



BIOQUÍMICA

ESTRUCTURAL

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Ángela Ávila Fernández
María del Pilar Pozos Parra
Janeth del Carmen Santos Acosta
José Antonio Morales Contreras
Laura Judith Quiñonez Díaz
Xavier Miguel Boldo León
Luis Fernando Trujillo Castillo
Nury Hernández Díaz
Viridiana Olvera Hernández
Leticia del Carmen Vázquez López



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

Bioquímica Estructural

Prácticas de laboratorio

C O L E C C I Ó N

HÉCTOR OCHOA BACELIS

Textos de enseñanza de Ciencias Básicas

Guillermo Narváz Osorio
Rector

Mirian Carolina Martínez López
División Académica de Ciencias de la Salud

Bioquímica Estructural

Prácticas de laboratorio

Ángela Ávila Fernández
María del Pilar Pozos Parra
Janeth del Carmen Santos Acosta
José Antonio Morales Contreras
Laura Judith Quiñonez Díaz
Xavier Miguel Boldo León
Luis Fernando Trujillo Castillo
Nury Hernández Díaz
Viridiana Olvera Hernández
Leticia del Carmen Vázquez López



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

Primera edición, 2021

D.R. © Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
www.ujat.mx

ISBN: 978-607-606-575-4

Para su publicación esta obra ha sido dictaminada por el sistema académico de pares ciegos. Los juicios expresados son responsabilidad del autor o autores y fue aprobada para su publicación.

Queda prohibida la reproducción parcial o total del contenido de la presente obra, sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal de Derechos de Autor.

Hecho en Villahermosa, Tabasco, México.

Índice

Agradecimientos académicos	7
Introducción	8
Reglamento y medidas de seguridad para el uso del laboratorio	10
Consideraciones generales	13
Capítulo 1. Equipo y conceptos básicos	14
Práctica 1. Uso de las balanzas granataria y analítica	15
Práctica II. Uso y verificación de micropipetas	32
Práctica III. Preparación de disoluciones	48
Práctica IV. Uso del potenciómetro	65
Capítulo 2. Técnicas analíticas de cuantificación	76
Práctica V. Cuantificación de azúcares reductores	82
Práctica VI. Cuantificación de proteínas	92
Práctica VII Cuantificación de actividad enzimática de la amilasa salival	102
Anexo I. Vinculación del manual con el programa de la asignatura de Bioquímica Estructural	118
Anexo II. Instrumentos de Laboratorio	119
Anexo III. Diagrama de flujo de cómo realizar una práctica	123

Agradecimientos académicos

A los miembros del Comité Sinodal de las alumnas de la Licenciatura en Nutrición de la UJAT, María del Pilar Pozos Parra y Janeth del Carmen Santos Acosta:

Mtra. Alma Mileira Zetina Esquivel

Mtra. Ligia Araceli Barragán Lizama

Mtro. Luis Fernando Trujillo Castillo

Por la revisión y aprobación de este manual como modalidad de titulación.

Introducción

Este manual de prácticas de laboratorio considera el aspecto experimental del programa de estudios de la asignatura de Bioquímica Estructural de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Dicha asignatura es parte del Área de formación Sustantiva Profesional, por lo que brinda los fundamentos teóricos y metodológicos para desarrollarse en el campo profesional, proporcionando una formación sólida a través de la integración de conocimientos prácticos y teóricos, que permiten desarrollar habilidades y destrezas específicas, para el ejercicio profesional. Las prácticas están diseñadas para realizar actividades tanto en el laboratorio como fuera de él, con el fin de que los alumnos reafirmen sus conocimientos en Bioquímica. El manual está dividido en dos partes, en la primera se considera el empleo del equipo básico utilizado en un laboratorio de Bioquímica, así como los conceptos elementales de química empleados durante las prácticas. La segunda parte considera tres prácticas que permiten cuantificar azúcares reductores, proteínas y actividad enzimática. La realización de estas prácticas contribuirá a comprender las propiedades estructurales y químicas básicas de las proteínas y los glúcidos que han permitido un amplio desarrollo tecnológico. El contenido se encuentra directamente vinculado a los objetivos del programa de estudio, dando énfasis en conocer y comprender las aplicaciones en el ámbito clínico y alimentario. La estructura de cada práctica considera los siguientes apartados: objetivo, fundamento, material, desarrollo de la práctica, consideraciones particulares, literatura consultada y guía de reporte de resultados. Con el fin de facilitar la integración del conocimiento, algunas prácticas están organizadas de tal manera que el alumno utilizará los conocimientos y productos obtenidos en las prácticas previas. Por otro lado, y dado el enfoque de aprendizaje basado en competencias de las asignaturas de la

Licenciatura en Nutrición de la UJAT, se ha incluido una novedosa guía de reporte de prácticas donde el alumno describe el proceso de planeación y ejecución de la práctica en tres ámbitos: individual, por equipo y grupal; con el fin de que evalúe su capacidad para: comprender los fundamentos y planear la práctica, organizarse y trabajar en equipo, comprometerse de forma individual en la práctica grupal e integrarse en el desarrollo de la práctica y el análisis de los resultados.

Reglamento y medidas de seguridad para el uso del laboratorio

1. Algunas sustancias que se emplean en el laboratorio son peligrosas y pueden dañar la salud si no se siguen los protocolos de seguridad, es por ello que, es importante, sin excepción, entrar al laboratorio utilizando:

- Bata blanca con botones abrochados.
- Guantes de látex.
- Zapatos blancos cerrados de suela antiderrapante, clínicos y de piel (no deben ser de tela o de plástico).
- Cabello perfectamente recogido.
- Uñas cortas y sin esmalte.
- Cubrebocas cuando se requiera.
- Sin ornato (aretes, anillos, pulseras, reloj).

2. Los objetos personales por seguridad no deben colocarse sobre las mesas. Éstos deberán colocarse debajo de las mesas o en los espacios designados para ello.

3. Está estrictamente prohibido:

- Correr, brincar, gritar y sentarse sobre las mesas.
- Empujarse.
- Comer o ingerir líquidos y masticar chicle.
- Introducir bebidas alcohólicas y cigarros.

- Maquillarse.
 - Utilizar cualquier tipo de distractores durante la práctica, como son: el teléfono celular, audífonos, las conversaciones, entre otros.
4. Por higiene y con la finalidad de evitar alguna reacción alérgica o contagio, por el hecho de estar en un laboratorio donde se manejan sustancias peligrosas, al iniciar y finalizar la práctica, deberán SIEMPRE:
- Limpiar los espacios de trabajo.
 - Lavarse las manos.
 - Al finalizar la práctica, deberán lavar el material utilizado: eliminar etiquetas y marcas (con alcohol al 70 %) y entregarlo o colocarlo en los lugares asignados para ello.
5. Antes de comenzar la práctica, deberá etiquetar el material donde se prepararán las disoluciones y se colocarán los productos de los experimentos, con cinta para empapelar “masking tape”, etiquetas o marcador permanente (siempre y cuando se escriba sobre la cinta). Las etiquetas deberán contener: el nombre de la solución o preparación, la concentración, el número de equipo y la fecha.
6. Durante la práctica, se deberá seguir el procedimiento establecido, sin alterar el orden en el que se realiza el procedimiento, por ejemplo, no se debe alterar el orden de adición de reactivos.
7. Para evitar la contaminación de los compuestos químicos al pesarlos, no usar la misma espátula o cucharilla para distintos compuestos. Esta medida también se aplica al usar puntas para diferentes sustancias líquidas.
8. Todos los contenedores de reactivos deben permanecer tapados y en un lugar fresco, oscuro y seco, antes y después de su uso, para evitar contaminación o vaporización.

9. Pesar por separado cada reactivo y emplear sólo la cantidad especificada en la práctica. No regresar reactivos no empleados al recipiente de donde se tomaron.

10. La calibración de las balanzas debe realizarse, si es posible, antes de cada práctica, de lo contrario, se deberá considerar un tiempo extra de 10 a 15 minutos para calibrarlas.

11. Si se tiene un aire acondicionado o algún ventilador dirigido hacia las balanzas, se debe apagar durante el proceso de pesado de las sustancias para evitar errores en los pesos registrados.

12. Si se trabaja en un laboratorio que cuente con bitácoras de uso de los equipos, debe anotarse en ella, la asignación del equipo antes de usarlo. Al finalizar, se debe anotar si observó alguna anomalía de funcionamiento durante el uso. De esta forma, el responsable del equipo podrá saber si el equipo está funcionando correctamente y si los usuarios están siguiendo los protocolos correctamente.

TODO EQUIPO QUE SE ROMPA, DAÑE O EXTRAVÍE, DEBERÁ SER REPUESTO A LA BREVEDAD POR EL O LOS ALUMNOS IMPLICADOS, DE NO SER ASÍ, EL PROFESOR RESPONSABLE TIENE LA FACULTAD DE ASENTAR CALIFICACIONES REPROBATORIAS POR ESTA FALTA, ADEMÁS REPORTARÁ EL CASO AL ÁREA ADMINISTRATIVA CORRESPONDIENTE.

Consideraciones generales

1. ESTE MANUAL CONTIENE TEXTO EN LETRAS MAYÚSCULAS, QUE INDICA INFORMACIÓN IMPORTANTE O DESCRIBE ACTIVIDADES QUE DEBEN REALIZARSE ANTES DE ENTRAR AL LABORATORIO.

2. ANTES DE ENTRAR AL LABORATORIO E INICIAR LA PRÁCTICA, EL ALUMNO DEBERÁ: LEER DOS O TRES VECES LA PRÁCTICA COMPLETA, CONOCER Y LEER ACERCA DE LOS INSTRUMENTOS DE LABORATORIO QUE SE UTILIZARÁN EN LA PRÁCTICA (CONSULTAR ANEXO II), COMPRENDER LAS CONSIDERACIONES PARTICULARES Y VER LOS VIDEOS TUTORIALES PROPUESTOS EN LA LITERATURA CONSULTADA DE CADA PRÁCTICA. En caso de no entender el procedimiento a seguir durante la práctica o de tener dudas, deberá anotarlas y discutir las con el profesor antes de comenzar la práctica.

3. Cada práctica contiene una serie de actividades descritas en el desarrollo o al final de la misma, por lo que se recomienda que dichas actividades sean resueltas en hojas o en la libreta correspondiente a la asignatura.

4. Cada práctica considera un tiempo estimado, por lo que, para ajustarse a éste, se debe evitar todo tipo de distracción y procurar que cada equipo sea organizado, para que todos los integrantes cooperen y tengan actividades asignadas, que permita la realización de la práctica en tiempo.

5. Se necesita que los equipos de trabajo estén previamente organizados para asegurarse que cuentan con los materiales y las sustancias necesarias para la realización de cada práctica. La organización se debe realizar de preferencia un día antes, para que puedan trabajar sin contratiempos el día que se realiza la práctica.

DE NO OBSERVARSE LAS CONSIDERACIONES Y EL REGLAMENTO DEL LABORATORIO DESCRITOS, QUEDARÁ SUSPENDIDA LA PRÁCTICA CON LAS SANCIONES QUE EL PROFESOR DETERMINE.

Parte I

Equipo y conceptos básicos

Práctica 1

Uso de las balanzas granataria y analítica

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora y 30 minutos.

1.1. Objetivo

Conocer las partes y el funcionamiento de las balanzas, adquirir destreza en el uso de balanzas para la medición de masas y verificar la calibración de las balanzas.

1.2. Fundamento

El término balanza deriva del latín *bis* que significa “dos” y *linx* que significa “plato”. Con él nos referimos a un instrumento que se usa para determinar la masa de un cuerpo o sustancia y que utiliza la fuerza de la gravedad que actúa sobre los objetos como medio de comparación.

La masa (m) de un cuerpo es la cantidad de materia que éste contiene, la masa se mide en kilogramos (kg). El peso (W) de un cuerpo es la fuerza con la que la tierra (u otro astro) atrae al cuerpo, el peso se mide en Newtons (N). En el lenguaje de la vida cotidiana, se emplean estos dos términos de manera indistinta, sin embargo, son diferentes y no se deben confundir, aunque al hecho de determinar la masa se le conozca comúnmente con el término pesar. El peso de un cuerpo es directamente proporcional a su

masa, $W = m \times g$, donde g es, la aceleración de la gravedad, igual a 9.8 m/s^2 a nivel del mar. La masa de un cuerpo es siempre la misma en cualquier lugar, pero el peso puede variar dependiendo de la fuerza de gravedad del lugar donde se localice el cuerpo. En este manual se emplean indistintamente los términos masa y peso, sin embargo, se debe tener presente la diferencia.

