- Micropipetas p1000 y p5000 µL
- Puntas nuevas para las micropipetas
- Recipiente para baño de agua
- Termómetro
- Centrífuga
- Vortex
- Parrilla de calentamiento

Reactivos

- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Kit Wizard® Genomic DNA
 - Solución de lisis celular (cell Lysis Solution).
 - Solución de lisis de núcleos (Nuclei Lysis Solution).
 - Solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution).



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	217/293

- Solución RNasa (RNase Solution).
- Solución de rehidratación de ADN (DNA Rehydration Solution).

Material Biológico

-Sangre humana venosa.

Método

-Extracción de ADN genómico a partir de un volumen de 1 mL de una muestra de sangre humana.

1. Realizar la técnica de extracción sanguínea de un integrante del equipo para obtener una muestra en un tubo que contenga anticoagulante EDTA (tapón color lila).
2. Utilizar un volumen de 1 mL de la sangre previamente mezclada y añadirla a un tubo de 15 ml que contiene 4.5 mL de solución de lisis celular. Mezclar de 5 a 6 veces.
 0. Incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente (invertir de 2-3 veces durante la incubación) para lisar los eritrocitos y centrifugar a 3500 rpm ($2,000 \times g$) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 0. Retirar y desechar la mayor cantidad posible de sobrenadante sin perturbar el sedimento visible blanco. Aproximadamente de 50–100 μ L de líquido residual deben permanecer en el tubo. Si la pastilla parece contener sólo los eritrocitos, añadir una alícuota adicional (1mL) de solución de lisis celular después de retirar el sobrenadante por encima del sedimento de células, y luego repetir los pasos 3 y 4.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	218/293

Nota: para obtener la lisis celular eficiente, resuspender completamente los leucocitos (células blancas) de la sangre.

0. Agitar el tubo vigorosamente en el vortex hasta que los leucocitos se vuelven a suspender (10-15 segundos).
0. Agregar 1.5 mL de solución de lisis de núcleos al tubo que contiene las células resuspendidas. Pipetear la solución 5-6 veces para lisar ahora los leucocitos. La solución se observará muy viscosa (Fig. 4).



Fig. 4. Solución viscosa después de la lisis celular.

Nota: Si algunos grumos de células son visibles después de la mezcla, se debe de incubar la solución a 37°C hasta que se rompan los grumos. Si éstos todavía son visibles después de 1 hora, añadir 1 mL de solución de lisis de núcleos y repetir la incubación.

OPCIONAL. Agregar 15 μ L solución RNasa, al lisado nuclear, y mezclar la muestra invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37 ° C durante 15 minutos, y después enfriar a temperatura ambiente.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	219/293

7. Añadir 0.5 mL de la solución de precipitación de proteína al lisado nuclear y agitar vigorosamente durante 10 a 20 segundos. Pequeños grupos de la proteína pueden ser visibles después de agitación (Fig. 5).



Fig. 5. Precipitación de proteínas.

NOTA: Si se adicionó un exceso de solución de lisis de núcleos en el paso 6, deberá adicionar 1.3 mL de solución de precipitación de proteínas.

8. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Deberá observarse un color marrón oscuro del botón de proteínas (Fig.6).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	220/293



Fig. 6. Botón de proteínas

9. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 15 mL que contiene 3 mL de Isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta observar las hebras de color blanco que corresponden al ADN (Fig. 7).

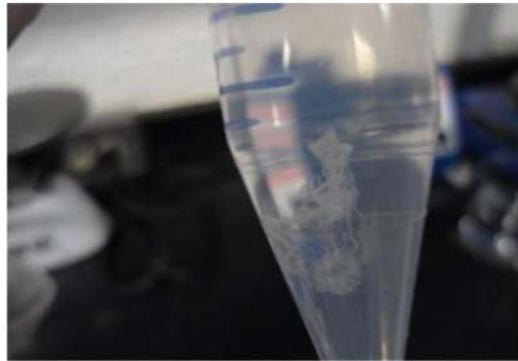


Fig. 7. ADN precipitado

10. Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN será visible como un pequeño precipitado blanco (Fig. 8).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	221/293

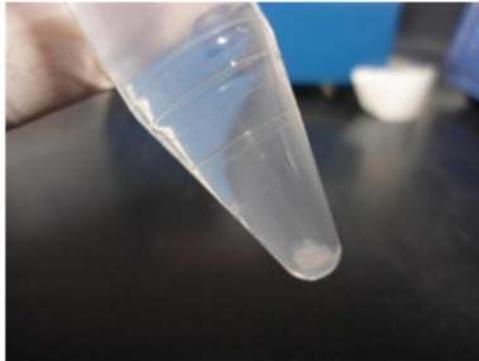


Fig. 8. Botón de ADN

11. Decantar el sobrenadante, y añadir 3 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN y los lados del tubo en donde está el ADN. Centrifugar como en el paso 10.

12. Aspirar cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta Pasteur.

NOTA: El sedimento de ADN no es compacto en este punto por lo que se debe tener cuidado para evitar la aspiración del botón con la pipeta. Invertir el tubo sobre un pedazo de papel absorbente y dejar secar al aire durante 10 minutos (Fig.9).



Fig. 9. Secado del ADN

0. Añadir 150 μ L de la solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65°C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	222/293

golpeando suavemente el tubo. Almacenar el ADN a 2-8 °C hasta su uso. Alternativamente se puede rehidratar el ADN mediante la incubación de la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4°C.

Resultados

- Describir los cambios físicos y por qué se presentan en cada uno de los pasos de la extracción y purificación de ADN.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	223/293

Cuestionario

1. ¿Qué función tiene la RNasa en la técnica de obtención de ADN?
2. ¿Según lo que sucede al usarlos, para qué sirve cada uno de los reactivos que se ocupan en la extracción de ADN?
3. ¿Por qué se recomienda que el material que se ocupa en la extracción debe de ser nuevo y estéril?
4. ¿De qué otro tipo de células se podría obtener ADN?
5. Mencione al menos tres aplicaciones donde se use ADN extraído de células humanas.

Referencias

1. Geerts, B. L. et al. (2025). Comparison and optimization of DNA extraction methods for human DNA from dried blood spot samples. *Pediatric Reports*, 17(2), 30.
2. Brodzka, S., Kamiński, P., Baszyński, J., Mroczkowski, S., Rektor, K., Stanek, E., Kwiecińska-Piróg, J., Grochowalska, R., Kurhaluk, N., & Tkaczenko, H. (2025). Optimized Protocol For DNA Extraction from Human Whole Blood. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 59(1), 47–64.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	224/293

3. Barcenilla, C., Cobo-Díaz, J. F., De Filippis, F., Valentino, V., Cabrera Rubio, R., O'Neil, D., & Alvarez-Ordóñez, A. (2024). Improved sampling and DNA extraction procedures for microbiome analysis in food-processing environments. *Nature Protocols*, 19(5), 1291-1310.
4. Stan, E., Muresan, C.-O., Dumache, R., et al. (2024). From Jane Doe to Sofia: DNA extraction protocol from bones and teeth without liquid nitrogen for identifying skeletal remains. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5114.
5. Alemán-Duarte, L., Gómez-Sánchez, J., & Martínez, F. (2023). Improvement and validation of a genomic DNA extraction method for human breastmilk. *Methods and Protocols*, 6(2), 45.
6. Dehasque, M., Lin, J., & Kav, D. (2022). Development and optimization of a silica column-based extraction protocol for ancient DNA. *Genes*, 13(12), 2104.
7. Smith, T., & Johnson, L. (2024). Evaluation of a new DNA extraction method on challenging bone samples recovered from a WWII mass grave. *Genes*, 15(6), 672.
8. Garcia, P., & López, A. (2025). Methods of extraction of genetic material from human hard tissues: advancements in the 21st century. *Forensic Science International*
9. Osinski, B. L., BenTaieb, A., Ho, I., Jones, R. D., Joshi, R. P., Westley, A., et al. (2022). AI-augmented histopathologic review using image analysis to optimize DNA yield and tumor purity from FFPE slides. *bioRxiv*.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	225/293

10. Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanabe, O., Martinez, M., & Grune Loffler, S. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias, 18(2), 68-73.

11. WizardGenomic DNA Purification Kit Quick Protocol. Revisado en octubre de 2023 y recuperado de: <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	226/293

CUANTIFICACIÓN DE ADN HUMANO

Objetivos

- Cuantificar el ADN de una muestra problema, por el método espectrofotométrico, utilizando un BioPhotometer®
- Determinar la pureza del ADN extraído de la práctica anterior.

Antecedentes académicos

- Características fisicoquímicas del ADN.
- Funcionamiento del equipo BioPhotometer®.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	227/293

Introducción

La concentración del ADN se puede estimar utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm, debido a que las bases púricas y pirimídicas del ADN tienen la propiedad de absorber la luz UV a esta longitud de onda. Es importante tener en cuenta que, dado el emparejamiento de sus bases (puentes de hidrógeno), el ADN bicatenario absorbe menos que el monocatenario. Es así como una unidad (u) de densidad óptica (DO) a 260nm equivale a 50µg/mL de ADN de doble cadena o a 40µg/mL de ARN y ADN de cadena simple.

La concentración de ADN bicatenario en una muestra puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g / mL}) = \text{absorbancia de la muestra a 260nm} \times \text{factor de dilución} \times 50\mu\text{g/mL}$$

El análisis espectrofotométrico también permite valorar el grado de pureza de los ácidos nucleicos, mediante el cociente de lecturas de absorción a 260 nm (bases nitrogenadas) y las lecturas a 280 nm que corresponden al máximo de absorbancia de las proteínas y lecturas de 230 nm máximo de absorbancia de moléculas orgánicas sencillas, como monosacáridos, aminoácidos, jabones, alcoholes y nucleótidos; entre otros, que en conjunto son llamadas impurezas orgánicas del proceso de extracción. Es importante considerar que la pureza y concentración de ADN, puede alterarse por los reactivos utilizados para la extracción.

La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260/280 y 260/230nm.

$$\text{Pureza ADN} = \text{absorbancia 260 nm} / \text{absorbancia 280 nm y}$$

$$\text{Pureza ADN} = \text{absorbancia 260 nm} / \text{absorbancia 230 nm}$$



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	228/293

Debido a que es prácticamente imposible dejar sin proteínas o impurezas orgánicas al ADN, se consideran cifras óptimas de pureza aquellas que presentan un cociente de entre 1.7 a 2, cocientes menores en las lecturas de 260/280 indican la presencia no aceptable de proteínas en el medio y el cociente 260/230 menor a 1.7 indica la presencia de impurezas orgánicas que indican una insuficiente pureza de nuestra extracción.