Entre la masa y el peso hay una relación bien definida y esto permite que por medio de la balanza podamos determinar la masa o “peso” de un cuerpo o de una sustancia. En el laboratorio, la balanza es uno de los instrumentos básicos y se utiliza para pesar proporciones definidas de un compuesto o sustancia que se usará para preparar disoluciones. También es útil para estimar la densidad o peso específico de alguna sustancia.

Las balanzas más utilizadas en los laboratorios son la balanza analítica y la balanza granataria. Con el fin de seleccionar la balanza adecuada, se debe conocer: el diseño, tamaño, capacidades de calibración, capacidad de pesaje, unidades de pesaje (g , kg o lbs) y el margen de error del equipo. Cuando se requiere pesar cantidades pequeñas, en el orden de unos pocos g a mg , o se requiere hacerlo con mucha precisión, se usa una balanza analítica con precisión de 0.1 a 1 mg . Cuando se requiere pesar cantidades mayores a los 20 g y no es necesario hacerlo en forma tan precisa, entonces, se utilizan balanzas granatarias que son más resistentes, tienen menor precisión, pero mayor capacidad de pesaje. Así, el parámetro para seleccionar la balanza adecuada será la cantidad a pesarse la capacidad de pesaje de la balanza.

Balanza granataria

La balanza granataria tiene una sensibilidad de $\pm 0.1 \text{ g}$, es decir, no tiene capacidad para medir miligramos; este tipo de balanzas están diseñadas para pesar de gramos a algunos kilogramos. La figura 1.1 muestra los componentes de una balanza granataria.

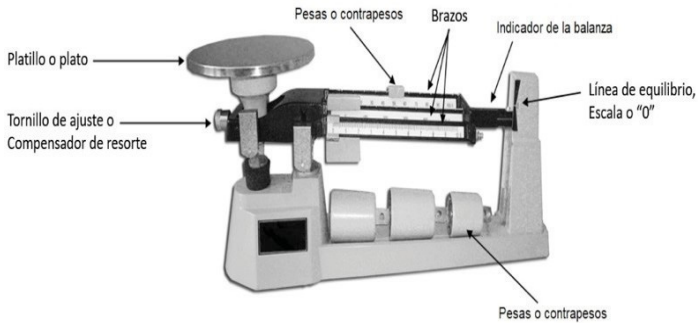


Figura 1.1. Componentes de una balanza granataria [1]

Se le debe mantener limpia, evitar derramar sólidos o líquidos sobre el área de pesado (plato) y regresar los contrapesos de las escalas a cero después de su uso.

El procedimiento general para pesar en una balanza granataria es el siguiente:

1. Se verifica que todas las pesas de la balanza estén en la marca de cero.
2. Se verifica que el indicador de la balanza marque cero cuando no tenga objetos encima.
3. Se coloca el recipiente, donde se realizará la pesada, encima del plato de la balanza.
4. Se determina la masa del recipiente, para lo cual, se recorren las pesas de las diferentes escalas hasta que el indicador de la balanza se equilibre y marque cero.
5. Se suman los valores de las pesas de cada escala para calcular la masa total.

6. Se suma la masa requerida de la sustancia a la masa obtenida del recipiente.
7. Se recorren las pesas hasta que la cantidad que registren sea igual al total de la suma de la masa del recipiente y la masa de la sustancia.
8. Se agrega la sustancia poco a poco, hasta que el indicador de la balanza se encuentre en equilibrio y coincida con la marca de cero.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

Balanza Analítica

Este tipo de balanza tiene una sensibilidad de ± 0.01 g hasta 0.00001 g dependiendo del modelo. Las características y operación de una balanza analítica están claramente definidas en el manual de operación que suministra el fabricante. La exactitud o la fiabilidad de los resultados de pesada están muy relacionados con el lugar donde está colocada la balanza. Para obtener una mejor precisión, se debe colocar en un lugar con muy pocas vibraciones, sin corrientes de aire y con una temperatura ambiente y humedad lo más constantes posible. La figura 1.2 muestra los componentes de una balanza analítica. Se pueden observar variaciones dependiendo del modelo.

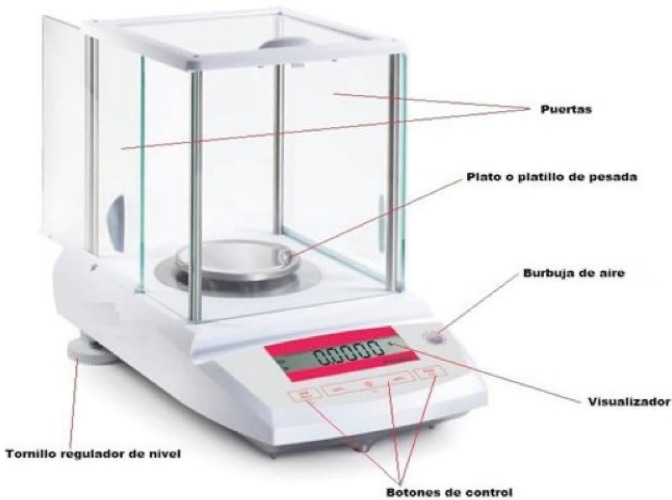


Figura 1.2. Componentes de una balanza analítica [7]

Para que el resultado del instrumento sea preciso se requiere que esté calibrado. Es decir, que el valor obtenido con el instrumento corresponda al valor de un patrón de referencia. Para el caso de las balanzas analíticas se utilizan como patrón de referencia masas de calibración de diferentes medidas, sin embargo, también disponen de una calibración interna, es decir, información almacenada en la memoria del instrumento que puede utilizarse cuando no se cuenta con las masas de calibración requeridas para la calibración manual bajo el procedimiento indicado por el fabricante. Es responsabilidad de los técnicos de laboratorio verificar que los instrumentos de medición se mantengan calibrados y de los usuarios preguntar si han sido verificados con regularidad antes de su uso.

La mayoría de las balanzas tienen una burbuja de aire que permite comprobar que la balanza está colocada sobre una superficie plana y se encuentra adecuadamente nivelada, en caso contrario, se debe nivelar haciendo girar, lentamente y con cuidado, los tornillos de las patas de soporte.

El procedimiento general de uso de la balanza analítica, se describe a continuación:

1. Se verifica que la burbuja de aire se encuentre en el interior del círculo. De no ser así, se ajusta haciendo girar los tornillos ubicados en la base de la balanza.
2. Se verifica que el equipo esté conectado a la toma de corriente.
3. Se enciende el equipo.
4. Se coloca el recipiente debidamente identificado que ha de contener la muestra, sobre el plato de la balanza.
5. Se presiona el botón que permite visualizar cero en la pantalla de la balanza (*Zero*, *Tare*, *O/T*, según el modelo), este paso se conoce como tarar la balanza.
6. Se retira el recipiente del plato de la balanza, y una vez fuera, si lo que se va a pesar es un sólido se añade con una espátula o una cucharilla; y si es un líquido, se adiciona con una pipeta o probeta de acuerdo al volumen que se desea pesar. Siempre que sea posible, debemos retirar el recipiente de pesada del plato de la balanza para adicionar la sustancia. Esto con el fin de evitar que caiga sobre el plato y deteriore la balanza.

7. Se vuelve a colocar el recipiente con la muestra, en el centro del plato de la balanza.
8. Se efectúa la lectura de pesada manteniendo las puertas de la balanza cerradas y se espera a que el indicador de estabilidad de la pesada deje de parpadear.
9. Se completa la cantidad requerida, agregando las sustancias sólidas con la espátula que será introducida por alguna de las puertas laterales de la balanza (si está provista de ellas) y si se trata de un líquido, prefiere utilizar la puerta superior de la balanza para introducir la pipeta.
10. EVITE DERRAMAR LIQUIDOS O SÓLIDOS SOBRE LA BALANZA
11. Se verifica la lectura de pesada con las puertas de la balanza cerradas y esperando a que el indicador de estabilidad deje de parpadear.
12. Se retira el recipiente de la balanza.
13. Se presiona el botón que permite visualizar cero en la pantalla (Tarar).
14. Se apaga la balanza si ya no se va a utilizar.
15. Se verifica que la balanza y el perímetro donde se encuentra ubicada queden limpios. De no ser así, se limpia cualquier derrame de líquidos o sólidos. Para ello, es necesario retirar el plato de la balanza apagada y limpiarlo con una servilleta impregnada del disolvente adecuado o con una brocha en caso de ser sólido.

16. Se cierran las puertas de la balanza.
17. Se desconecta el equipo para evitar daños por descargas eléctricas.

Recomendaciones para el empleo de la balanza

- NUNCA pesar las sustancias directamente sobre el plato de la balanza.
- Utilizar un recipiente limpio y seco: un vaso de precipitado o un recipiente lo más pequeño posible para evitar el sobrepeso en la balanza.
- Tanto la sustancia que se va a pesar como el recipiente donde se va a contener deben estar a la misma temperatura que el entorno.
- El recipiente donde se realizará la pesada debe colocarse al centro del plato de la balanza.
- Si se emplea una balanza analítica, mantener las puertas de la balanza cerradas para verificar la pesada, debido a la sensibilidad a corrientes de aire.
- El plato de la balanza, la cámara de pesada y los alrededores de la balanza deben dejarse perfectamente limpios al terminar de usar la balanza.
- Si se requiere pesar más de una sustancia, debe limpiarse la espátula con el disolvente adecuado, en general, agua desionizada, y secarse antes de continuar pesando las siguientes sustancias. De lo contrario, se debe utilizar una espátula diferente para cada sustancia.

- NO PESAR RECIPIENTES O SUSTANCIAS MAYORES AL LÍMITE MÁXIMO DE LA BALANZA, POR EJEMPLO, PARA LA BALANZA ANALÍTICA DEL LABORATORIO, NO EXCEDER DE 210g. EN ESTE SENTIDO, POR NINGÚN MOTIVO SE DEBE PESAR EL BOTE Y CONTENIDO DE LA BEBIDA CARBONATADA EN LA BALANZA ANALÍTICA, SI DESEA CONOCER EL PESO DE ÉSTA, SE DEBE EMPLEAR LA BALANZA GRANATARIA.
- NO MOVER LA BALANZA DEL LUGAR ESTABLECIDO.
- REvisa los tutoriales descritos en la literatura consultada.

1.3. Material

- Balanza granataria
- Balanza analítica
- 4 vasos de precipitado de 25 o 50 *mL*
- 4 espátulas o cucharillas pequeñas
- 4 monedas de diferentes tamaños
- 20 *g* de cloruro de sodio
- 20 *g* de cloruro de calcio
- 50 *mL* de agua de la llave
- Bebida carbonatada pequeña
- 2 probetas de 50 o 100 *mL*
- Servitoallas o papel absorbente

1.4. Desarrollo de la práctica

1. Etiquetar los vasos de precipitado (u otros recipientes) que serán utilizados para pesar cada sustancia.
2. Pesar 5 g de $NaCl$ de la siguiente manera:
 - a. Verificar que la balanza analítica marque 0.
 - b. Colocar el vaso de precipitado en la balanza y anotar su peso en la tabla 1.1.
 - c. Tarar (llevar a 0) la balanza analítica.
 - d. Agregar con una cucharilla o espátula el $NaCl$ al vaso de precipitado hasta que la balanza marque 5 g.
 - e. Anotar el peso exacto en la tabla 1.1.
 - f. Dejar el vaso de precipitado con el $NaCl$ a la intemperie (incubación) durante 45 min.
 - g. Tarar la balanza y pesar el vaso de precipitado después de la incubación y anotar el resultado en la tabla 1.1.
3. Pesar 5 g de $CaCl_2$; Realizar el procedimiento del paso(2), empleando esta vez $CaCl_2$ en lugar de $NaCl$.
4. Pesar 20 mL de agua de la llave de la siguiente manera:
 - a. Realizar el procedimiento del paso (2), únicamente los incisos a) al e), agregando agua de la llave en lugar de $NaCl$.