Efecto hipercrómico

Cuando una solución de ADN de doble hebra se calienta por encima de una temperatura de 60°C o mayor, su estructura nativa colapsa y sus dos hebras complementarias se separan y asumen conformaciones al azar. Este proceso llamado desnaturalización está acompañado de un cambio cualitativo de las propiedades físicas del ADN; por ejemplo, la alta viscosidad característica del ADN nativo en solución, debida a la resistencia a la deformación de sus moléculas dobles rígidas y con forma de rodillo, disminuye de manera drástica cuando el ADN se descompone en las hebras simples de conformación flexible. De modo similar, la absorbancia del ADN a la luz ultravioleta que se debe casi por completo a sus bases aromáticas, aumenta en un 40% al desnaturalizarse como consecuencia de la falta de las interacciones electrónicas entre las bases vecinas. Este aumento de la absorbancia se conoce como efecto hipercrómico y no implica que se tenga más ADN, es simplemente que se encuentra desnaturalizado.

Al monitorear los cambios en la absorbancia a 260 nm de una muestra de ADN, se observa que a medida que la temperatura aumenta se revela un incremento en la absorbancia, esto tiene lugar en un rango estrecho de temperatura, lo que indica la desnaturalización del ADN como un fenómeno cooperativo en el que el colapso de una parte de la estructura desestabiliza al resto.

En la forma análoga a la fusión de un sólido, hace referencia a la curva de fusión (Fig. 1) y la temperatura de su punto medio se define como su temperatura de fusión T_m .

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	229/293

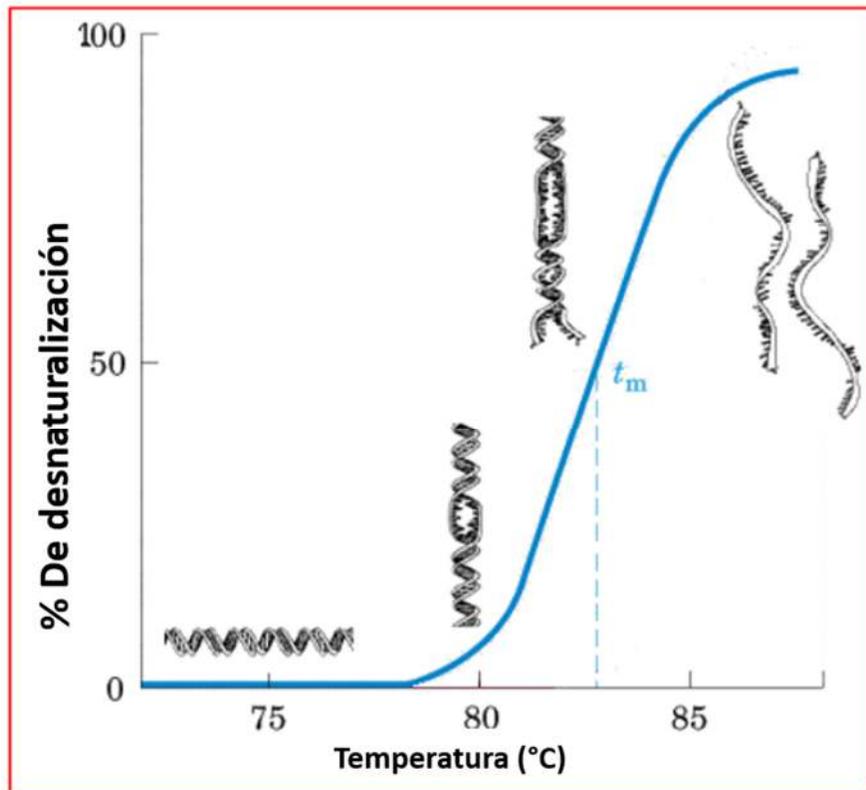


Fig. 1. Ejemplo de una curva de fusión

La estabilidad del ADN y por consiguiente su T_m , dependen de varios factores, por ejemplo, la naturaleza del solvente, las cantidades y las concentraciones de los iones en solución, el pH y el porcentaje de dobles y triples enlaces de las bases, A-T y C-G.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	230/293

Material y Equipo

- Equipo BioPhotometer®
- Celdas
- Micropipetas p200, p1000 y p5000 μ L
- Puntas nuevas para micropipetas
- Agua destilada
- Guantes de látex
- Gradilla
- Vasos de precipitados de 50 mL

Material Biológico

-Muestras de ADN humano

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	231/293

Método

1. Resuspender el ADN con ayuda del Vortex® (Fig. 2).



Fig. 2. Resuspendiendo el ADN con el Vortex® .

2. Preparar 200 μ L con una dilución 1:20 de la muestra con agua destilada (Fig. 3) (si la lectura es muy alta diluir 1:40).



Fig. 3. Preparación de la dilución

3. Encender el equipo (Fig. 4) del botón que se encuentra en la parte posterior del equipo y seleccionar la función No. 7 que permite medir la concentración de ADN y de su pureza.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	232/293



Fig. 4. Equipo Biofotómetro.

4. Calibrar el Biofotómetro ajustando el equipo a cero de absorbancia, utilizando 100 μ L de agua destilada que se colocan en una celda del Biofotómetro. Colocar la celda en el portacelda, presionar el botón “blank” y observar en la pantalla los ceros (Fig. 5).

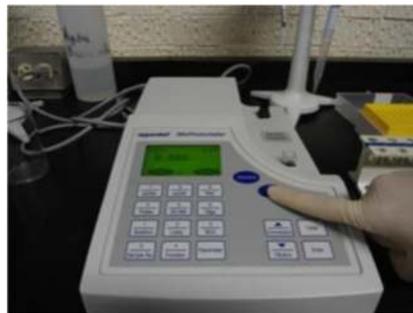


Fig. 5. Ajuste a cero del biofotómetro.

5. Mezclar la muestra y colocar 100 μ L en la celda (Fig. 6), insertar la celda en el portacelda y oprimir el botón “Sample”. Anotar los datos que se obtienen en la pantalla: concentración, absorbancia a 230, 260, 280 y el cociente de la relación de las dos absorbancias (260/230, 260/280).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	233/293



Fig. 6. Pasos a seguir para medir la concentración y pureza de una muestra.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	234/293

Resultados

- Registrar las lecturas de las absorbancias de las muestras y de las relaciones 260/230 y 260/280.
- Determinar la concentración utilizando la fórmula escrita en la teoría y teniendo en cuenta la dilución del ADN. Por ejemplo, para un ADN diluido 1/100 en un volumen final de 1 mL y una lectura de 0.050 a 260 nm se tienen que $0.050(\text{DO}) \times 50\mu\text{g/mL} \times 100$ (factor de dilución) = $250\mu\text{g/mL} = 0.25\mu\text{g}/\mu\text{L} = 250\text{ng}/\mu\text{L}$.
- Verificar la pureza del ADN obtenido comparando los cocientes obtenidos de absorbancias a 260/230 y 260/280 con los teóricos.

Cuestionario

1. ¿Por qué otro método se puede cuantificar la concentración del ADN? ¿Podría ser mejor o tendría desventajas?
2. ¿Cuál es la importancia de obtener ADN con cociente 260/230 y 260/280 entre 1.7 y 2? ¿Qué aplicaciones tendría?
3. ¿Por qué se recomienda medir la absorbancia a 280 y 230 nm, si el ADN absorbe a 260 nm?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	235/293

Referencias

1. Vandesompele, J., et al. (2025). Comparison and optimization of DNA extraction methods for human DNA from dried blood spot samples. *Pediatric Reports*, 17(2), 30.
2. García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Quizán-Plata, T., et al. (2023). DNA quantification via NanoDrop spectrophotometer: estimation of method uncertainty using DNA from standard reference materials, Sprague Dawley rats, and humans. *Journal of Chemical Metrology*.
3. Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods. *Analytica*, 3(3), 371-384.
4. Smith, D.L., Wu, C., Gregorich, S., Dai, G., & Lin, J. (2022). Impact of DNA extraction methods on quantitative PCR telomere length assay precision in human saliva samples. *International Journal of Methodology*, 1(1), 44–57.
5. González-Morán MG. *Técnicas de Laboratorio en biología celular y molecular*. México: Facultad de ciencias, UNAM, AGT Editor S.A.; 2008.
6. Nelson, D. L., Cox, M. M., & Hoskins, A. A. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman.
7. Mendoza-Rincón JF, García del Valle A, Aguilar-Santelises L. *Protocolos en Biología molecular*. México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	236/293

ELECTROFORESIS DE ADN

Objetivos

- Realizar la electroforesis del ADN extraído, purificado y cuantificado.
- Analizar las bandas obtenidas en el gel.

Antecedentes académicos

- Fundamento de la electroforesis
- Moléculas que se pueden separar por electroforesis
- Medios de soporte para realizar la electroforesis
- Modos de disposición del soporte: Horizontal, Vertical
- Ejemplos de separación electroforética
- Tinción de proteínas y de ácidos nucleicos



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	237/293

Introducción

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en el campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga-energía.

La electroforesis en gel de agarosa es un método bastante utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal, extraído de algas marinas, que al gelificar forma redes en las cuales las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 (\log_{10}) de sus tamaños moleculares. El ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfatos de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo.

Entre los factores que afectan la tasa de migración del ADN en los geles de agarosa se incluyen:

1. El tamaño del fragmento: como ya se mencionó, las moléculas lineales de ADN de doble cadena se desplazan en los geles de agarosa de una manera inversamente proporcional a \log_{10} de sus tamaños moleculares, de modo que a menor tamaño, mayor velocidad de migración.
2. Concentración de Agarosa: Existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel: a mayor concentración, menor rango de separación (Cuadro 1).
3. La conformación del ADN: las moléculas circulares y las lineales presentan diferencias en su migración a través de la matriz de agarosa; es así como las formas circulares plegadas migran más rápido que las formas circulares con rompimientos del enlace fosfodiéster en una de las cadenas y que las formas lineales.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	238/293

Cuadro 1. Eficiencia de separación de ADN de acuerdo a la concentración de agarosa.

Concentración de agarosa en el gel (%)	Tamaño de los fragmentos de ADN separados (kb)
0.3	5 - 60
0.5	1 - 30
0.7	0.8 - 12
1	0.5 - 10
1.2	0.4 - 7
1.5	0.2 - 3
2.0	0.05 - 2

4. Voltaje aplicado: a voltajes bajos la migración de las moléculas lineales de ADN es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, si la fuerza iónica del campo es elevada, la movilidad de los fragmentos de alto tamaño molecular se incrementa diferencialmente. Por lo tanto, el rango de separación efectiva en los geles de agarosa decrece cuando se eleva el voltaje aplicado.

5. Amortiguador utilizado: la migración del ADN se ve afectada tanto por la composición como por la fuerza iónica del amortiguador empleado, de manera que se debe establecer un balance de iones que genere una fuerza iónica suficiente para lograr la conductancia eléctrica, sin excederse y ocasionar en el peor de los casos un calentamiento excesivo con fusión de la agarosa y desnaturalización del ADN. Entre los amortiguadores más empleados se encuentran: Tris-acetato-EDTA (TAE), Tris-borato-EDTA (TBE) y Tris-fosfato-EDTA (TPE), que se usan en diferentes proporciones dependiendo de la muestra a separar.

Una vez terminada la electroforesis, la visualización de las moléculas de ADN se logra mediante indicadores que pueden observarse con luz UV, como bromuro de etidio u otro colorante como el Midori Green®. Estas sustancias se intercalan entre las bases del ADN, de manera que el colorante unido al mismo presenta una mayor fluorescencia, que el colorante en solución.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	239/293

Material y Equipo

- Cámara de electroforesis
- Micropipetas p20, p200 y p1000 μ L
- Puntas nuevas para micropipetas
- Fuente de poder
- Papel cera
- Transiluminador
- Matraz Erlenmeyer de 200 mL
- Probeta de 1000 mL
- Frasco de 1 Litro para TBE

Reactivos

- Amortiguador TBE 10X
- Reactivo Midori green®
- Buffer de carga 6X Promega®
- Marcador de peso molecular Promega®
- Agarosa grado biología molecular

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	240/293

Método

1. Preparar 1 L de amortiguador TBE 0.5X a partir de TBE 10X.
2. Pesar la cantidad de agarosa requerida según el porcentaje del gel. Por ejemplo, para preparar 100 mL de un gel de agarosa al 0.7% pesar 0.7 g de agarosa y disolverlo en TBE al 0.5X en un matraz Erlenmeyer.
3. Calentar la solución con el fin de disolver por completo la agarosa, en el microondas durante aproximadamente un minuto y medio hasta que se observe transparente sin dejar que llegue a ebullición (Fig. 1). Puede calentarse también sobre la parrilla hasta disolver la agarosa cuidando de que no llegue a ebullición.



Fig. 1. Calentamiento de la agarosa.

4. Enfriar un poco y agregar 5 μ L de Midori Green, continuar enfriando y antes que solidifique, servir en el soporte del gel y colocar los peines para formar los pozos en número y tamaño deseados (Figs. 2 y 3).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	241/293

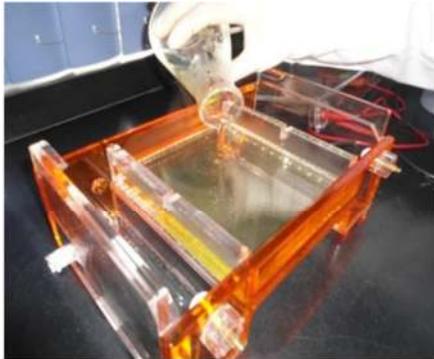


Fig. 2. Llenado del soporte del gel.

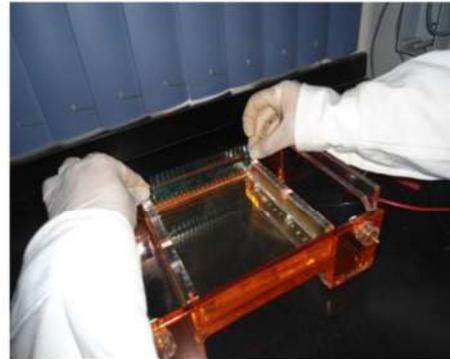


Fig. 3. Colocación del peine.

0. Esperar de 20 a 30 minutos para la gelificación de la agarosa (fig. 4).

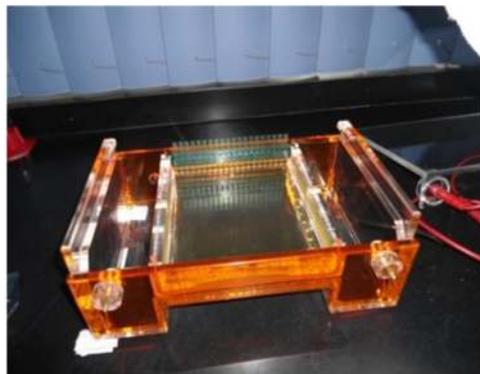


Fig. 4. Gelificación de la agarosa

1. Colocar la placa del gel en la posición correcta la cámara de electroforesis y llenar la misma poco antes del borde máximo marcado con el amortiguador 0.5X (Fig. 5 y 6).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	242/293

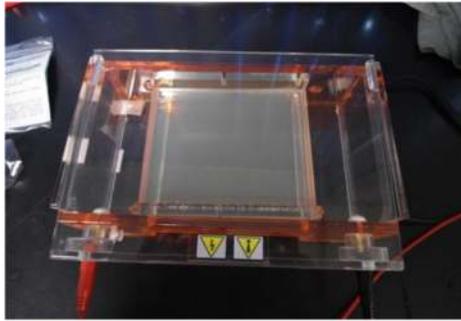


Fig. 5. Colocación de la placa en la cámara.

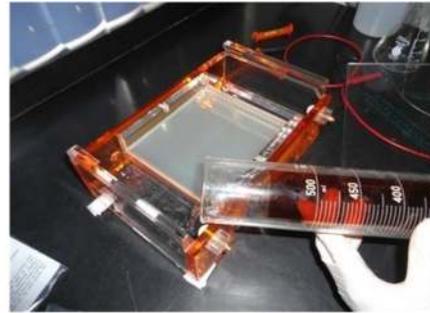


Fig. 6. Llenado de la cámara.

7. Colocar en el primer pozo 5 μ L del marcador de peso molecular y después las muestras utilizando una mezcla de 4 μ L de cada una a la concentración indicada por sus profesores y 4 μ L de buffer de carga. Cada equipo colocará sus mezclas una tras otra a partir del pozo siguiente en donde se agregó el marcador de peso molecular (Figs. 7 y 8).

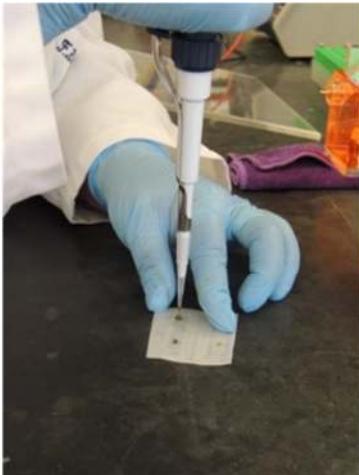


Fig. 7. Preparación de muestras

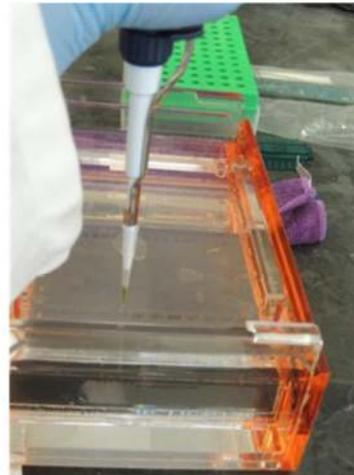


Fig. 8. Colocación de marcador y muestras en pozos.

8. Conectar los electrodos y correr a 80 V durante 1 hora 20 minutos (Fig. 9).

Nota: Recordar que el ADN migrará en la cámara de electroforesis del polo negativo hacia el polo positivo



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	243/293



Fig. 9. Conexión de la cámara a la fuente de poder

9. Observar la presencia de las bandas separadas de ADN en el Transiluminador (Fig. 10).

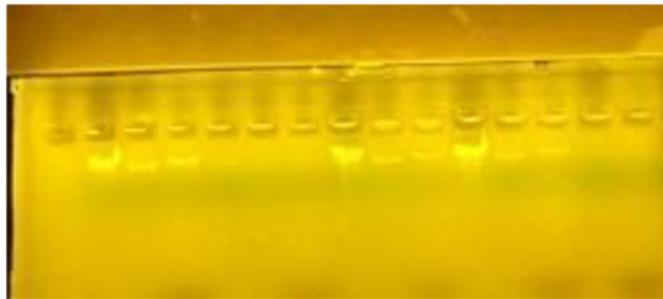


Fig. 10. Observar la presencia de bandas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	244/293

Resultados

- Obtener una foto de la electroforesis de las muestras de ADN.
- Comparar las bandas de cada carril y establecer el peso molecular aproximado de cada banda.
- Realizar un análisis de resultados.

Cuestionario

1. ¿Qué otros polímeros existen para realizar geles para electroforesis?
2. Mencione otros ejemplos de electroforesis.
3. ¿Qué características presentan las moléculas para que se puedan separar por medio de la electroforesis?
4. Mencione el fundamento del uso de los indicadores para observar el ADN.
5. ¿Qué otros tipos de indicadores se pueden utilizar para teñir geles de agarosa?
6. Investigue el tamaño esperado del ADN humano obtenido y proponga el porcentaje de agarosa a utilizar.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	245/293

Referencias

1. Montalvo Navarro, C. A., & Lugo Flores, M. A. (2019). Electroforesis: fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemus (Sonora)*, 13(26), 48-54.
2. Rana, B. y Joshi, GK (2023). Electroforesis: Principio básico, tipos y aplicaciones. En *Biotécnicas básicas para bioprocesos y bioemprendimiento* (pp. 183-193). Academic Press.
3. Li, J., Fan, S., Zhu, J., Yang, B., Li, Z., Zhang, D., & Yamaguchi, Y. (2025). Development of a low-cost and easy-assembly capillary electrophoresis system for separation of DNA. *Bioengineering*, 12(3), 303.
4. Utthiya, S., Wonnapijit, P., Napaumpaiporn, P., Kittiwongwattana, C., Sakulkoo, J., Suttangkakul, A., & Vuttipongchaikij, S. (2022). Gel purification of gDNA for next-generation sequencing applications. *Biotechniques*, 73(2), 99-103.
5. Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *Biotechniques*, 72(4), 155-158.
6. Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). Alkaline agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(11), pdb-prot100438.
7. Wilson, K., & Walker, J. (2018). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (8^a ed.). Cambridge University Press.
8. Mendoza-Rincón JF, García del Valle A, Aguilar-Santelises L. *Protocolos en Biología molecular*. México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.
9. QIAEX® II Handbook For DNA extraction and electrophoresis. 2015. recuperado de : <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=13d33145-9f64-426a-a43b-394211d8cf2b&lang=en>



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	246/293

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y METALES PESADOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA SALIVAL

Objetivos

- Analizar algunos factores que modifican la velocidad de la reacción que es catalizada por la amilasa
- Demostrar que la temperatura afecta las reacciones enzimáticas.
- Determinar la manera en que influye el pH del medio sobre la velocidad de una reacción enzimática y su efecto sobre el carácter iónico de la enzima y del sustrato.
- Determinar cualitativamente la actividad de la amilasa salival con algunos metales

Antecedentes académicos

- Concepto de enzima.
- Métodos para medir la actividad enzimática.
- Factores que afectan la actividad enzimática.
- Actividad de la amilasa salival.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	247/293

Introducción

Las enzimas son biocatalizadores (es decir compuestos de origen biológico) que aceleran las reacciones químicas. Las enzimas participan en muchos mecanismos de regulación que de este modo permiten que el metabolismo se adapte a diferentes situaciones. Casi todas las enzimas son proteínas, pero también hay ácidos nucleicos catalíticamente activos conocidos como “ribozimas”.