- b. Retirar el vaso de precipitado de la balanza y agitar el contenido del vaso con una cucharilla o espátula durante 2 minutos, la agitación a una velocidad e intensidad constantes. Alternativamente, se puede utilizar un agitador magnético (“mosca”) y una placa de agitación para realizar una agitación homogénea.
 - c. Tarar la balanza, pesar nuevamente el vaso de precipitado y anotar el resultado en la tabla 1.1.
5. Pesar 20 mL de la bebida carbonatada: realizar el procedimiento del paso (4), empleando la bebida carbonatada en lugar del agua de la llave.
6. Pesar directamente sobre el plato, 4 monedas de diferentes denominaciones en ambos tipos de balanza (analítica y granataria) y anotar los resultados en la tabla 1.2. Para pesar en la balanza granataria, siga el procedimiento general para pesar en una balanza granataria descrito en la página 7.
7. Retirar las etiquetas, lavar y entregar el material.

1.5. Consideraciones particulares

- Es importante que el estudiante conozca los materiales antes de iniciar la práctica, así como las partes y componentes de cada balanza.
- El tiempo para realizar la práctica es mayor cuando no se tiene listo todo el material, no está limpia el área de trabajo o no se tienen calibradas las balanzas.

- Los recipientes que se utilicen para realizar las pesadas de los diferentes materiales, deben tener un peso inferior a 30 g. Estos deben ser pesados siempre antes de colocar la sustancia, tarar la balanza con el recipiente y añadir la sustancia en la cantidad que indique el procedimiento de la práctica.
- En el caso de la balanza granataria, se necesita que ésta sea calibrada antes de cada pesada.
- En esta práctica, se utiliza una bebida carbonatada, por lo que es necesario que evite su agitación antes de ser abierta o que sea abierta en un área donde puedan vaciar sustancias líquidas y pueda lavarse posteriormente. También puede ser abierta con mucho cuidado, dejando que el gas salga y abrirla completamente cuando la presión haya disminuido.
- Asegúrese que la cantidad de material es suficiente para realizar las pesadas marcadas en este manual, por ejemplo, la cantidad de $NaCl$ que debe conseguir debe ser un poco mayor a la que se solicita para que en las balanzas se pueda pesar la cantidad de 5 g.
- No olvidar que es muy importante el etiquetado de los recipientes donde estarán las sustancias a pesar para evitar confusiones y tener orden.
- Se deben mantener en buen estado físico (limpieza, calibración, reglas de las escalas y etiquetas) cada balanza.

1.6. Literatura consultada

- Guerrero, B. I. (2016). *Balanza granataria y técnica de pesado. Secuencias* [Página web]. Recuperado de: https://cienciasecu.blogspot.com/2016/09/balanza-granataria-y-tecnica-de-pesado_17.html
- Sánchez Enríquez, S., Flores Alvarado, L. J., Gurrola Díaz, C. M., Heredia Chávez, P. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. 3ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Segal Kischinevsky, C. A., Ortega Lule, G. J. (2010). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula I*. 3ª Edición. México: Las prensas de Ciencias.
- Villa Gerley, M. R. (2007). *Manual de prácticas Química General*. 2ª edición. Medellín, Colombia: Sello Editorial.
- Organización Panamericana de Salud (2005). *Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio* [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.cnts.salud.gob.mx/descargas/LAB_manual-mantenimiento.pdf
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarés, I., Llor, N., Muñoz-Torero, D., Nicolás, E., Pérez-García, M. L., Pujol, M. D., Rosell, G., Seco, M., Velasco, D. *Operaciones básicas en el laboratorio de química. Universitat de Barcelona* [Página web]. Recuperado de: <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index1.html>
- Balanzas digitales (2019). Balanza Ohaus Pioneer de Precisión. Bdc.com [Página web]. Recuperado de: <https://www.balanzas-digitales.com/laboratorio/207-balanza-ohaus-pioneer-de-precision.html>
- Balanza Ohaus Pioneer de Precisión. Bdc.com [Página web]. Recuperado de: <https://www.balanzasdigitales.com/laboratorio/207-balanza-ohaus-pioneer-de-precision.html>

1.6.1. Videos tutoriales

- Sistema Tecnológico de Monterrey, Campus Estado de México. ITESM-CEM. (2013, noviembre, 4). Video tutorial. Operación de la balanza analítica [Archivo de Video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=oiK-6gbPSouM>
- Davis, J. (2015, enero, 18). Balanza Granataria [Archivo de video]. Recuperado de: https://www.youtube.com/watch?v=an-YV_U20W-7w&t=141s

1.7. Guía de reporte de resultados

1.7.1. Individual

1. Antes de realizar la práctica, elabora un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica para cada muestra. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.
2. Después de leer el fundamento y realizar la práctica:
 - a. Localiza 5 palabras que consideres las más importantes para comprender esta práctica. Enuméralas en orden de importancia y justifica tu elección.
 - b. En una oración describe el conocimiento que adquiriste al realizar la práctica.
 - c. Identifica y menciona cuántas palabras de las 5 localizadas incluiste en la oración.
 - d. Reformula la oración empleando las 5 palabras localizadas.

1.7.2. Por equipo

1. Completen la tabla 1.1 y tabla 1.2.
2. Investiguen la fórmula que se debe emplear para calcular el valor que deben colocar en la columna *Diferencia* de la tabla 1.1 y tabla 1.2.

Tabla 1.1.*Pesos de sustancias sometidas a diferentes condiciones*

Muestra	Peso del vaso [masa (g)]	Peso de la sustancia [masa (g)]	Peso del vaso + la sustancia [masa (g)]	Peso con incubación [masa (g)]	Diferencia (%)
Sal común ($NaCl$)					
Cloruro de calcio ($CaCl_2$)					
	Peso del vaso [masa (g)]	Peso de la sustancia [masa (g)]	Peso del vaso + la sustancia [masa (g)]	Peso con agitación [masa (g)]	Diferencia (%)
Agua de la llave					
Agua carbonatada					

Tabla 1.2.*Pesos obtenidos en dos tipos de balanza*

	Denominación	Balanza granataria [masa (g)]	Balanza analítica [masa (g)]	Diferencia (%)
Moneda 1				
Moneda 2				
Moneda 3				
Moneda 4				

3. Respondan a las siguientes preguntas:

- ¿En cuál de los casos ($NaCl$ o $CaCl_2$) se observa una mayor diferencia de peso y por qué? ¿Qué otras diferencias observaste al comparar el $NaCl$ y $CaCl_2$?
- ¿En cuál de los casos (agua de la llave o agua carbonatada) se observa una mayor diferencia de peso y por qué? ¿Qué otras diferencias observaste al comparar el $NaCl$ y $CaCl_2$?
- ¿En cuál de las denominaciones de las monedas observas una mayor diferencia de peso y por qué?

1.7.3. Por grupo

1. Seleccionen las 4 denominaciones que más se hayan repetido entre los equipos. Registren el peso de las monedas de todos los equipos y comparen los resultados. Utilicen el formato de la tabla 1.3 y tabla 1.4.

Tabla 1.3.

Pesos de monedas obtenidos por los equipos con la balanza granataria [masa (g)]

	Denominación	Equipo 1	Equipo 2	Equipo 3	Equipo 4
Moneda 1					
Moneda 2					
Moneda 3					
Moneda 4					
	Equipo 5	Equipo 6	Equipo 7	Equipo 8	Equipo 9
Moneda 1					
Moneda 2					
Moneda 3					
Moneda 4					
	Equipo 10	Equipo 11	Equipo 12	Equipo 13	Promedio
Moneda 1					
Moneda 2					
Moneda 3					
Moneda 4					

Tabla 1.4.

	Denominación	Equipo 1	Equipo 2	Equipo 3	Equipo 4
Moneda 1					
Moneda 2					
Moneda 3					
Moneda 4					
	Equipo 5	Equipo 6	Equipo 7	Equipo 8	Equipo 9
Moneda 1					
Moneda 2					
Moneda 3					
Moneda 4					
	Equipo 10	Equipo 11	Equipo 12	Equipo 13	Promedio
Moneda 1					
Moneda 2					
Moneda 3					
Moneda 4					

Pesos de monedas obtenidos por los equipos con la balanza analítica [masa (g)]

2. Respondan a las siguientes preguntas:
 - a. ¿En cuál de las denominaciones de las monedas observas una mayor diferencia de peso para cada balanza utilizada?
 - b. ¿Cuál es el rango de pesos obtenidos para cada denominación en cada balanza?
 - c. ¿En cuál de las balanzas se obtiene una mayor variación en los pesos?

3. Comparen el peso de las muestras de cloruros, para ello, utilicen la tabla 1.5

Tabla 1.5.

Diferencias de porcentaje de peso obtenidas para NaCl y CaCl₂

Sustancia	Equipo 1	Equipo 2	Equipo 3	Equipo 4	Equipo 5	Equipo 6
NaCl						
CaCl ₂						
	Equipo 7	Equipo 8	Equipo 9	Equipo 10	Equipo 11	Promedio
NaCl						
CaCl ₂						

4. Respondan a las siguientes preguntas:
 - a. ¿Cuál es el rango de pesos obtenidos para cada sustancia?
 - b. ¿Cuántas veces es mayor o menor el promedio de las diferencias de una sustancia con respecto a la otra?

Práctica 2

Uso y verificación de micropipetas

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora y media.

2.1. Objetivo

Conocer las partes que componen una micropipeta, su funcionamiento y cómo se verifica su calibración y adquirir destreza en su uso para medir volúmenes pequeños (entre 1 y 1000 μL).

2.2. Fundamento

En los laboratorios donde se realizan pruebas bioquímicas es indispensable obtener resultados confiables, para ello es importante desarrollar la habilidad para medir de manera exacta volúmenes pequeños de líquidos.

Las micropipetas son instrumentos diseñados para medir y transferir volúmenes de líquidos menores de 1 mL . Pueden clasificarse de acuerdo al volumen que miden y también de acuerdo a particularidades en su funcionamiento. En general, la micropipeta mecánica o de pistón requiere que el operadorejerja una fuerza sobre un émbolo para que ésta sea transferida a un pistón que se desplaza a lo largo de un cilindro promoviendo el desplazamiento de un volumen de líquido predefinido. Dicho volumen se puede ajustar en el rango de operación de la micropipeta y dicho ajuste se refleja hacia el interior del instrumento como un ajuste en la longitud que recorrerá el pistón en el interior del cilindro. Para su operación las micropipetas necesitan que se coloque en el ex-

tremo una punta desechable del volumen adecuado que evita la contaminación entre muestras y del instrumento. La figura 2.1 muestra las partes componentes de una micropipeta.

Para obtener resultados exactos y confiables es necesario que los operadores de micropipetas conozcan en detalle los procedimientos de uso. Se presentan a continuación los lineamientos generales de uso:

1. Colocar una nueva punta de micropipeta en el portapuntas. Verificar que la punta de la micropipeta esté correctamente colocada y ajustada. Evitar contaminar la punta con otras sustancias. Se debe verificar que las puntas se ajustan correctamente a las micropipetas antes de comenzar a utilizarlas. Usualmente los colores de las puntas facilitan la identificación del volumen que pueden dispensar. La tabla 2.1 muestra la convención de colores para las puntas de las micropipetas.

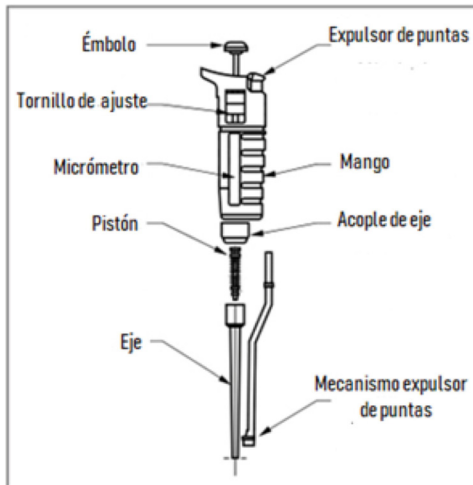


Figura 2.1. Componentes de una micropipeta [1]

2. Precisar el volumen de dosificación en caso de emplear micropipetas de volumen variable. Para seleccionar el volumen a dispensar con precisión, la micropipeta dispone de un tornillo de ajuste, generalmente ubicado en la parte superior de la micropipeta, y de un indicador (micrómetro), ubicado lateralmente donde se puede leer el valor ajustado. No intente seleccionar volúmenes mayores al máximo valor admitido por la micropipeta, ni volúmenes menores a cero, si lo intenta, descalibrará y dañará la micropipeta.
3. Presionar el émbolo suavemente hasta el primer “tope” (ver figura 2.2, posición 1B). Hasta este momento, la punta de la micropipeta no debe estar sumergida en el líquido.