Actualmente se conocen unas 2,000 enzimas y para su clasificación se utiliza un sistema que toma en cuenta tanto la especificidad de acción como la especificidad por el sustrato. Cada enzima está indicada por un número EC de varias cifras en el catálogo de enzimas. El primer número indica que la enzima corresponde a una de las 6 clases principales de enzimas, los dos números siguientes definen la subclase y la sub-subclase y el último número es el número progresivo dentro de la sub-subclase. Por ejemplo, en el caso de la deshidrogenasa láctica el número EC correspondiente es 1.1.1.27 (clase 1, oxidorreductasas; subclase 1.1 con el grupo CH-OH como dador de electrones y sub-subclase 1.1.1 NAD (P)+ como aceptor).

En las seis clases principales se incluyen las enzimas que tienen un mecanismo de acción similar:

- Clase 1. Las oxidorreductasas catalizan la transferencia de los equivalentes reductores entre dos sistemas redox.
- Clase 2. Las transferasas catalizan la transferencia de otros grupos de una molécula a otra. Las oxidorreductasas y las transferasas en general requieren coenzimas.
- Clase 3. Las hidrolasas transfieren grupos y el aceptor siempre es una molécula de agua.
- Clase 4. Las liasas llamadas con frecuencia “sintasas”, catalizan la ruptura o la formación de uniones químicas, con la formación o la eliminación de dobles enlaces.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	248/293

- Clase 5. Las isomerasas desplazan grupos dentro de una molécula sin cambiar la fórmula general del sustrato.
- Clase 6. Las ligasas catalizan reacciones en las que se presenta la unión de moléculas dependientes de la energía y por eso siempre están acopladas con la hidrólisis de nucleósidos trifosfatos (habitualmente ATP).

La acción catalítica de una enzima, o sea su actividad, se mide cuantificando el incremento de la velocidad de la reacción en condiciones perfectamente definidas, es decir midiendo la diferencia del recambio entre la reacción catalizada y la reacción no catalizada en un tiempo determinado. Normalmente las velocidades de reacción se expresan como cambios de concentración por unidad de tiempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Como la actividad catalítica es independiente del volumen, la actividad enzimática se expresa indicando el recambio por unidad de tiempo con la unidad llamada **katal** (kat, $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$). Otra unidad usual es la **unidad internacional UI** (μmol de recambio $\cdot\text{min}^{-1}$, cuya equivalencia es $1\text{UI} = 16.7\text{ nkat}$).

La acción de la amilasa salival sobre el almidón constituye el primer paso de la digestión de estos polisacáridos en su paso por el tubo digestivo (Fig.1). Aunque su papel en la digestión es escaso ya que el contacto de la enzima con su sustrato es de corta duración, puesto que el pH gástrico inhibe su actividad.

Cuando se incuba saliva con almidón y se toman muestras a diferentes tiempos, a las que se les agrega yodo, el ensayo de color, inicialmente azul, cambia sucesivamente a púrpura, marrón rojizo y, finalmente desaparece el color a medida que la amilasa hidroliza las moléculas de almidón.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	249/293

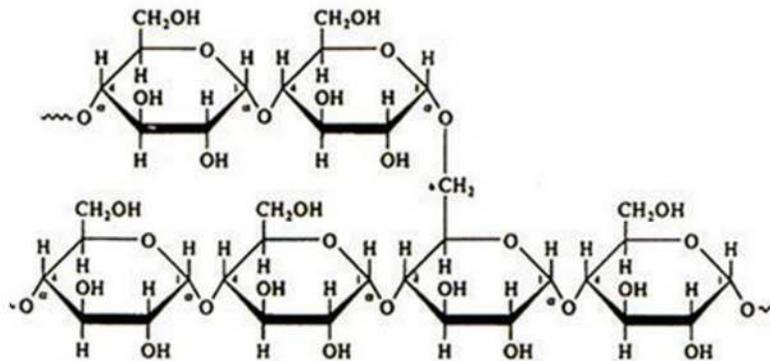


Fig. 1. Estructura de la amilopectina. Susceptible a la acción de la amilasa en los enlaces alfa (1-4).

Material y Equipo

- Vasos de precipitados de 50 mL
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Pipetas graduadas de 1 y 2 mL
- Tubos de ensaye de 13 X 100
- Gradilla
- Termómetro

Reactivos

- Solución de almidón al 0.8% en solución salina
- Solución salina al 0.85%
- Lugol
- Soluciones de metales: CuSO₄ al 1%, HgSO₄ al 1%, PbOAc al 1%, AgNO₃ al 1%

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	250/293

Método

- **Determinación de actividad.**

1. Preparar 10 tubos o más con 2 mL de solución salina y 1 o 2 gotas de lugol (fig. 2).

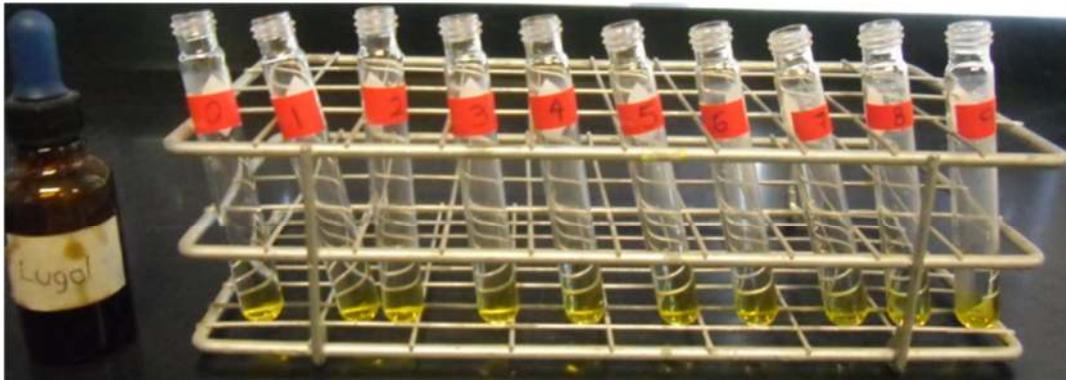


Fig. 2. Tubos con solución salina y lugol.

0. Colocar 6 mL de almidón al 0.8% en baño María a 37°C y añadir 0.8 mL de saliva filtrada y diluida 1:10 con solución salina (a la misma temperatura), mezclar rápidamente y mantener a la misma temperatura.
0. En el momento que se mezcla la saliva con el almidón se toma una alícuota de 0.5 mL, se coloca en uno de los tubos ya preparados, etiquetándolo como tiempo cero, se continúa tomando alícuotas de 0.5 mL a intervalos de 30 segundos, colocándolas en los tubos preparados con solución salina y lugol, observando el color de la reacción hasta llegar al punto acrómico (significa que la solución mantenga el mismo color que tenía originalmente).
1. Guardar el último tubo (punto acrómico), para compararlo con los experimentos posteriores.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	251/293

- **Influencia de los metales pesados sobre la actividad.**

1. Preparar 4 tubos con 6 mL de almidón al 0.8%, que previamente se incubó a 37°C, adicionar al:

Tubo 1. 2 gotas de CuSO_4 al 1%.

Tubo 2. 2 gotas de HgSO_4 al 1%.

Tubo 3. 2 gotas de PbOAc al 1%.

Tubo 4. 2 gotas de AgNO_3 al 1%.

0. Agregar a cada tubo 0.8 mL de saliva filtrada y diluida; agite vigorosamente para homogeneizar y dejar transcurrir el tiempo que se haya necesitado para llegar al punto acrómico en el primer experimento.
0. Al cabo de este tiempo tomar de cada tubo una alícuota de 0.5 mL y colocarlas en tubos que contienen 2 mL de solución salina y 2 gotas de lugol. Anotar los resultados.

- **Efecto de la temperatura.**

1. Colocar 6 tubos (uno a cada temperatura) en baño de agua a 0°, 20°, 37°, 50°, 70° y 90°C; cada tubo contendrá 6 mL de solución de almidón y se mantendrán a esa temperatura por 15 minutos.
2. Al mismo tiempo se colocan en la misma forma (incubados a la respectiva temperatura) otros 6 tubos, que contengan 0.8 mL de saliva (filtrada y diluida).
3. Una vez que ambos grupos de tubos se encuentran a su correspondiente temperatura, se mezclan las 2 soluciones y se mantienen a la misma temperatura por el tiempo acrómico obtenido en el primer experimento.
4. Al término de este tiempo se toman de cada tubo una alícuota de 0.5 mL y se colocan en tubos que contienen 2 mL de solución salina y 2 gotas de lugol. Anotar los resultados.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	252/293

- **Propuesta de otro experimento que afecte la actividad de la amilasa.**

En la siguiente sesión de laboratorio, los alumnos realizan una propuesta para observar otro parámetro que afecte la actividad de la amilasa salival, tomando como base el diseño de los experimentos anteriores.

Resultados

- Reportar el tiempo obtenido para el punto acrómico.
- Interpretar el color obtenido y su intensidad con respecto a la actividad de la amilasa (velocidad de reacción).
- Para el efecto de los metales sobre la actividad enzimática, reportar el color obtenido y la intensidad del efecto sobre la actividad de la amilasa (indique el grado de inhibición con cruces) y analice los resultados de cada caso.
- Para el efecto de temperatura, reportar el color obtenido y utilizar el grado de intensidad como sinónimo de velocidad de reacción para graficarla contra temperatura.

Cuestionario

1. ¿Cuál es el efecto de la temperatura sobre las enzimas?
2. ¿De qué manera interfieren los metales sobre la actividad enzimática?
3. ¿Qué es la constante de Michaelis-Menten? ¿Cómo se obtiene gráficamente y qué indica?
4. ¿Cómo se modifican los valores de K_m para los distintos tipos de inhibidores?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	253/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza; 2007.
2. Aguilar L., Escalante R. Manual de prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos 1. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2008.
3. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
4. Koolman J., Röhm K. Bioquímica: texto y atlas. 3º ed. Madrid: Medica Panamericana, 2004.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Plumer DT. Introducción a la Bioquímica práctica. Barcelona: Mac Graw-Hill; 1987.
7. Rendina G. Técnicas de Bioquímica aplicada. México: Interamericana; 1979.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	254/293

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA

Objetivos

- Demostrar la relación lineal entre la velocidad de reacción y la concentración de la enzima presente.
- Determinar cómo influye el pH del medio sobre la velocidad de una reacción enzimática y su efecto sobre el carácter iónico de la enzima y del sustrato.
- Demostrar que la temperatura afecta las reacciones enzimáticas.
- Observar el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática y determinar k_m , $V_{máx}$, por los métodos conocidos.

Antecedentes académicos

- Características de las enzimas
- Cinética enzimática.
- Modelo de Michaelis-Menten.
- Modelo de Lineweaver-burk.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	255/293

Introducción

Las enzimas en su mayoría son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse, debido a que como catalizadores no pueden acelerar reacciones termodinámicamente desfavorecidas. Las enzimas hacen posible que, en condiciones fisiológicas normales, tengan lugar reacciones, que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH.

Aspectos generales sobre las enzimas. Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Las enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.

Propiedades de las Enzimas. Las enzimas dado su origen proteico poseen una conformación estructural específica que les confiere su función como catalizadores. Esta conformación biológicamente activa coincide con la de mínima energía. Por lo tanto, cualquier cambio en su conformación suele ir asociada de cambios en su actividad catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de un enzima son:

- pH
- Temperatura
- Cofactores
- Concentración de sustrato

Efecto del pH sobre la actividad enzimática. Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol; etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	256/293

parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado pH óptimo.

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura empiezan a desnaturalizarse por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Temperaturas más altas que la óptima producen desnaturalización térmica de la proteína y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

Efecto de los Cofactores Sobre la Actividad Enzimática. Casi un tercio de las enzimas, requieren para su función sustancias no proteicas, llamadas cofactores, los cuales pueden ser iones inorgánicos como Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , etc. Cuando dichos cofactores son moléculas orgánicas, se llaman coenzimas, que se sintetizan a partir de vitaminas. Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos covalentemente a la enzima se llaman grupos prostéticos y dan lugar a la forma activa de la enzima conocida como holoenzima, asimismo, se conoce como apoenzima a la parte proteica inactiva de una enzima.

Cinética Enzimática. La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar el enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad de reacción puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos en unidades de concentración por unidad de tiempo.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	257/293

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos V_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica (fig. 1). Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]_0$, el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (V_{max}).

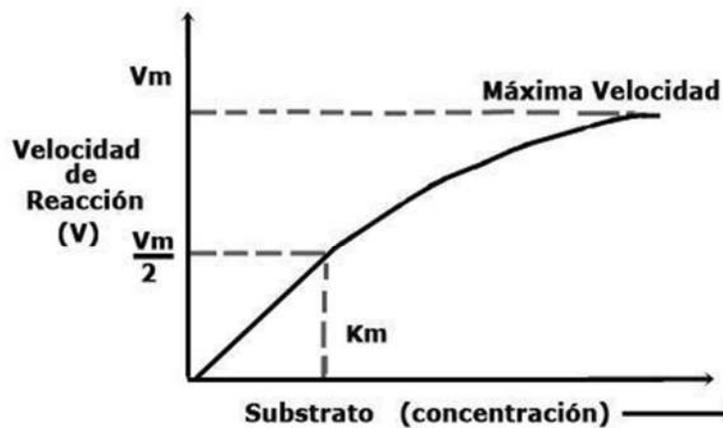


Fig. 1. Gráfica de cinética enzimática.

Para determinar gráficamente los valores de K_M y V_{max} es más sencillo utilizar la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk, (Fig. 2).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	258/293

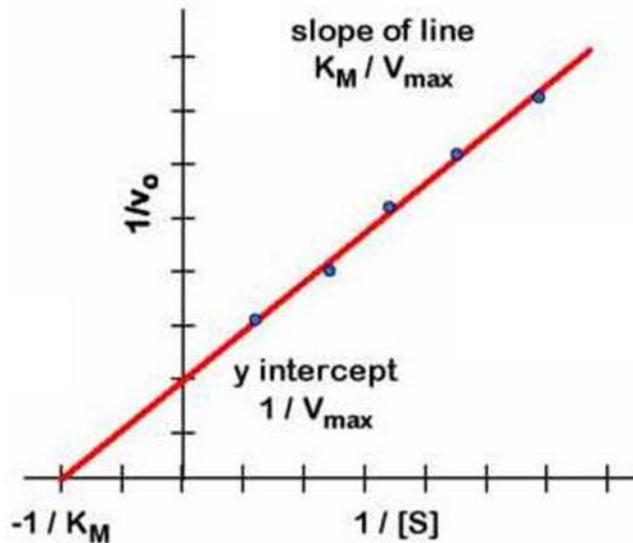


Fig. 2. Gráfica de Lineweaver-Burk.

Material y Equipo

- Pipetas de 0.2, 1 y 5 mL
- Micropipetas p200, p1000 y p5000 μ L
- Tubos de ensaye 16 X 150 mm, (mínimo 20 por equipo)
- Gradilla
- Vasos de precipitados de 100 y 250 mL
- Baño de hielo
- Termómetro
- Vasos de precipitados 30 mL
- Celdas para espectrofotómetro
- Marcador indeleble de punta extrafina
- Baño María
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	259/293

Reactivos

- Sacarosa 0.35 M
- Glucosa 0.005 M - Fructosa 0.005 M
- Regulador de Acetatos 0.05 M pH 4.7
 - Ácido acético
 - Acetato de sodio
- Reactivo de 3,5 dinitrosalicílico
 - Hidróxido de sodio
 - Tartrato de sodio y potasio
 - Fenol
 - Ácido 3,5-dinitrosalicílico
 - Metasulfito de sodio
- Enzima invertasa 10 μg / mL (653 U.I.)
- Regulador de citratos 0.2 M-EDTA 0.01 M
 - Citrato de sodio
 - Ácido cítrico
- EDTA (sal disódica) 0.01 M

Preparación de reactivos

1. Sacarosa 0.35 M.
 - Disolver 119.56 g de sacarosa y llevar a 1 L con agua destilada.
0. Regulador de acetatos 0.05 M pH 4.7.
 - Mezclar 1 L de ácido acético 0.05M (2.88 mL de ácido acético glacial en 1 L de agua destilada), con 1 L de acetato de sodio 0.05M (6.8 g de acetato de sodio en 1 L de agua destilada), verificar el pH y ajustar si es necesario.
0. Reactivo de 3,5-dinitrosalicílico.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	260/293

- Pesar: NaOH 14.0 g, ácido 3,5 dinitrosalicílico 7.50 g, Tartrato de sodio y potasio 216.0 g, Fenol 5.6 g, Metasulfito de sodio 5.9 g. Es importante agregar los reactivos en agua destilada en el orden señalado, no se debe añadir el siguiente sino hasta que se haya disuelto por completo el anterior, finalmente completar a 1 L.
Se debe dejar reposar en frasco ámbar el reactivo por espacio de por lo menos 24H antes de utilizarse.
El reactivo se puede conservar en mejores condiciones en refrigeración.
0. Glucosa 0.005M-Fructosa 0.005M.
 - Pesar 0.9 g de glucosa y 0.9 g de fructosa, mezclarlas y llevar a 1 L con agua destilada.
 0. Solución de invertasa 10 µg (653 U.I).
 - Pesar 1 mg de invertasa y disolver en 100 mL de regulador de acetatos 0.05 M pH 4.7.
 0. EDTA (Sal disódica) 0.01 M.
 - Pesar 3.72 g de EDTA y llevar a 1 L con agua destilada.
 0. Regulador de citratos 0.2M-EDTA 0.01 M.
 - Pesar 5.88 g de citrato de sodio y llevar a 100 mL con una solución de EDTA 0.01 M. Pesar 4.2 g de ácido cítrico y llevar a 100 mL con una solución de EDTA 0.01 M.
Mezclar estas dos soluciones para obtener los reguladores de pH 2.5, 3.5, 4.5, 5.0, 5.5, 6.5 y 7.5 (adicionar NaOH para ajustar el PH).



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	261/293

Método

1. Curva Estándar De Azúcares Reductores

La curva estándar permite calcular la concentración del producto formado en las reacciones catalizadas por enzimas. En esta práctica, la concentración de azúcares reductores en μmol , que posteriormente se divide entre el tiempo de reacción para obtener la velocidad de la reacción en $\mu\text{moles/min}$.

No. Tubo	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa 0.005M -Fructosa 0.005M (mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.75
Sacarosa 0.35M (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Regulador de acetatos 0.05M, pH 4.7 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Agua (mL)	1	0.95	0.9	0.8	0.6	0.4	0.25
3,5-DNS (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Desarrollo de color	5 min. A 92°C (en baño María)						
Dilución	Colocar en baño de hielo y diluir con 2 mL de agua destilada.						
Mantener en hielo y leer en un espectrofotómetro a 540 nm.							



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	262/293

2. Efecto de la Concentración de Enzima

Preparar una serie de tubos de acuerdo al siguiente cuadro.

No. Tubo	Blanco	1	2	3	4	5
Sacarosa 0.35 M (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.7 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Agua (mL)	0.75	0.95	0.9	0.85	0.8	0.75
Preincubación: 5 min. a temperatura ambiente						
Enzima 10 µg/mL, (mL)	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
Incubación: 5 min. a temperatura ambiente.						
Inactivación	0.5 mL de 3,5-DNS a cada tubo					
	0.25 mL de enzima					
Desarrollo de color	5 min. a 92 °C (en baño María)					
Dilución	Colocar en baño de hielo y diluir con 2 mL de agua destilada.					
Mantener en hielo y leer en un espectrofotómetro a 540 nm.						



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	263/293

3. Efecto de pH

Preparar una serie de tubos de acuerdo al siguiente cuadro.