Tabla 2.1.

Convención de color para puntas de micropipetas [1]

Rango de volumen dispensado por la micropipeta (μL)	Color de punta característico
0.1-2.5	Negro
0.5-10	Gris
2.0-20	Gris/Amarillo
10-100	Amarillo
50-200	Amarillo
100-1000	Azul
500-2500	Rojo

4. Sumergir en el líquido solo la punta de la micropipeta y verificar que se encuentre en posición vertical antes de comenzar a aspirar el líquido. Esta posición garantiza que la aspiración del líquido sea homogénea. Existen recomendaciones acerca de la profundidad a la que se debe sumergir la micropipeta en un líquido antes de comenzar a aspirarlo. Dicha profundidad varía de acuerdo a la capacidad de la micropipeta. Una recomendación general se muestra en la tabla 2.2. En forma general, se recomienda evitar sumergir la punta más de un centímetro en la solución.

Tabla 2.2.*Profundidad dependiendo del volumen [1]*

Rango de volumen de la micropipeta (μL)	Profundidad de inmersión (mm)
1-100	2-3
100-1000	2-4
1000-5000	2-5

5. Liberar el émbolo de forma suave para que la micropipeta absorba el líquido (ver figura 2.2, posición 2A). Verificar que el émbolo se desplace hasta la posición del límite superior y esperar unos segundos antes de retirar la punta del líquido para garantizar que la aspiración se llevó a cabo completa. Asegurarse que no haya gotas del líquido adheridas por fuera a la punta de la micropipeta y si las hay es necesario removerlas de la siguiente manera: deslice suavemente la punta de la micropipeta por la pared del recipiente que contiene el líquido. Si esto no es suficiente para removerlas, utilice algún material absorbente y póngalo en contacto con la gota adherida a la punta. Tenga cuidado de no tocar el orificio de la punta con el material absorbente ya que absorberá el contenido de la punta y esto causará inexactitud en el líquido que se dispense. Tome precauciones al trabajar con soluciones tóxicas.
6. Colocar la punta de la micropipeta contra la pared del recipiente receptor (ver figura 2.2, posición 3A) en un ángulo de 30 a 45° y si el recipiente ya contiene algún líquido evitar que la punta haga contacto con ese líquido.

7. Mantener el contacto entre la punta de la micropipeta y el recipiente y presionar suavemente el émbolo hasta el primer “tope” para dispensar el contenido de la punta de la micropipeta (ver figura 2.2, posición 4B). Deslizar hacia arriba la punta de la micropipeta en contacto con el recipiente, de 8 a 10 mm, para que no queden gotas pegadas a la punta de la micropipeta.
8. Presionar nuevamente el émbolo hasta el segundo “tope”(ver figura 2.2, posición 5C). Esto asegura que se expulsa cualquier fracción de líquido que se haya quedado en la punta de la micropipeta. Retira la punta de micropipeta manteniendo el émbolo presionado hasta el segundo tope deslizándola por la pared del recipiente. Liberar poco a poco el émbolo hasta la posición inicial (ver figura 2.2, posición 6A).
9. Desechar la punta accionando el botón expulsor de puntas.

Es importante notar que el émbolo puede estar en 3 posiciones: (A) cuando el émbolo no está siendo presionado. (B) cuando el émbolo se presiona y se siente un punto de resistencia, éste es el primer “alto” o “tope”. Finalmente, (C) cuando se continúa presionando se encuentra un punto donde el émbolo ya no se mueve hacia abajo, éste corresponde al segundo “alto” o “tope”. La figura 2.2 esquematiza el proceso de uso del émbolo en sus tres posiciones.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

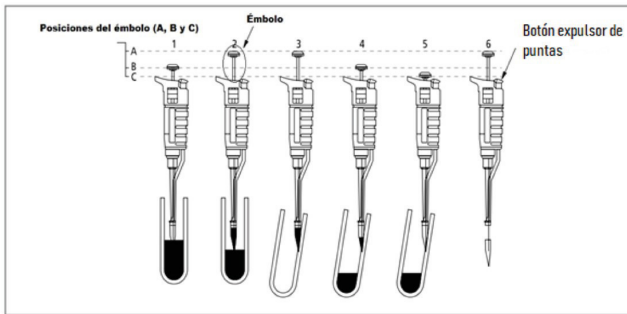


Figura 2.2. Pasos para el empleo de las micropipetas [1]

Verificación de calibración de micropipetas

Para realizar mediciones exactas, se deben emplear micropipetas calibradas, además de seguir los lineamientos de uso. La calibración de las micropipetas se realiza utilizando procedimientos estandarizados y cuya elección depende principalmente del volumen de las muestras obtenidas. Mientras más pequeño sea el volumen, más exigente y costoso es el proceso de calibración. Verificar la calibración de la micropipeta es un procedimiento simple que ahorra tiempo, energía, y reactivos. Medir la exactitud o precisión y calibración de una micropipeta implica calcular la exactitud ($E\%$) y un coeficiente de variación ($CV\%$) en al menos 2 volúmenes diferentes admitidos por las micropipetas; por ejemplo, para la micropipeta P1000 se deben revisar los volúmenes de $300\ \mu\text{L}$ y $1000\ \mu\text{L}$, y para la micropipeta P200 se deben revisar los volúmenes de $60\ \mu\text{L}$ y $200\ \mu\text{L}$.

La Norma ISO 8655 incluye la comprobación de micropipetas, mediante el método gravimétrico, para determinar la incertidumbre de las mediciones. El agua de prueba de la micropipeta se dosifica directamente en un receptáculo colocado en la balanza y se pesa. El volumen de líquido se calcula aplicando un factor de corrección al peso que está directamente relacionado con la densidad del agua de

prueba y compensa la temperatura ambiente y la presión atmosférica. La densidad y temperatura de algunos líquidos se pueden observar en la tabla 2.3.

Tabla 2.3.

Densidad y temperatura de algunos líquidos [2, 3, 4, 5]

Líquidos	Densidades (g/cm ³)	Temperatura (°C)
Alcohol etílico (C ₂ H ₆ O)	0.787	20-25
Acetona (C ₃ H ₆ O)	0.790	25
Petróleo	0.800	-
Aceite	0.890	25
Agua destilada (H ₂ O)	1.0032	21.5
Agua de mar	1.131	15-25
Agua pura	0.984	4,30,100
Glicerina o Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	1.260	0
Triclorometano (Cloroformo) (CHCl ₃)	1.480	20
Sangre	1.295	normal 37
Gasolina	0.705	25
Leche	1.031	25
Sacarosa al 20%	1.74	25
Sacarosa al 60%	1.84	25
Ácido Acético o Ácido etanoico (CH ₃ COOH)	1.05	-

Normalmente, se realiza una serie de diez mediciones para obtener un promedio. La desviación estándar, o dispersión de los resultados, es una medición de la repetitividad o incertidumbre de la micropipeta. Una vez registradas las 10 pesadas, el cálculo de exactitud ($E\%$) se realiza de la siguiente manera:

1. Calcular el valor promedio de las 10 pesadas. La fórmula general para calcular el promedio de n pesadas es:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Pesada}_i}{n} = \frac{\text{Pesada}_1 + \dots + \text{Pesada}_n}{n}$$

Donde

\bar{X} : Valor promedio de las pesadas

i : Número de pesada

$Pesada_i$: Valor de cada pesada (en la literatura usualmente se emplea x_i)

$\sum_{i=1}^n$: Operador que indica sumar n valores

n : Cantidad de pesadas

Es decir, sumar el valor de las 10 pesadas y dividir el resultado entre el número de pesadas, en este caso $n=10$.

$$\bar{X} = \frac{Pesada_1 + \dots + Pesada_{10}}{10}$$

2. Calcular el volumen promedio, considerando el factor Z , con la siguiente fórmula:

$$\bar{V} = \bar{X} \times Z$$

Donde

\bar{V} : Volumen promedio

\bar{X} : Valor promedio de pesadas

Z : Factor $Z = 1/\text{densidad del líquido}$ (ver tabla 2.3)

3. Calcular el porcentaje de exactitud con la siguiente fórmula:

$$E\% = \frac{|\bar{V} - V_{nominal}|}{V_{nominal}} \times 100$$

Donde

$E\%$: Porcentaje de exactitud

\bar{V} : Volumen promedio

$V_{nominal}$: Valor del volumen que se está midiendo

El coeficiente de variación ($CV\%$) es una medida de variabilidad relativa tal que expresa la magnitud de la desviación estándar como un porcentaje de la media. Se expresa como porcentaje, en vez de las mismas unidades que los datos. El coeficiente de variación se utiliza para comparar variabilidad entre dos o más variables que se miden en diferentes unidades o cuya media es muy diferente.

Para calcular el coeficiente de variación ($CV\%$), se realizan los siguientes dos pasos:

1. Calcular la desviación estándar:

Donde

S : Desviación estándar

Z : Factor Z

$\sum_{i=1}^n$: Operador que indica sumar n valores

i : Número de pesada

$Pesada_i$: Valor de cada pesada

\bar{X} : Valor promedio de las pesadas

n : Cantidad de pesadas

Nota: en este caso, a diferencia del promedio, cada sumando es el resultado de una operación: el cuadrado de la diferencia entre la $Pesada_i$ y el valor promedio.

2. Calcular el coeficiente con la siguiente fórmula:

$$CV\% = \frac{S \times 100}{\bar{V}}$$

Donde

CV%: Coeficiente de variación

S: Desviación estándar

\bar{V} : Volumen promedio

Para realizar estos cálculos, se puede utilizar la calculadora o alguna hoja de cálculo, como Excel.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

Una vez calculados los valores de exactitud ($E\%$) y coeficiente de variación ($CV\%$), se comparan con los valores de los límites de tolerancia para verificar la calibración de la micropipeta. La tabla 2.4 muestra los límites admisibles. Si los valores calculados son menores o iguales a éstos, entonces la micropipeta está calibrada.

Tabla 2.4.

Límites de tolerancia

Volumen de la micropipeta (μL)	E% nominal	CV% nominal
5 – 10	1.0	0.8
20 – 50	0.7	0.4
100 – 1000	0.5	0.2

2.3. Material

- Micropipeta de 1000 μL
- Micropipeta de 200 μL
- Balanza analítica
- Vaso de precipitado de 25 mL
- 2 puntas para la micropipeta de 1000 μL (azules)
- 2 puntas para la micropipeta de 200 μL (amarillas)
- 50 mL de agua de garrafón o destilada
- 10 mL de sacarosa al 60 %

2.4. Desarrollo de la práctica

1. Seleccionar la micropipeta de 1000 μL (o en su caso 200 μL).
2. Colocar el vaso de precipitado en la balanza.
3. Tarar la balanza analítica.
4. Ajustar al volumen deseado la micropipeta utilizando el tornillo de ajuste.
5. Aspirar 300 μL (o en su caso 60 μL) de agua destilada con la micropipeta y vaciarla en el vaso de precipitado utilizando el acceso superior de la balanza (asegúrese de seguir el lineamiento descrito en el fundamento).
6. Registrar el peso del agua añadida al vaso (*Pesada 1*) en la tabla 2.5.
7. Repetir 9 veces los pasos (3) al (5) (*Pesada 2, ..., Pesada 10*).

8. Repetir los pasos (1) al (7) pero ahora tomando el volumen máximo de la micropipeta de 1000 μL (o en su caso 200 μL).
9. Repetir el experimento, del paso (1) al (8), tomando ahora sacarosa al 60 % y registrar en la tabla 2.6.
10. Lavar y entregar el material utilizado.

2.5. Consideraciones particulares

1. Se recomienda que la disolución de sacarosa al 60 % (ver concepto de concentración en la página 28) esté preparada antes de iniciar la práctica, de lo contrario, se deben considerar 20 minutos extra para la preparación de la disolución.
2. Antes de realizar la práctica, los alumnos deben documentarse respecto al procedimiento de empleo de las micropipetas: lo que no se debe hacer y cómo se deben emplear, para evitar retrasos en el desarrollo de la práctica. Por ejemplo, es importante saber que no se deben tocar las puntas con las manos o utilizar la misma punta para pipetear más de una solución, también se debe evitar invertir la micropipeta después de haber pipeteado una solución, para no dañarla.