Tubo No	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Sacarosa 0.35 M (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Regulador de citratos 0.2 M	pH=	pH=	pH=	pH=	pH=	pH=	pH=	pH=
EDTA 0.01 M (0.25 mL)	5.0	2.5	3.5	4.5	5.0	5.5	6.5	7.5
Agua (mL)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Preincubación 5 min. a temperatura ambiente								
Enzima 10 µg/mL (mL)	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Incubación 5 min. a temperatura ambiente								
Inactivación	0.5 mL de 3,5-DNS a cada tubo.							
	0.25 mL de enzima							
Desarrollo de color	5 min. a 92 °C (en baño María)							
Dilución	Colocar en baño de hielo y diluir con 2 mL de agua destilada							
Mantener en hielo y leer en un espectrofotómetro a 540 nm								



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	264/293

4. Efecto de la Temperatura

Para lograr el objetivo de esta práctica la temperatura de preincubación e incubación se deben mantener constantes durante todo el experimento. Al agregar el 3,5-DNS retirar inmediatamente del baño, el tubo y blanco que corresponde a cada temperatura y sumergirlo en hielo.

Una vez desarrollado el color, ajustar a cero de absorbancia con el blanco y realizar las lecturas para cada temperatura.

Preparar una serie de tubos de acuerdo al siguiente cuadro:

Tubo No	B1	B2	B3	B4	B5	B6	1	2	3	4	5	6
Sacarosa 0.35 M (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Regulador de acetatos 0.05 M pH 4.7 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Agua (mL)	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
Preincubación (°C) 5 min.	0	25	37	50	75	92	0	25	37	50	75	92
Enzima 10 µg/mL (mL)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Incubación (°C) 5 min.	0	25	37	50	75	92	0	25	37	50	75	92
Inactivación	0.5 mL de 3,5-DNS a cada tubo											
	0.12 mL de Enzima											
Desarrollo de color	5 min. a 92 °C (en baño María)											
Dilución	Colocar en baño de hielo y diluir con 2 mL de agua destilada											
Mantener en hielo y leer en un espectrofotómetro a 540 nm												



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	265/293

5. Efecto de la concentración de Sustrato

Preparar una serie de tubos de acuerdo al siguiente cuadro:

Tubo No	Blanco	1	2	3	4	5
Sacarosa 0.35 M (mL)	0.5	0.05	0.12	0.17	0.25	0.5
Regulador de acetatos 0.05 M, pH =4.7 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Agua (mL)	0.75	1.2	1.13	1.08	1	0.75
Pre-incubación 5 min. a temperatura ambiente						
Enzima 10 µg/mL. (mL)	0.0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Incubación	5 min. a temperatura ambiente.					
Inactivación	0.5 mL de 3,5-DNS a cada tubo					
	0.25 mL de enzima					
Desarrollo de color	5 min a 92°C (en baño María)					
Dilución	Colocar en baño de hielo y diluir con 2 mL de agua destilada					
Mantener en hielo y leer en un espectrofotómetro a 540 nm						



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	266/293

Resultados

- Elaborar la curva estándar, con las lecturas de absorbancia y concentración de azúcares reductores.
- Con ayuda de la curva estándar, obtener la concentración de azúcares reductores en μmol .
- Calcular la velocidad considerando que el tiempo de reacción fue de 5 min.
- Realizar las gráficas:
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs concentración de enzima [E] en μg .
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs pH
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs temperatura en $^{\circ}\text{C}$
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs concentración de sustrato [S] en μmol .
- Realizar las siguientes determinaciones:
 - pH y temperatura óptima de la enzima
 - K_m y $V_{\text{máx}}$ por el procedimiento gráfico de Lineweaver-Burk.

Cuestionario

1. ¿Qué es una Enzima?
2. ¿Cómo afecta temperatura y pH extremos la actividad enzimática?
3. Describa el significado de K_m y $V_{\text{máx}}$ y ¿cómo se obtienen de forma gráfica?
4. ¿Qué significado tiene una unidad estándar de actividad enzimática?
5. Mencione 5 enzimas utilizadas en la industria, y en qué procesos participan.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	267/293

Referencias

1. Clark J. Bioquímica experimental. México: Ed. Limusa; 1966.
2. García-del Valle A, Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT. Protocolos de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2004
3. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011.
4. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2023.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 7ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2020.
6. Plumer DT. Introducción a la bioquímica práctica. 2a Ed. Mac Graw-Hill; 1987.
7. Tena AM, Jorrín NJV. Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Córdoba 2011 [on line] disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32%20INVERTASA%20CIN%C3%89TICA.pdf>.
8. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 4ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2016.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	268/293

MITOSIS

Objetivos

- Identificar los principales cambios morfológicos que se presentan durante la profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis en células de raíces de cebolla.
- Realizar las preparaciones de raíces de cebolla.
- Observar en el microscopio las diferentes fases de la mitosis en raíces de cebolla.
- Evaluar la importancia de la división celular en el desarrollo, el crecimiento y la reposición de células en tejidos dañados o deteriorados.

Antecedentes académicos

- Estructura celular
- Ciclo celular
- Etapas de la mitosis
- Características estructurales y funcionales de los cromosomas



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	269/293

Introducción

Todos los seres vivos uni-pluricelulares tienen como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones. Al reproducirse, las células de los diferentes organismos tendrán que asegurar que todo el material se reparta en forma aproximadamente equitativa entre las células hijas resultantes. No obstante, existe una molécula que tendrá que ser duplicada exactamente, el ácido desoxirribonucleico o ADN, la molécula encargada de definir a los diferentes organismos y la responsable de la herencia. Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso conocido como ciclo celular, el cual está determinado por cinco fases diferentes, las que aseguran que el ADN se duplique, fase S (síntesis), se reparta exactamente entre dos núcleos, o fase M (mitosis), y que dichos núcleos posteriormente formen parte de dos células independientes al repartirse el material celular y dividirse la célula madre, o citocinesis.

Las dos fases restantes, llamadas G1, G2 anteceden a las fases de síntesis y de mitosis, respectivamente, y son fases donde ocurren múltiples procesos regulatorios propios del ciclo celular.

La mitosis es un proceso de división nuclear en el que las moléculas replicadas de ADN de cada cromosoma se reparten con exactitud en dos núcleos. La mitosis suele acompañarse de la citocinesis, un proceso por el que una célula en división se separa en dos, con lo que el citoplasma se divide en dos paquetes celulares. Las dos células hijas resultantes de la mitosis y la citocinesis tienen un contenido genético idéntico entre sí al de la célula madre de la que provienen. Por tanto, la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para el crecimiento y el mantenimiento de un organismo. La mitosis puede ocurrir en células haploides o diploides. Las células mitóticas haploides se encuentran en hongos, gametofitos de las plantas, y en unos cuantos animales. La mitosis es una etapa del ciclo celular en la que la célula dedica toda su energía a una sola actividad: la separación cromosómica. Como resultado la mayor parte de las actividades metabólicas de la célula, entre ellas la transcripción y la



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	270/293

traducción se detienen durante la mitosis y la célula entra en una falta relativa de respuesta a los estímulos externos.

- **La mitosis se divide en cinco etapas:**

PROFASE. En la profase la envoltura nuclear permanece intacta mientras que la cromatina duplicada durante la fase S se condensa en estructuras cromosómicas definidas llamadas cromátidas. Los cromosomas de las células mitóticas contienen dos cromátidas conectadas entre sí por el centrómero. Se forman complejos proteínicos especializados, llamados cinetocoros y se asocian a cada cromatina. Los microtúbulos del huso mitótico se conectarán a cada cinetocoro a medida que los cromosomas se empiezan a separar más tarde en la mitosis. Los microtúbulos del citoplasma se desensamblan y luego se reorganizan sobre la superficie del núcleo para formar el huso mitótico. Dos parejas de centriolos se alejan mutuamente al crecer los haces de microtúbulos que forman el huso mitótico. El nucléolo, el orgánulo dentro del núcleo en el que sintetizan los ribosomas, desaparecen en la profase.

PROMETAFASE. La desaparición de la envoltura nuclear marca el comienzo de la prometafase. Los microtúbulos del huso se unen a los cinetocoros y empujan a los cromosomas a lo largo del huso.

METAFASE. La metafase se caracteriza porque las cromátidas están alineadas en el ecuador del huso, a medio camino entre los dos polos. Las cromátidas alineadas forman la placa de la metafase. Las células se pueden detener en la metafase cuando se utilizan inhibidores de los microtúbulos. Los análisis del cariotipo utilizados para determinar la composición y la estructura global del cromosoma, suelen requerir que las células estén en metafase.

ANAFASE. En anafase, los polos mitóticos se siguen separando como resultado del alargamiento de los microtúbulos polares. Cada centrómero se divide en dos y también



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	271/293

se separan las parejas de cinetocoros. Las cromátidas hermanas migran hacia los polos opuestos del huso.

TELOFASE. La telofase es la última fase de la división nuclear, que se caracteriza por la desaparición de los microtúbulos del cinetocoro y la disociación del huso mitótico. Se forman las envolturas nucleares alrededor de los dos núcleos que contienen las cromátidas, que se descondensan en cromatina dispersa, y los nucléolos se vuelven a formar en los núcleos de las células hijas.

Observación de células en mitosis en raíz de cebolla

La raíz de la cebolla es utilizada en experimentos de laboratorio para ver cómo ocurre la división celular en plantas. La raíz de cebolla es elegida por lo general debido a que sus cromosomas son más grandes que en la mayoría de otras plantas y se tiñen de oscuro, haciéndolos más fáciles de ver bajo el microscopio. Es un tejido excelente y fácil de obtener para esta práctica, es el tejido que prolifera en las puntas de raíz del *Allium cepa* (cebolla), donde pueden localizarse muchas células en mitosis.

Para obtener las preparaciones adecuadas es preciso disponer de cebollas frescas y colocarlas en frascos de boca amplia, de manera que la zona de las raíces esté en contacto con el agua del frasco. En este punto es necesario advertir que deben utilizarse cebollas que no hayan sido sometidas a procesos de radiación o químicos usados para evitar la germinación.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	272/293

Material y Equipo

- Microscopio Óptico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Bisturí
- Pinzas punta de roma
- Vidrios de reloj
- Varilla de vidrio con gendarme
- Papel filtro
- Papel seda

Reactivos

- Solución colorante de acetorceína y/o acetocarmín.
- Líquido de Carnoy (10 mL de ácido acético glacial, 30 mL de cloroformo, 60 mL de etanol absoluto).
- Solución etanol-HCl (mezcla 1:1 V/V etanol 96% y HCl concentrado).

Material Biológico

- Raicillas de cebolla fijadas en etanol al 70%, puestas a germinar una semana antes de realizar la práctica.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	273/293

Método

1. Promover el crecimiento de las raíces de la cebolla. La cebolla deberá ser colocada en agua para promover el crecimiento de las raicillas (fig. 1).



Fig.1. Forma en que se coloca la cebolla para el crecimiento de las raíces.

2. Trabajar con raicillas que se hayan cortado y fijado con anterioridad en etanol al 70% durante 12 y 24 horas (fig. 2), utilizando pinzas de disección.



Fig.2. Raíces de cebolla cortadas y fijadas en etanol al 70%.

3. Utilizar pinzas de disección, escoger algunas de las raicillas (manipular las raicillas por donde se hayan cortado y no por la punta o meristemo) y transferirlas a un vidrio de

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	274/293

reloj que contiene 1 mL de solución etanol-HCl y dejarlas durante 5 minutos en la solución (fig. 3). Este tratamiento destruye el cemento que mantiene unida a todas las células.



Fig.3. Raíces de cebolla con solución de etanol-HCl.

4. Cortar las raicillas aproximadamente de un largo de 3 mm y transferirlas a otro vidrio de reloj que contiene líquido de Carnoy (el reactivo de Carnoy es venenoso y flamable), dejarlas en este líquido durante 3 minutos (fig. 4). Este tratamiento endurece el material, el cual ya está ablandado con la solución de etanol-HCl y que reduce cualquier daño a las células en los siguientes procedimientos.



Fig.4. Raíces de cebolla con líquido de Carnoy

5. Nuevamente transferir las raicillas al centro de un portaobjetos limpio. Utilizando un bisturí o navaja de rasurar cortar la punta o meristemo de las raicillas (últimos 2 mm) y desechar el resto. Inmediatamente añadir 1 a 2 gotas de la solución colorante de acetorceína o acetocarmín (fig. 5).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	275/293

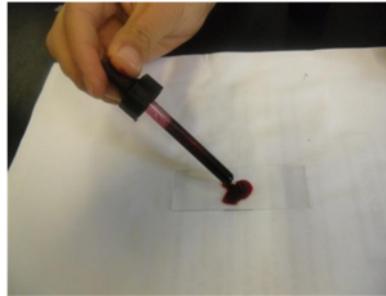


Fig.5. Colorante acetocarmín agregado a las raíces de cebolla.

6. Cortar la punta en pedazos pequeños en forma de maceración (Figs. 6 y 7) y dejar en solución durante 5 minutos. No dejar que la preparación se seque; si esto sucede añadir más colorante.

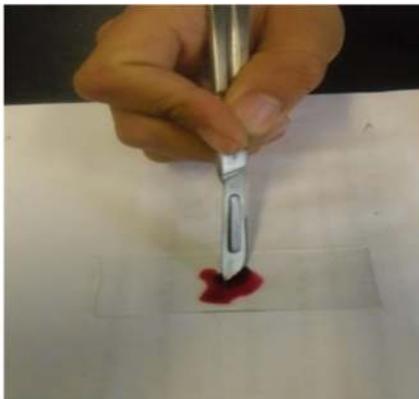


Fig.6. Corte de las raíces de cebolla con bisturí.

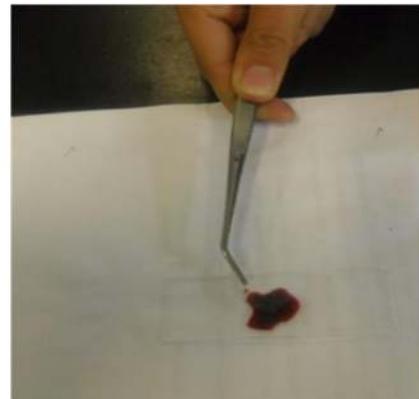


Fig.7. Maceración de las raicillas.

7. Después colocar un cubreobjetos limpio sobre la muestra y con la goma de un lápiz en forma vertical presionar ligeramente (Fig. 8), para dispersar las células unas con otras, enseguida realice un squash (Fig. 9) que consiste en colocar la preparación con el cubreobjetos hacia abajo sobre un papel filtro y con los pulgares de las manos apoyando el peso del cuerpo ejercer una fuerte presión evitando que la preparación se desplace. Si quedan burbujas de aire en la preparación, elimínelas poniendo al borde del cubreobjetos una gota de colorante.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	276/293

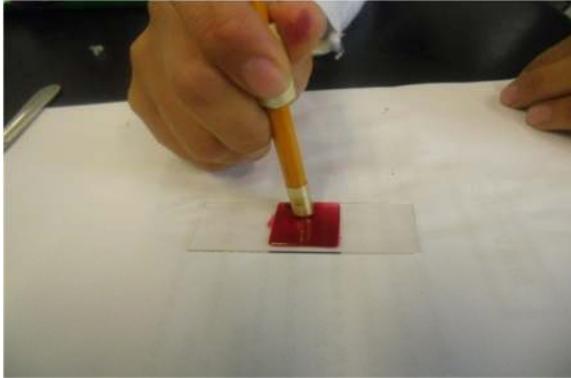


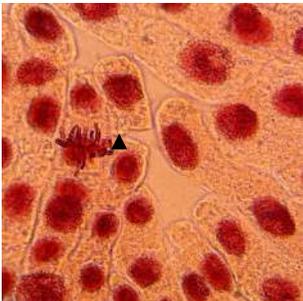
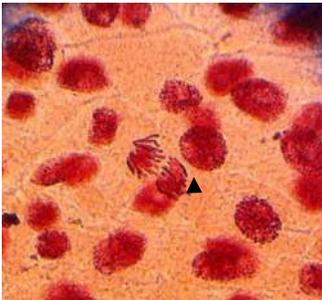
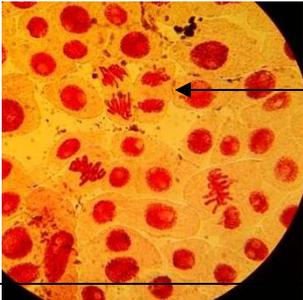
Fig.8. Imagen de la forma en que se debe colocar el portaobjetos encima de la muestra.



Fig.9. Squash de la preparación.

8. Hacer las observaciones e identificar las fases de la MITOSIS, al microscopio utilizando los objetivos; 10X, 40X, y 100X (Fig. 10).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	277/293

	<p>Profase</p>
	<p>Metafase</p>
	<p>Anafase</p>
	<p>Telofase</p>



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	278/293

Resultados

- Realizar los esquemas, dibujos y tomar fotografías de las observaciones vistas al microscopio, indicando el aumento en el que se observaron y describiendo las estructuras identificadas, así como la etapa de la mitosis a la que corresponde.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia de la mitosis?
2. ¿Cuáles son las etapas de la mitosis?
3. ¿Cuáles son las estructuras celulares que se distinguen durante la mitosis?
4. ¿Qué es el meristemo?
5. ¿Cuál es la función del huso mitótico?
6. ¿Qué es la meiosis? ¿Qué diferencias presenta con respecto a la mitosis?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	279/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Chandar N. Biología molecular y celular. México: Wolters Kluwer Health; 2010.
3. Jiménez F, García M. Biología celular y molecular. México: Pearson; 2003.
4. Karp G. Biología celular y molecular (conceptos y experimentos). 6ª ed. México: McGraw Hill; 2011.
5. Lincoln T. Fisiología vegetal. 3ª ed. USA: Publicaciones de las Universitat Jaume; 2006.
6. Stephen R. Bolsover J. Biología celular. España: Acribia; 2008.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	280/293

FOTOSÍNTESIS

Objetivos

- Analizar el proceso fotosintético.
- Aplicar el fundamento de la cromatografía en papel para determinar los pigmentos fotosintéticos que se encuentran presentes en las plantas.
- Identificar los pigmentos fotosintéticos a partir de un barrido en el espectrofotómetro.
- Observar la diferencia de pigmentos que se encuentran en una planta verde y una roja a partir de su cromatografía en papel.

Antecedentes académicos

- Reacciones del proceso de Fotosíntesis.
- Pigmentos fotosintéticos.
- Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos.
- Cromatografía en papel.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	281/293

Introducción

En una planta más del 90% de su peso seco está constituido por las diferentes sustancias y moléculas orgánicas que forman sus estructuras celulares o que regulan su metabolismo. Las cadenas carbonadas iniciales que emplean todas las células la proporciona la fotosíntesis.

La vida en la Tierra continúa dependiendo de la fotosíntesis. Los organismos fotosintéticos capturan la energía de la luz y, en una serie de reacciones muy complejas, la utilizan para fabricar glucósidos y liberar el oxígeno, a partir del dióxido de carbono y del agua.

La fotosíntesis es en esencia un proceso de óxido-reducción, en el que el carbono del dióxido de carbono (CO₂) se reduce a carbono orgánico. Aunque en algunos microorganismos fotosintéticos el proceso es diferente, la fotosíntesis en las plantas consiste básicamente en la producción de una sustancia orgánica (un glúcido sencillo) a partir de moléculas inorgánicas (el dióxido de carbono como sustrato a reducir, y el agua como dador de electrones que se oxida) mediante el aprovechamiento de la energía lumínica (que queda almacenada como energía química dentro de la molécula sintetizada) y con desprendimiento de oxígeno. El proceso global puede expresarse mediante la siguiente reacción:



Para que la energía de la luz pueda ser usada por los seres vivos, primero ha de ser absorbida. Una sustancia que absorbe la luz se denomina pigmento. Algunos pigmentos absorben la luz en todas las longitudes de onda y por lo tanto tienen un color negro. Otros exclusivamente absorben a ciertas longitudes de onda y reflejan o transmiten las

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	282/293

longitudes de onda que no absorben. Por ejemplo, la clorofila, el pigmento que hace que las hojas sean verdes, absorbe la luz en el espectro violeta y azul y también en el rojo. Puesto que transmite y refleja la luz verde, su aspecto es verde (Fig. 1).