2.6. Literatura consultada

- Organización Panamericana de Salud (2005). *Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio* [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.cnts.salud.gob.mx/descargas/LAB_manual-mantenimiento.pdf
- Aplicaciones Técnicas y Procesos Productivos, ATTP LLeal (2008). *Tablas de Densidad y peso específico* [Archivo PDF]. Recuperado de: <http://www.atpplleal.com/userfiles/files/densidad-y-peso-especifico.pdf>
- Gobierno de Aragón, Departamento de Educación, Cultura y Deporte. *Tabla de densidades* [Archivo PDF]. Recuperado de: <http://aula.educa.aragon.es/datos/AGM/CT/Unidad01/imagenes/25.pdf>

- Avibert (2013). Brix: *Determinación de azúcar por densidad y re-frac-tometría* [Página web]. Recuperado de: <http://avibert.blogspot.com/2013/12/brix-determinacion-de-azu-car-por.html>
- Oxidial (2008). *Hoja de seguridad Oxidial: Soluciones químicas* [Ar-chivo PDF]. Recuperado de: <http://www.oxidial.com.ar/assets/files/es/acido-acetico.pdf>
- Sánchez Enríquez, S., Flores Alvarado, L. J., Gurrola Díaz, C. M., Here-dia Chávez, P. (2014). *Manual de prácticas de labo-ratorio de Bioquímica*. 3ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Segal Kischinevzky, C. A., Ortega Lule, G. J. (2005). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula I*. 3ª Edición. México: Las prensas de Ciencias.
- Harris, D. C. (2003). *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª Edición. Barcelona: Editorial Reverté.
- Araya Alpízar, C. (2004). *Estadística para laboratorista químico*. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- International Standard ISO (2002). *International Standard ISO 8655-6* [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.sartorius.co.rs/contentFiles/files/ISO_8655-6_2002%20EN%20%E7%AC%AC%E4%B8%80%E7%89%88.pdf

2.6.1. Videos tutoriales

- Castillo, C. A. (2016, noviembre, 4). Manejo Básico de Micro-pipetas [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=K9AUuH29NLs>
- Brea, G. (2016, noviembre, 10). Manejo de las micropipetas [Archi-vo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=3leT7THt3Ac>
- Tutoriales de informática. (2013, agosto, 11). Cómo calcular pro-medio en Excel - Capítulo 110 [Archivo de Video]. Recu-perado de: <https://www.youtube.com/watch?v=3NW8t-N2QTRc>
- WissenSync. (2017, enero, 23). Varianza, desviación estándar y coefi-ciente de variación en Excel [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=Q-bwr3-GkTng>

Arcos, A. (2012, abril, 7). Media, Varianza y Desviación Estándar usando la calculadora Casio fx-82MS para datos simples [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=qguh-qg0xvM0>

2.7. Guía de reporte de resultados

2.7.1. Individual

1. Realiza un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.
2. Después de leer el fundamento y realizar la práctica, en una oración, describe el conocimiento que adquiriste al realizar la práctica.
3. Resuelve el crucigrama de la figura 2.3, para ello, utiliza las claves para identificar las respuestas.
4. Identifica y menciona cuántas palabras de las utilizadas en el crucigrama incluiste en la oración.
5. Reformula la oración empleando 5 de las palabras utilizadas en el crucigrama.

2.7.2. Por equipo

1. Completen las tablas 2.5 y 2.6 con los resultados de las pesadas, calculen y anoten la exactitud ($E\%$) y el coeficiente de variación ($CV\%$) para cada volumen y sustancia.

2.7.3. Por grupo

1. Analicen los resultados obtenidos para cada disolución.

2. Respondan a las siguientes preguntas:
 - a. De acuerdo a los cálculos realizados, ¿Las micropipetas están calibradas?
 - b. De las soluciones utilizadas, ¿Qué solución utilizarían para verificar la calibración de la micropipeta? Justifiquen su elección.

3. Considerando las diferentes áreas de formación de un nutriólogo:
 - a. ¿En qué áreas consideran que necesitarían medir o pesar sustancias?
 - b. ¿Qué sustancias consideran que sería necesario medir o pesar?
 - c. ¿Cuáles consideran que serían las dificultades para medir o pesar dichas sustancias?

Para contestar estas preguntas pueden entrevistar nutriólogos, profesores, estudiantes de nivel avanzado, entre otros.

Tabla 2.5.

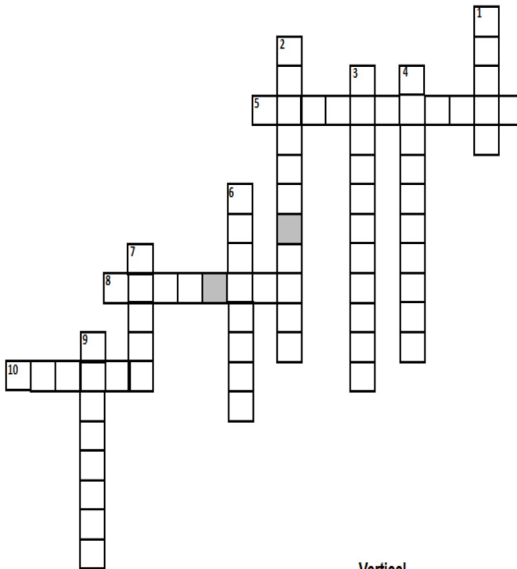
Masa estimada para agua destilada (g)

Vol. máximo de la micropipeta (µL)	Vol. nominal (µL)	Pesada 1	Pesada 2	Pesada 3	Pesada 4	Pesada 5	Pesada 6	Pesada 7	Pesada 8	Pesada 9	Pesada 10	Promedio de pesadas	E%	CV %
P1000	300													
	1000													
P200	60													
	200													

Tabla 2.6.

Masa estimada para sacarosa al 60% (g)

Vol. máximo de la micropipeta (µL)	Vol. nominal (µL)										Promedio de pesadas	E%	CV %	
	Pesada 1	Pesada 2	Pesada 3	Pesada 4	Pesada 5	Pesada 6	Pesada 7	Pesada 8	Pesada 9	Pesada 10				
P1000	300													
	1000													
P200	60													
	200													



Horizontal

- 5. Para medir de manera exacta y transferir volúmenes pequeños de líquido, se necesita de una ...
- 8. Paso del lineamiento de uso que indica la colocación de una punta en el portapuntas.
- 10. Tiene varias funciones, entre ellas, permite dispensar el contenido de una punta.

Vertical

- 1. Contiene el líquido que será dispensado.
- 2. Alto o tope indicado para absorber el líquido del tubo o vaso.
- 3. Parte de la micropipeta donde se coloca la punta.
- 4. Permite visualizar el volumen a dispensar.
- 6. Permite retirar la punta sin utilizar directamente la mano.
- 7. Permite sostener adecuadamente la micropipeta.
- 9. Permite seleccionar con precisión el volumen a dispensar.

Figura 2.3. Crucigrama para uso de micropipetas

Práctica 3

Preparación de disoluciones

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora y media.

3.1. Objetivo

Realizar los cálculos pertinentes y emplear el material adecuado, para preparar disoluciones y diluciones.

3.2. Fundamento

Una disolución o solución es una mezcla homogénea de sustancias comúnmente denominadas solutos, en un medio dispersante llamado disolvente. En una disolución, el disolvente, también conocido como solvente, es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad y una de sus características es que su estado físico no cambia una vez formada la disolución. Los solutos son todos los demás componentes que se disuelven o dispersan en el disolvente, y se encuentran en forma minoritaria. Durante el proceso de disolución, se requiere suministrar energía que facilite la ruptura de las fuerzas que mantienen unidas entre sí a las partículas de soluto. De esta forma es posible separarlas en iones o moléculas individuales y esto facilita su dispersión. Esta energía se obtiene de la interacción entre las moléculas de soluto y disolvente. En una disolución, las partículas que componen el soluto quedan homogéneamente dispersas en todo el disolvente por lo que son invisibles a simple vista. Esto se debe a que son partículas de dimensiones atómicas con diámetro menor de 1 nm , es decir, son tan pequeñas que no pueden detectarse por métodos ópticos y tampoco pueden separarse por métodos físicos como la filtración y la centrifugación.

Además, son tan pequeñas que pueden atravesar las membranas permeables. Aunque las disoluciones no dispersan la luz, debido a las características que presentan las partículas disueltas, sí pueden absorber la luz y tener color. En el cuerpo humano, el fenómeno de disolución es de suma importancia, por ejemplo, los nutrientes (glucosa, aminoácidos, etc.) están disueltos en la sangre, así como son transportados hacia todas las células y una vez que se incorporan a ellas, toman parte de un sinnúmero de reacciones bioquímicas que en conjunto conocemos como metabolismo. Otros ejemplos son: la solución fisiológica (coloquialmente conocida como suero) y la disolución de urea en la sangre, así como las disoluciones utilizadas en nutrición parenteral.

Para el estudio de las disoluciones se deben comprender algunos conceptos clave, tales como: solubilidad, concentración, molaridad y soluciones porcentuales.

Solubilidad

La cantidad de una sustancia que puede disolverse en un líquido es limitada. Puedes hacer la prueba. Si comienzas a añadir azúcar a un vaso con agua y lo agitas constantemente hasta que se disuelva, te darás cuenta que si sigues agregando azúcar llegará un momento en el que ésta deje de disolverse, no importando el tiempo y la fuerza con que la agites. La solubilidad es la capacidad que tienen los solutos para disolverse en otra sustancia que actúa como disolvente. Es considerada una medida que indica la máxima cantidad de una sustancia que puede ser disuelta en un volumen específico de disolvente determinado, a condiciones de temperatura y presión controladas. La solubilidad es un parámetro que puede medirse en los líquidos y los sólidos y se expresa como coeficiente de solubilidad o simplemente solubilidad. Se reporta en gramos de soluto por 100 g de disolvente. Existen sustancias que son poco solubles o insolubles en un disolvente determinado y esta solubilidad varía si utiliza-

mos otro disolvente. La sal de cocina (cloruro de sodio), el azúcar (sacarosa), y el vinagre (ácido acético) son muy solubles en agua, mientras que el bicarbonato se disuelve con mayor dificultad. En la Tabla 3.1 puedes observar la cantidad máxima de estos compuestos que pueden ser disueltos en 100 g de H_2O .

Tabla 3.1.

Solubilidad de compuestos en agua [3]

Sustancia	Solubilidad (g / 100 g de H_2O)
Bicarbonato de sodio	9.6
Cloruro de sodio	36.0
Sulfato de calcio	0.2
Sacarosa (azúcar de mesa)	204.0

Derivado del concepto de solubilidad, se considera que una disolución está saturada cuando ya no es posible disolver más soluto. Al llegar a este punto, observaremos que el soluto que ya no puede disolverse se deposita en el fondo del recipiente. Dado que la solubilidad está determinada por las condiciones de temperatura y presión a las que se somete una disolución, cuando se calienta una disolución saturada es posible disolver más soluto. De esta forma, es posible obtener lo que conocemos como una disolución sobresaturada. Algunos ejemplos muy conocidos de disoluciones sobresaturadas son la miel de abeja y los almíbares. Si bien, el incremento de temperatura aumenta la solubilidad de un sólido en un líquido, el incremento de presión no modifica la solubilidad: si un sólido es insoluble en agua, no se disolverá, aunque se aumente bruscamente la presión ejercida sobre él. Por otro lado, el cambio de pH también puede tener un efecto en la solubilidad de ciertos solutos, es por ello que, en algunos casos, se observa la solubilidad total de los componentes de una disolución, sólo hasta que se ajusta el pH.

Concentración

Ya que es posible disolver una cantidad variable de una sustancia en un disolvente, se requiere un parámetro que nos indique cuánto soluto ha sido disuelto en un volumen determinado de disolvente. La concentración es el parámetro que nos indica la cantidad relativa de soluto y de disolvente que existen en una disolución. La concentración puede representarse en 2 formas distintas: a) la que indica la cantidad de soluto presente en relación con el volumen total de la disolución y b) la que indica la cantidad de soluto presente con respecto a la cantidad de disolvente. Existen varias maneras de expresar las concentraciones de cada tipo. En el primer caso se pueden expresar como molaridad, normalidad, soluciones porcentuales, osmolaridad y fracción molar. En el segundo caso se expresan como molalidad y osmolalidad.