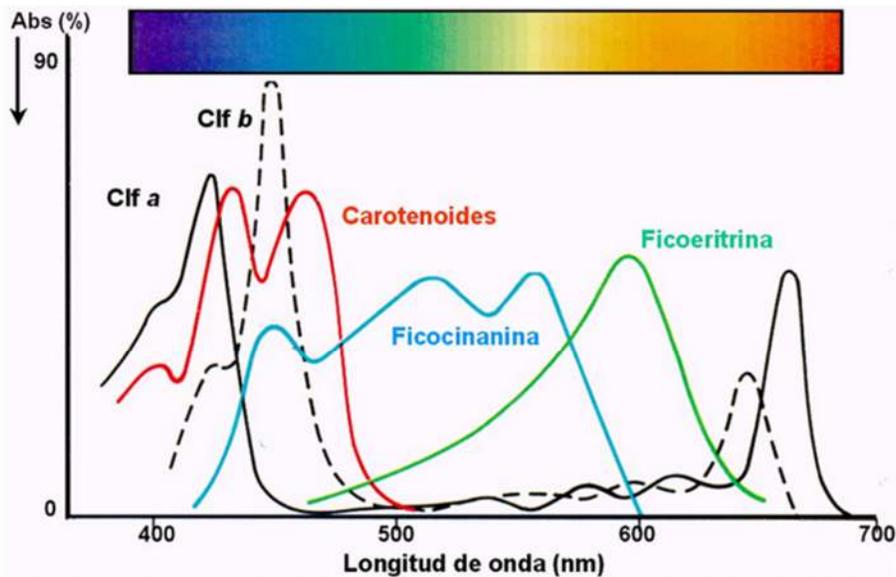


Fig. 1. Espectro de absorción de las clorofilas a y b. El eje horizontal muestra la longitud de onda desde 400 nm (luz azul) hasta 700 nm (luz roja).

Los diversos grupos de organismos fotosintéticos usan varios tipos de pigmentos en la fotosíntesis. Existen diferentes clases de clorofilas, que varían ligeramente en su estructura molecular. La molécula de clorofila está formada por un anillo de porfirina con un átomo de magnesio en su centro, y asociado a este una cadena de fitol (alcohol de cadena larga) (Fig.2).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	283/293

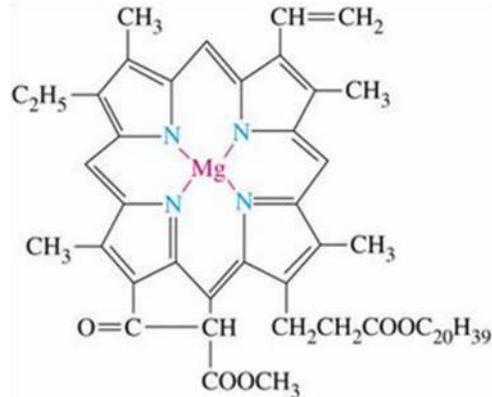


Fig. 2. Estructura de la clorofila.

La relación entre la fotosíntesis y la presencia de estos pigmentos queda claramente de manifiesto cuando se compara el espectro de acción de la fotosíntesis (eficiencia fotosintética frente a longitud de onda) con los espectros de absorción de las clorofilas.

Cuando un pigmento absorbe luz, los electrones de las moléculas son lanzados a niveles energéticos superiores. En la mayoría de los casos, los electrones vuelven a su estado inicial casi de inmediato. La energía desprendida cuando regresan al nivel energético puede (1) emitirse de nuevo en una longitud de onda superior, fenómeno que se conoce como fluorescencia, (2) disiparse en forma de calor (conversión interna), o (3) ser absorbida por una molécula vecina, que lanza sus electrones a niveles de energía superiores (transferencia de extinción por resonancia inductiva).



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	284/293

Material y Equipo

- Mortero con pistilo
- Embudo de tallo largo
- Hojas de plantas verdes y rojas
- Espectrofotómetro.
- Papel filtro de poro abierto.
- Celdas
- Soporte universal
- Anillo de hierro.
- Vasos de precipitados de 150 y 250 mL

Reactivo

- Alcohol 96^o



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	285/293

Método

1. Lavar las hojas cuidadosamente utilizando únicamente agua hasta quitar cualquier excedente de tierra (Fig. 3).



Fig.3. Hojas sin excedente de tierra.

0. Cortar las hojas en trozos pequeños (sin nervaciones) y triturarlas en un mortero, adicionando etanol constantemente para facilitar la extracción de los pigmentos, hasta que el líquido adquiera una coloración similar a la de la hoja.
0. Filtrar el macerado con ayuda de un embudo de tallo largo y papel filtro de poro abierto. Recolectar el filtrado en un vaso de precipitados de 150 mL.
0. Colectar 5 mL del filtrado en un tubo de ensayo y guardarlo para la prueba espectrofotométrica.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	286/293

Cromatografía en papel.

1. Recortar una tira de papel filtro de poro abierto de 20 cm x 7 cm e introducirla en el vaso que contiene el filtrado como lo ilustra la figura 4. Esperar a que eluya la mezcla de pigmentos y se formen las bandas de los diferentes pigmentos eluidos.



Fig.4. Elución de pigmentos fotosintéticos.

0. Realizar el procedimiento anterior utilizando hojas rojas o incluso mezclando hojas verdes y rojas (Figs. 5, 6 y 7).



Fig.5. Cromatografía en papel de mezcla de hojas verdes y rojas.



Fig.6. Cromatografía en papel de pigmentos de hoja roja.



Fig.7. Cromatografía en papel de pigmentos de hoja verde.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	287/293

- **Análisis espectrofotométrico.**

1. Realizar una dilución 1:30 del extracto con etanol.
2. Pasar la muestra a una celda (Fig. 8) y hacer un barrido en el espectrofotómetro registrando las absorbancias cada 10 nm desde los 400 hasta los 750 nm. El blanco de ajuste será etanol al 96%.

Nota: Recordar ajustar a 0 de absorbancia cada que se cambie la longitud de onda.

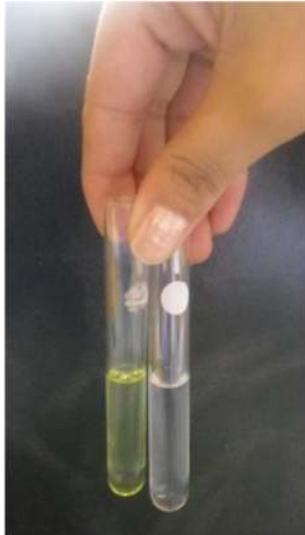


Fig.8. Muestra y blanco de ajuste.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	288/293

Resultados

- Identifique los pigmentos obtenidos durante la cromatografía en papel.
- Realice la gráfica de absorbancia contra longitud de onda (espectro de absorción) del pigmento extraído.
- Analice y fundamente los resultados obtenidos en el espectro de absorción experimental, con respecto al espectro teórico de los diferentes pigmentos fotosintéticos.

Cuestionario

1. ¿Qué es la fotosíntesis? Describa el proceso de manera general.
2. ¿Cuál es la importancia de los pigmentos fotosintéticos?
3. En cuanto a los pigmentos, ¿Cuál es la diferencia entre una hoja verde y una hoja roja?
4. ¿Por qué se utiliza etanol en la extracción?
5. ¿Cuál es la diferencia entre los diferentes tipos de clorofila además de su estructura?
6. ¿Qué ventajas presenta el utilizar la cromatografía en papel?



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	289/293

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza; 2007.
2. Campbell MK, Farrell SO. Bioquímica. 6a ed. México DF: Cengage Learning; 2010.
3. García F, Rosello J, Santamarina M. Introducción al funcionamiento de las plantas. Valencia: Editorial de la UPV; 2006.
4. Hall D. Fotosíntesis. Madrid: Omega; 1997.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. Madrid: McGraw Hill-Interamericana; 2009.
6. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	290/293

MATERIAL BÁSICO

- ✓ Agua destilada (en cada sesión deberá tener cada equipo por lo menos 1 litro de agua).
- ✓ Estuche de disección (tijeras, pinzas y bisturí).
- ✓ Papel seda especial para limpiar lentes.
- ✓ Agitador de vidrio de 15 o 20 cm.
- ✓ Papel pH y papel tornasol.
- ✓ Papel filtro de diferentes tamaños de poro.
- ✓ Baño María para calentamiento.
- ✓ Vidrio de reloj de 10 cm.
- ✓ Espátula.
- ✓ Frasco de torundas con alcohol.
- ✓ Ligadura.
- ✓ Asa bacteriológica.
- ✓ Jeringa desechable de 5 mL.
- ✓ Frascos goteros.
- ✓ Frascos de diferentes capacidades.
- ✓ Pipetas Pasteur con bulbo.
- ✓ Cinta masking tape, lápiz graso y marcador.
- ✓ Pizeta de 500 mL.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	291/293

- ✓ Tubos de ensaye de 13 x 100 mm y 16 x 150 mm.
- ✓ Escobillón para tubos de ensaye.
- ✓ Jabón y franela para limpiar su área de trabajo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-QFB-ML07	08/08/2025	3	292/293

ANEXO 1.- Carta compromiso



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Carrera: _____

Periodo: _____ **Grupo:** _____

Módulo o asignatura: _____

Docente responsable: _____

Me dirijo a usted en calidad de docente del módulo o asignatura referida, para solicitar su participación en la actividad académica planteada en el manual de prácticas.

1. La actividad a la que se le invita implica un procedimiento sencillo y seguro, con un bajo perfil de riesgo. Los efectos adversos, si los hubiera, serían leves y serán debidamente explicados de manera verbal frente a todo el grupo además de estar en el manual correspondiente
2. Su participación consiste en seguir las indicaciones y precauciones indicadas en el manual y expuestas por el docente al grupo, en apego a la normatividad y códigos éticos involucrados.
3. La información obtenida y discutida durante las actividades será tratada con la más estricta confidencialidad, de acuerdo con las disposiciones del Aviso de Privacidad de la Facultad y de la Carrera.
4. Usted se reserva el derecho de retirar su consentimiento en cualquier momento de la actividad, por contravenir sus principios morales y religiosos o cursar alguna situación clínica, etc., sin necesidad de dar explicaciones. Su decisión no afectará la relación con el personal docente de la asignatura o módulo

Declaración de Consentimiento

Comprendo completamente la naturaleza de las actividades y que mi participación como estudiante es fundamental para el cumplimiento de los objetivos académicos, ya sea personal grupal. Se que en su momento serán respondidas todas mis preguntas de manera satisfactoria y soy consciente de que mi participación es totalmente voluntaria y que puedo retirarme en cualquier momento sin repercusiones. Al firmar la lista anexa, confío que recibiré toda la información necesaria, para tomar una decisión informada y que doy mi consentimiento libre y voluntario para participar.

Firma de Testigos

Se adjunta la Lista Firma de Enterado SGC-FPO05-06 que contiene las firmas de todos los estudiantes y docentes que participarán en las actividades del módulo/asignatura especificada en este documento. Esta lista será incorporada al consentimiento informado.

Ciudad de México, a _____ de _____ 20 _____