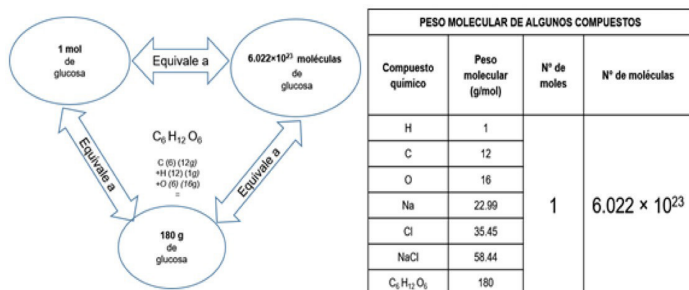
Las expresiones de concentración utilizadas en este manual son molaridad y soluciones porcentuales, por lo que revisaremos estos conceptos con detenimiento.

Molaridad

Un *mol* es una unidad de cantidad de materia; es una unidad especial de masa, porque no pesa lo mismo un *mol* de diferentes sustancias. Un *mol* representa la cantidad de sustancia contenida en $6.023 \times 10_{23}$ partículas elementales, tales como átomos, iones o moléculas, donde $6.023 \times 10_{23}$ es conocido como el número de Avogadro (*NA*). Al estar basada en un conteo de átomos, iones o moléculas, la cantidad de masa total dependerá de cuánta masa tenga la unidad de cada sustancia. Por ejemplo, un mol de hidrógeno molecular (H_2) tiene 2 g de masa, mientras que un mol de agua (H_2O) contiene 18 g de masa, es decir 18 g de agua contienen $6.023 \times 10_{23}$ moléculas de agua y de igual forma 2 g de (H_2) contienen $6.023 \times 10_{23}$ moléculas de hidrógeno molecular. Un mol

de cualquier sustancia es la cantidad en gramos igual al peso o masa molecular (PM) que contienen 6.023×10^{23} moléculas de la sustancia. La Figura 3.1 muestra la relación entre gramos y moles de glucosa.

Figura 3.1. Relación gramos-mol-moléculas



Cada elemento de la tabla periódica tiene un peso molecular diferente. De acuerdo a la tabla presentada en la Figura 3.1 un mol de hidrógeno corresponde a 1 g de hidrógeno; un mol de sodio son 22.99 g de sodio y un mol de cloro son 35.45 g de cloro. Ahora bien, cuando los átomos de diferentes elementos como son el carbono (C), el hidrógeno (H) y el oxígeno (O) se unen para formar moléculas, como es el caso de la glucosa, cuya fórmula condensada es $C_6H_{12}O_6$, la masa o peso molecular de la molécula se calcula sumando las masas de los átomos constituyentes tomando en cuenta cuantas veces está presente cada elemento en la molécula. Para obtener el peso molecular de la glucosa se suman: la masa del carbono que es 12 g y está presente 6 veces ($12 \times 6 = 72 \text{ g}$), más la masa del hidrógeno (1 g) que está presente 12 veces ($1 \times 12 = 12 \text{ g}$), más la masa del oxígeno 16 g que está presente 6 veces ($16 \times 6 = 96 \text{ g}$)

lo que resulta en una masa molecular total de 180 g o g/mol de glucosa. Cuando el peso molecular se refiere a átomos, algunas veces se refiere como átomo-gramo y cuando el peso molecular se refiere a moléculas, se refiere como moléculagramo o simplemente *mol*.

Derivado del concepto de mol surge una medida de concentración a la cual denominamos molaridad y se define como el número de moles de soluto presentes en un litro de disolución. Esta unidad de concentración se abrevia con la letra *M* y su unidad de medida es mol/L que también puede representarse como *mol L-1*. De esta forma, si se disuelve en agua 1 mol de glucosa, es decir, 180 g de glucosa y se añade agua suficiente (se afora) hasta completar un litro, obtendremos una disolución de glucosa 1 *molar* (glucosa 1 *M*). Como podemos observar, en esta forma de expresar la concentración se representa la cantidad de soluto referida a la cantidad de la disolución total y no de disolvente.

Para calcular la molaridad de una disolución podemos utilizar la siguiente ecuación:

$$M = \frac{n}{V} = \frac{m}{PM \times V}$$

Donde:

M: Molaridad, moles en cada litro de disolución (mol/L o *M*)

n: Cantidad de soluto en moles (*mol*) *m*: Masa del soluto en gramos (*g*) *PM*: Peso molecular del soluto (g/mol)

V: Volumen de la disolución en litros (*L*)

Ejemplo 1.

¿Cuántos gramos de cloruro de níquel ($NiCl_2$) se necesitan para preparar 250 mL de una disolución a 0.50 *M* (0.50 moles de soluto por litro de disolución)?

Despejando *m* en la fórmula, se tiene que $m = M \times PM \times V$, por lo que:

$$m = 0.50 \text{ M} \times 129.6 \text{ g/mol} \times 250 \text{ mL}$$

Donde el peso molecular (masa molar) es igual a 129.6 g/mol . Para realizar la operación, se requiere uniformizar las unidades. Por ejemplo, el volumen es proporcionado en mililitros, sin embargo, la molaridad es proporcionada en moles sobre litro, por lo que, al uniformizar las unidades a litros, el volumen es de 0.250 L .

$$m = 0.50 \text{ mol/L} \times 129.6 \text{ g/mol} \times 0.250 \text{ L} = 16.20 \text{ g}$$

Así, para obtener la solución, se pesan 16.20 g de NiCl_2 y se afora con agua hasta obtener 250 mL de disolución 0.5 M .

Soluciones porcentuales

Las soluciones porcentuales expresan la concentración como partes de soluto por cada cien partes de disolución, es decir, la concentración se expresa en porcentaje. Según las unidades en que se expresen las partes de soluto y del disolvente, la concentración porcentual puede tener varias formas, las más comunes son: (% p/p), (% v/v) y (% p/v).

Porcentaje peso en peso (% p/p). Es el número de gramos de soluto presentes en 100 g de disolución. Esta forma de expresar la concentración representa la cantidad de soluto referida a la cantidad de disolución total y no de disolvente y es muy utilizada para expresar la pureza de los reactivos químicos. La forma de calcular el porcentaje peso en peso de una disolución es:

$$\% \frac{p}{p} = \frac{m_{\text{soluto}}}{m_{\text{soluto}} + m_{\text{disolvente}}} \times 100 = \frac{m_{\text{soluto}}}{m_{\text{disolución}}} \times 100$$

Donde:

m_{soluto} : Masa del soluto expresada en gramos (g)

$m_{\text{disolvente}}$: Masa del disolvente expresada en gramos (g)

$m_{\text{disolución}}$: Masa de la disolución expresada en gramos (g)

Ejemplo 2.

Una disolución de cloruro de sodio al 5.0 %, tiene 5.0 g de NaCl disueltos en 95.0 g de agua. Los ácidos clorhídrico, sulfúrico, entre otros, son envasados de esta manera. Así, para el ácido clorhídrico (HCl) al 37 % (% p/p) en cada 100 g de disolución, 37 g son de HCl puro.

Porcentaje volumen en volumen (% v/v).

Es la cantidad de soluto expresada en mililitros (mL) presente en 100 mL de disolución.

Porcentaje peso en volumen (% p/v).

Es la cantidad de soluto expresada en gramos (g) presente en 100 mL de disolución; Esta es una forma muy común de describir la concentración de una disolución utilizada en el laboratorio.

Dilución

Una dilución se obtiene cuando se prepara una disolución de menor concentración a partir de una disolución de mayor concentración, comúnmente conocida como disolución madre o stock, ver figura 3.

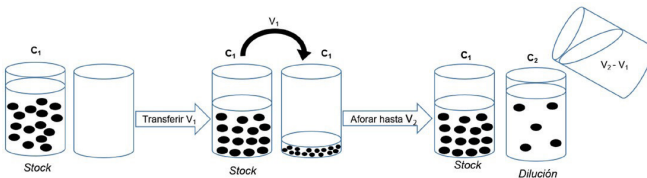


Figura 3.2. Proceso de dilución

En el laboratorio, con frecuencia se preparan disoluciones concentradas que son menos susceptibles de contaminación microbiana y que además ocupan menos espacio, por tal motivo, son muy útiles para ser almacenadas. A partir de ellas, se preparan diluciones, donde la concentración de los solutos es la adecuada para realizar el trabajo para el que fueron diseñadas.

Para determinar el volumen de disolución concentrada que se requiere para preparar un volumen determinado de la disolución diluida, se emplea la siguiente ecuación:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

V_1 : es el volumen de la disolución madre, empleada para obtener la disolución diluida

C_1 : es la concentración de la disolución madre

V_2 : es el volumen de la disolución diluida

C_2 : es la concentración de la disolución diluida

Las concentraciones pueden estar expresadas en términos de molaridad, normalidad, por ciento, molalidad u otra.

Ejemplo 3.

Se requiere, para un procedimiento analítico, una disolución de cromato de potasio (K_2CrO_4) 0.01 M. ¿Qué volumen de una disolución 0.25 M de K_2CrO_4 , se debe utilizar para preparar 500 mL de K_2CrO_4 0.01 M?

Analizando la petición, se observa que se conoce el volumen de la disolución requerida ($V_2 = 500 \text{ mL}$), además, se tienen los valores correspondientes a las dos concentraciones, tanto la madre

($C_1 = 0.25 \text{ M}$) como la requerida ($C_2 = 0.01 \text{ M}$). Así que es suficiente despejar V_1 de la fórmula y sustituirlos valores conocidos para obtener el volumen requerido.

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} = \frac{0.01 \text{ M} \times 500 \text{ mL}}{0.25 \text{ M}} = 20 \text{ mL}$$

Así, se colocan 20 mL de la disolución madre y se afora a 500 mL para obtener la disolución requerida.

3.3. Material

- Balanza analítica
- 4 cucharillas o espátulas
- 4 vasos de precipitados de 25 mL
- 4 matraces volumétricos de 25 mL
- 4 Recipientes de almacenamiento de 25 o 50 mL
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- Pizeta
- Probeta de 100 mL
- Pipeta Pasteur con bulbo
- 10 g de Cloruro de sodio (NaCl)
- Sacarosa (azúcar de mesa)
- Ácido acético
- 10 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Agua destilada (disolvente)
- 1 Probeta de 50 o 100 mL

3.4. Desarrollo de la práctica

1. PREVIO AL TRABAJO DE LABORATORIO, DEBERÁN SER REALIZADOS LOS CALCULOS PARA OBTENER LA CANTIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUE PESARÁN PARA PREPARAR LAS DISOLUCIONES.
2. Etiquetar los recipientes que contendrán las disoluciones.
3. Preparar 25 mL de disolución 0.10 M de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$):
 - a. Colocar el vaso de precipitado etiquetado en la balanza analítica.
 - b. Tarar la balanza.
 - c. Agregar al vaso de precipitado, con ayuda de una espátula, la cantidad calculada en gramos de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) y registrar el peso mostrado en la balanza.
 - d. Añadir 10 mL de agua destilada para disolver completamente el $NaHCO_3$, con una cucharilla o espátula.
 - e. Transferir la disolución a un matraz volumétrico de 25 mL. Pueden auxiliarse con una varilla de vidrio para no derramar la solución ni gotear.
 - f. Lavar el vaso, dos veces, con porciones de 5 mL de agua, transferir dichas porciones al matraz volumétrico.
 - g. Continuar la adición de agua, al matraz, lentamente hasta llegar al aforo.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

- h. Tapar el matraz y homogeneizar la disolución, mezclando por inversión varias veces.
 - i. Transferir la disolución a un recipiente de almacenamiento etiquetado y guardarla para la siguiente práctica.
4. Preparar 25 mL de una disolución de cloruro de sodio:
- a. Realizar el procedimiento del paso (3), pesando 0.73 g de cloruro de sodio ($NaCl$).
 - b. Calcule la molaridad de esta disolución: _____ M.
5. Preparar 25 mL de ácido acético al _____ % (p/v):
- a. Con una pipeta graduada, agregar 1 mL de ácido acético (CH_3-COOH) a un matraz volumétrico de 25 mL.
 - b. Adicionar agua destilada hasta llegar al aforo.
 - c. Tapar el matraz y homogeneizar la disolución, mezclando por inversión varias veces.
 - d. Transferir la disolución a un recipiente de almacenamiento etiquetado y guardarla para la siguiente práctica.
 - e. Consultar la densidad del ácido acético en la tabla 2.3 PARA CALCULAR LA CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN EN % (p/v).

6. Preparar 25 mL de sacarosa al 5% (p/v):
 - a. Realizar el procedimiento del paso (3), pesandola cantidad adecuada de la sustancia.
7. Retirar las etiquetas a los recipientes, lavar y entregar el material.

3.5. Consideraciones particulares

1. Es importante que las dudas respecto a los cálculos, sean resueltas antes de realizar la práctica, ya que se necesita hacer diversos cálculos antes de realizar la práctica. En esta práctica suelen presentarse varias dudas respecto a las fórmulas y cómo calcular la cantidad de las sustancias requeridas. Este proceso, debe hacerse fuera del laboratorio para un mejor aprovechamiento del conocimiento y del tiempo.
2. En la sección de desarrollo de la práctica se han colocado textos en mayúscula, indicando los cálculos mínimos requeridos antes de entrar al laboratorio.
3. El uso de la campana de extracción es indispensable en la manipulación del ácido acético, ya que nos permite capturar, contener y expulsar las emisiones generadas por sustancias químicas peligrosas, además protege al operador contra proyecciones y salpicaduras, permite trabajar en un área del laboratorio en la que se puede asegurar la ausencia de puntos de iniciación de fuegos, etc. De no contar con una campana de extracción, se debe manipular el ácido acético en un lugar ventilado y evitar inhalarlo directamente.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

4. Para disolver los solutos se puede utilizar una barra magnética y una placa de agitación. Cuando la agitación sea manual coloque el vaso de precipitado sobre la mesa, y arrástrelo en círculos, de manera lenta y precisa el tiempo necesario para disolver el soluto.

Para comprender como realizar el aforo:

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

5. Es necesario que los materiales sean usados de la forma correcta para evitar accidentes y concluir en un tiempo menor o igual al estimado.
6. En esta práctica es necesario y muy importante el uso de guantes y cubrebocas. Es necesario que el alumno consulte una tabla periódica de los elementos para poder realizar los cálculos.

3.6. Literatura consultada

- Ibargüengoitia Cervantes, M. E., Ibáñez Cornejo, J. G., García Pintor, E. (2004) *Química en microescala: Manual de experimentos de química*. 1ª Edición. México: Provitec.
- Verde Calvo J. R., Vega Ávila, E., López Cruz, J. I., Estrada Zuñiga, M. A., Malpica Sánchez, F. P., Martínez Orta, F., Pelayo Zaldivar, C., Pérez César, M. C., Ruiz Sánchez, P., Trejo Aguilar, G. M., Tovar Castro, L. M. Z. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio: Química Analítica*. 1ª Edición. México: Universidad Autónoma Metropolitana: Unidad Iztapalapa.
- Consejo nacional de educación para la vida y el trabajo. *Solubilidad y concentración* [Página Web]. Recuperado de: http://www.cursosinea.conevyt.org.mx/cursos/cnaturales_v2/interface/main/recursos/antologia/cnant_3_06.htm
- González de Buitrago, J. M. (2005). *Técnicas y Métodos de laboratorio Clínico*. 2ª Edición. España: Elsevier Masson.

Guzmán Porras, J. (2012). *Manual de preparación: Ciencias. Módulo común obligatorio 1° y 2° Medio Química* Psu. 8ª Edición. Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile.

Universidad de la Rioja. *Sistemas de extracción en el laboratorio: servicio de prevención de riesgos laborales* [Archivo PDF]. Recuperado de <https://www.unirioja.es/servicios/spnl/pdf/vitrinas.pdf>

3.6.1. Videos tutoriales

Universitat Politècnica de Catalunya. (2012, mayo, 9). Técnicas básicas de laboratorio: preparación de disoluciones [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=CE2te7LVC-QE>

ZelianSA. (2014, enero, 10). Campanas de Extracción de Gases marca Biobase [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=IdHiWr6Fb2g>

Breaking Vlad. (2018, febrero, 22). Matrices aforados |4| Material de laboratorio [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=BxK4vLDO2RU>

3.7. Guía de reporte de resultados

3.7.1. Individual

1. Investiga el significado de μm y describe la fuente de información. La descripción de la fuente de información es conocida como referencia bibliográfica.
 2. Investiga si la descripción realizada corresponde a algún formato establecido por la comunidad científica y aceptado internacionalmente.
 3. Supón que la siguiente línea representa 1 *mm*, colorea una porción de 300 μm .
-

4. Calcula la concentración molar (M) de $NaCl$ de la disolución preparada en el paso (4) del desarrollo de la práctica.
5. Expresa en porcentaje (% p/v) la concentración de $NaCl$, de la disolución preparada en el paso (4) del desarrollo de la práctica.
6. Realiza los cálculos para obtener 100 mL de una dilución 0.3 M a partir de la disolución obtenidas en el paso (4) y construye un diagrama de flujo del proceso para su preparación.
7. Realiza un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.

3.7.2. Por equipo

1. Calculen la concentración de ácido acético, en molaridad (M), de la disolución preparada en el paso (5) del desarrollo de la práctica.
2. ¿Cuántos gramos de sacarosa se necesitan para preparar 25 mL de la disolución de sacarosa, empleada en la práctica 2?

3.7.3. Por grupo

1. Comparen los resultados de los cálculos realizados por equipo antes del desarrollo de la práctica:

Tabla 3.2.

Valores predeterminados para las disoluciones

Disolución	Peso de la sustancia
$NaHCO_3$ 0.1 M	
$NaCl$ ___ M	
Ácido acético ___% (p/v)	
Sacarosa 5% (p/v)	

2. Si los datos son diferentes, identifiquen los errores cometidos al realizar los cálculos. Para ello, un integrante del equipo pasará a explicar el procedimiento con el cual obtuvieron el resultado, y los demás equipos identificarán qué fue lo que hicieron diferente y qué los llevó a obtener un resultado equivocado.

Práctica 4

Uso del potenciómetro

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora.

4.1. Objetivo

Identificar las partes y el funcionamiento de los potenciómetros; adquirir destreza en el uso de potenciómetros para la medición de ácidos y bases, y verificar la calibración de los potenciómetros.

4.2. Fundamento

Potenciómetro

El potenciómetro o analizador de pH, es un instrumento de uso común en los laboratorios donde se emplean disoluciones acuosas ya sea para la elaboración de productos o con fines de investigación. El potenciómetro se utiliza para determinar la concentración de iones de hidrógeno $[H^+]$ en una disolución, lo que comúnmente se conoce como la medición de la acidez de una solución acuosa. Dicha medición, debe realizarse en forma adecuada y mediante procedimientos confiables. El potenciómetro es un instrumento que utiliza un electrodo que es sensible a la presencia de iones para medir la concentración de iones $[H^+]$. Sería ideal que el electrodo respondiera a un solo tipo de iones, el que deseamos medir, sin embargo, en la realidad no es así y por eso se pueden presentar algunas interferencias en la medición debidas a iones de otras clases que también están presentes en la disolución. Sin embargo, como estos otros iones están presentes en muy baja cantidad, en general, no se considera que sea un problema en la medición. La figura 4.1

muestra los componentes de un potenciómetro. Se pueden observar variaciones dependiendo del modelo.

El potenciómetro se emplea en diversas áreas, por ejemplo, en microbiología, este instrumento se utiliza para ajustar la alcalinidad o acidez de caldos o medios de cultivo, lo que resulta indispensable para el crecimiento de algunos microorganismos. En el área de alimentos, se utiliza para determinar la acidez o alcalinidad de los alimentos y para preparar soluciones amortiguadoras o reguladoras (*buffer* o tampón). En equipos especializados de diagnóstico de laboratorio, se usa el mismo principio de medición utilizando microelectrodos selectivos específicos para cuantificar iones que pertenecen a sales y sustancias orgánicas disueltas en la sangre. Los potenciómetros también son utilizados en plantas de tratamiento o purificación de agua, procesos industriales como petroquímicos y la fabricación de papel. Las áreas que lo emplean son muy variadas, tales como: agricultura, ciencias alimentarias, metalmecánica, farmacéutica, entre otras.

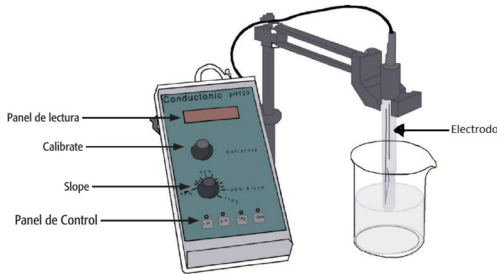


Figura 4.1. Componentes de un potenciómetro [1]

Calibración del potenciómetro

Antes de realizar cualquier medición, se debe verificar que el potenciómetro esté calibrado. Cuando el valor de pH obtenido para la solución de referencia de pH 7.0 esté fuera del rango de 6.8 a 7.2, será necesario realizar la calibración. El procedimiento general de calibración se describe en el desarrollo de la práctica, sin embargo, se recomienda revisar el manual del equipo para verificar que no especifique un proceso diferente.

Ajuste de pH

Durante la preparación de algunas disoluciones, se requiere ajustar su pH para lograr el objetivo de preparación. Tal es el caso de algunos medios de cultivo, amortiguadores utilizados para ensayos enzimáticos, amortiguadores para electroforesis, entre otros. Para ajustar el pH se utilizan disoluciones de ácidos fuertes (HCl , H_2PO_4 , H_2SO_4 , etc.) para disminuirlo o de bases fuertes ($NaOH$, KOH , etc.) para aumentarlo. Es importante seleccionar el ácido y la base apropiados para la disolución que se requiere ajustar.

Amortiguadores

Los amortiguadores (*buffers* o tampones) son sistemas acuosos que tienden a resistir los cambios en el pH cuando se les agregan pequeñas cantidades de ácido $[H^+]$ o base $[OH^-]$. Los amortiguadores biológicos son mezclas de ácidos débiles y sus bases conjugadas. Las células contienen dos sistemas amortiguadores importantes, además de las proteínas y los nucleótidos. Estos sistemas, a diferencia de las macromoléculas, están formados por metabolitos de bajo peso molecular y son los sistemas de fosfato y bicarbonato.

4.3. Material

- 12 vasos de precipitado de 50 mL
- Potenciómetro
- Pizeta
- 1 Recipiente de 1 L.
- Trozo de papel absorbente (servitoalla) o gasa
- 1 L de agua destilada.
- Soluciones de referencia o soluciones *Buffer*.
- 20 mL de cada muestra o solución problema (excepto de las soluciones preparadas en la práctica anterior de “Preparación de disoluciones”):
 - √ Leche de vaca
 - √ Yogurt bebible
 - √ Agua alcalina
 - √ Agua de la llave
 - √ Agua purificada
 - √ Jugo de naranja, limón y toronja
 - √ Bebida carbonatada (cualquier sabor, cualquier marca)
 - √ 3 Jugos industrializados (cualquier sabor, cualquier marca)

- Soluciones preparadas en la práctica “Preparación de disoluciones”:
 - √ Bicarbonato de sodio
 - √ Ácido acético
 - √ Cloruro de sodio
 - √ Sacarosa

4.4. Desarrollo de la práctica

1. Colocar las muestras en los vasos de precipitado debidamente etiquetados.
2. Verificar que el equipo se encuentra conectado y encendido.
3. Verificar que el electrodo esté completamente sumergido dentro de una solución sobresaturada de KCl o en una solución para electrodos. Debe permanecer siempre sumergido en ella cuando no esté siendo utilizado.
4. Verificar que el potenciómetro esté calibrado, utilizando una solución de referencia de pH 7.0 previamente atemperada, para ello, se debe:
 - a. Remover el electrodo de la solución.
 - b. Enjuagar el electrodo con agua destilada utilizando una Pizeta.
 - c. Eliminar el exceso de agua con un papel absorbente o trapo seco, sin tocar el bulbo del electrodo.
 - d. Sumergir el electrodo en la solución de referencia.
 - e. Esperar a que la lectura de pH se estabilice, ya sea que la lectura deje de parpadear o que aparezca al-

guna señal indicadora de estabilidad (consulte el manual del equipo).

- f. Verificar que la lectura esté en un rango de 6.8 a 7.2. Lo que indica que el equipo está calibrado.

De ser así, continúe con el paso (6) del desarrollo de la práctica.

5. Si el equipo no está calibrado, realizar el siguiente procedimiento:
 - a. Seleccionar dos soluciones de referencia para la calibración, utilice la de pH 7.0 y 4.0 si el pH de las muestras que se van a medir es ácido y la de pH 7.0 y 10.0 si es básico.
 - b. Atemperar las soluciones de referencia.
 - c. Enjuagar el electrodo con agua destilada y eliminar el exceso de agua, con papel absorbente, sin tocar el bulbo del electrodo.
 - d. Sumergir el electrodo en la solución de referencia, previamente atemperada.
 - e. Seleccionar el modo de calibración (*Calibrate*).
 - f. Esperar a que la lectura de pH se estabilice y marcar el pH de la primera solución de referencia.
 - g. Enjuagar el electrodo con agua destilada e introducirlo en la siguiente solución de referencia.
 - h. Esperar a que la lectura se estabilice y el equipo indique que ha terminado el proceso de calibración.

6. Continuar determinando el pH de las muestras o soluciones problema, realizando el siguiente procedimiento y registrar los valores de pH determinados en la tabla 4.1.
 - a. Enjuagar nuevamente el electrodo con agua y eliminar el exceso de agua del electrodo, también puede enjuagarse con un poco de la solución que desea medir.
 - b. Entre cada medición, se debe enjuagar y secar el electrodo sin agitarlo.
 - c. Sumergir el electrodo en la solución y esperar a que la lectura de pH se estabilice. Se debe mantener la solución que se está midiendo, en constante agitación, para ello, cuando se esté midiendo el pH de la solución problema, ésta se debe mover lentamente en el lugar donde se está midiendo, manualmente, evitando que el bulbo golpee las paredes o el fondo del vaso de precipitado.
7. Al finalizar, se debe guardar el electrodo, sumergiéndolo en un bulbo en una solución sobresaturada de KCl o en una solución de almacenamiento de electrodos.
8. Quitar las etiquetas y marcas al material utilizado, lavar y entregarlo.

4.5. Consideraciones particulares

1. Las soluciones amortiguadoras y soluciones de referencia deben estar a temperatura ambiente (atemperadas). Se requiere que, al entrar en el laboratorio, sean retiradas del refrigerador para que, durante la solicitud de materiales, las soluciones se nivelen a la temperatura del ambiente.
2. Antes de iniciar la práctica, los alumnos deben documentarse respecto al uso del potenciómetro o pH-metro, ya que se

debe emplear con cuidado y requiere del conocimiento de sus partes y de cómo utilizarlo: qué acciones no pueden hacer y cómo se emplea correctamente. Cualquiera que fuera su uso, debe siempre calibrarse. Cabe mencionar que el electrodo es frágil y costoso, por lo que su empleo requiere concentración para evitar dañarlo.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA.

3. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “Determinación de pH en Alimentos” NOM-F-317-S-1978, se deben seguir las especificaciones dentro del margen de la norma para la mezcla de los alimentos, y para la correcta utilización de los reactivos reguladores o soluciones buffer correspondientes a cada tipo de pH.

4.6. Literatura consultada

Verde Calvo J. R., Vega Ávila, E., López Cruz, J. I., Estrada Zuñiga, M. A., Malpica Sánchez, F. P., Martínez Orta, F., Pelayo Zaldívar, C., Pérez César, M. C., Ruiz Sánchez, P., Trejo Aguilar, G. M., Tovar Castro, L. M. Z. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio: Química Analítica*. 1ª Edición. México: Universidad Autónoma Metropolitana: Unidad Iztapalapa.

Alvarado-Ortiz Ureta, C., Blanco Blasco, T. (2011). *Alimentos: Bromatología*. 2ª Edición. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC).

Organización Panamericana de Salud (2005). *Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio* [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.cnts.salud.gob.mx/descargas/LAB_manual-mantenimiento.pdf

Instituto Tecnológico Superior de Xalapa (2011). *Manual de operación y mantenimiento de los equipos del laboratorio de química y usos múltiples* [Archivo PDF]. Recuperado de: <http://www.itsx.com.mx>

edu.mx/transparencia/I/reglamentos-alumnos/D-AA-12-Manual-operacion-mantenimiento-equipos-laboratorio-quimica.pdf

Vázquez Contreras E., Rojas Pérez, T.G. (2016). *La capacidad amortiguadora en los sistemas biológicos*. 1ª Edición. México: Universidad Autónoma Metropolitana: Unidad Cua-jimalpa.

Secretaría de Gobernación (1978). Norma Oficial Mexicana “Determinación de pH en Alimentos” NOM-F-317-S-1978. *Diario Oficial de la Federación* (DOF) [Página Web]. Recuperado de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978

4.6.1. Videos tutoriales

Ortiz Restrepo, J. E. (2014, abril, 3). Bio-Rad. Uso del pH-metro [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=2kGWX7IIrxU>

Mettler Toledo Laboratory. (2016, agosto, 30). Manejo de sensores de pH 1/6 – desembalaje y control de calidad, 2/6- preparación, 3/6 – toma de medidas correctas, 4/6 – limpieza, 5/6 – almacenamiento 6/6 – solución de problemas. [Archivo de video]. Recuperado de: https://youtu.be/Q9ykO2IaH_8, <https://youtu.be/OGmneYdJpCo>, <https://youtu.be/jWfG3XyELK4>, <https://youtu.be/0Gzr-QYOiNJl>, <https://youtu.be/hBWFxKts2Q4>, <https://youtu.be/INubmhTKIKM>

4.7. Guía de reporte de resultados

4.7.1. Individual

1. Realiza un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.
2. Selecciona la respuesta adecuada a la siguiente pregunta:

¿Qué se debe hacer eliminar el líquido que se queda adherido al electrodo?

 - a. Agitar fuertemente el electrodo
 - b. Emplear un papel o trapo limpio
 - c. Emplear un encendedor

3. Justifica las dos respuestas no elegidas. ¿Qué consecuencias tendría, el empleo de técnicas inapropiadas para limpiar el electrodo?

4.7.2. Por equipo

1. Registrar los valores de pH de las soluciones y anotar la temperatura a la que se realizaron los registros y la confiabilidad del equipo.

Tabla 4.1.

Valores de pH evaluados en diferentes soluciones

Nombre de la solución	pH	Temperatura (°C)	Confiabilidad (%)
Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)			
Cloruro de sodio ($NaCl$)			
Ácido acético (CH_3COOH)			
Sacarosa			
Leche de vaca			
Yogurt			
Agua alcalina			
Agua de la llave			
Agua natural para beber			
Jugo natural de naranja			
Jugo natural de toronja			
Jugo natural de limón			
Refresco embotellado (marca):			
Jugo industrializado 1 (marca y sabor):			
Jugo industrializado 2 (marca y sabor):			
Jugo industrializado 3 (marca y sabor):			

4.7.3. Por grupo

1. Con base en la tabla anterior, respondan las siguientes preguntas:
 - a. ¿Existe diferencia en el pH de los tres jugos naturales y los industrializados? Expliquen la causa de la respuesta.

- b. ¿A qué otras soluciones, que emplean en la vida cotidiana, podrían medirles el pH, y cuál sería la importancia de conocerlo? Expliquen.
 - c. ¿Sabían el nivel de acidez o de alcalinidad de la leche de vaca, el yogurt, la Coca-Cola y de los jugos? Ahora que lo saben, comenten lo que piensan al respecto.
2. Investiguen cuáles de las 4 primeras sustancias de la tabla 4.1 son amortiguadoras y mencionen cómo podrían comprobarlo experimentalmente en el laboratorio.

Parte II

Técnicas analíticas
de cuantificación

Alimento, bioquímicamente, es toda sustancia química que ingresa al organismo, con uno o más nutrientes para desempeñar funciones determinadas en las células. El alimento se puede consumir tal como se obtiene de la naturaleza o se puede someter a manipulaciones sencillas o a complejas transformaciones que van desde la cosecha del vegetal y el cuidado del animal hasta la obtención de productos derivados.

Los alimentos se clasifican por su origen, función, consistencia, sabor, grado de conservación, valor nutritivo, entre otros. Algunas clasificaciones son:

- Por su origen: vegetales, animales, minerales, procesados.
- Por su consistencia: líquidos, untuosos, sólidos.
- Por su sabor: ácido, amargo, dulce, salado, umami.
- Por su color: verde, rojo, morado, naranja, amarillo o variedades de ellos.
- Por su olor: a canela, a clavo de olor, a menta, a mar, a pescado.
- Por su función principal: energéticos, formadores o constructores y reguladores.

Los nutrientes son estructuras químicas que cumplen funciones vitales en las células vegetales y animales, y cubren necesidades fisiológicas de quienes los consumen. En general se dividen en dos categorías:

- **Macronutrientes:** En este grupo encontramos a los carbohidratos, las grasas o lípidos, las proteínas y los nucleótidos. Estos compuestos considerados complejos precisan degradarse hasta unidades simples para poste-

riormente convertirse en energía y en componentes de los diferentes tejidos y cumplir así diversas funciones.

- **Micronutrientes:** vitaminas y minerales. Los minerales se dividen en: macrominerales, los que se encuentran en 25 g o más en el cuerpo humano (calcio, magnesio, fósforo, sodio, potasio, cloro) y microminerales, los que se encuentran en cantidad menor a 25 g (yodo, hierro, manganeso, cromo, zinc, cobre), se cuantifican en mg o μg .

Para evaluar la calidad de los alimentos, se requiere de métodos cualitativos y cuantitativos que permitan conocer su contenido de macronutrientes y micronutrientes. El empleo de métodos analíticos de cuantificación, es esencial en el seguimiento y control del proceso de fabricación de alimentos. Por ejemplo, para poder evaluar el proceso de fermentación alcohólica y realizar el cálculo de rendimiento industrial, es importante cuantificar los azúcares reductores (glucosa, maltosa, maltotriosa, malto pentosa y dextrinas). A nivel nutricional, es importante el empleo de estos métodos para la determinación de: maduración de frutos, etiquetado nutricional y propiedades funcionales.

Para realizar cuantificaciones se emplean distintos instrumentos, uno ampliamente utilizado, en el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas biológicas, es el espectrofotómetro. Este instrumento ayuda a determinar la cantidad de las sustancias (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, entre otras) presentes en una disolución.

Los espectrofotómetros pueden emitir radiaciones de diferentes longitudes de onda, tanto en el rango ultravioleta como en el visible.

Para una correcta cuantificación, los instrumentos deben ser calibrados. Existen dos formas de calibración, una denominada calibración instrumental y la otra llamada calibración metodológica.

- La calibración instrumental se realiza para asegurar el buen funcionamiento del instrumento y se lleva a cabo con estándares que no contienen el analito que deseamos medir.
- La calibración metodológica implica establecer una correspondencia entre las características fisicoquímicas del analito que deseamos medir y la respuesta o señal emitida por el instrumento.

Durante un proceso analítico, se establece una relación entre las características del analito y la respuesta o señal del equipo a esas características. La señal de respuesta es proporcional a la concentración del analito, es por ello que se pueden representar los datos obtenidos en una gráfica que relacione la variable independiente (concentración del analito) con la variable dependiente (señal del instrumento) conocida como curva de calibración. Dicha gráfica tiende a ser una línea recta, donde al aumentar la concentración del analito se obtiene una señal de respuesta es mayor. De esta forma la línea representada en el plano cartesiano tendrá una pendiente positiva. La pendiente está definida por la ecuación matemática: $y = mx + b$, donde, m es la pendiente, x es la concentración del analito y y es la señal de respuesta. En una curva de calibración, mientras mayor es la pendiente mayor es la sensibilidad del instrumento para detectar el analito y la sensibilidad es siempre la misma para un mismo analito.

Al realizar una cuantificación debemos tener en cuenta que la medida debe ser exacta. La exactitud es la concordancia entre el resultado que obtenemos al realizar una determinación con el instrumento y el valor verdadero para un determinado analito. Cuando realizamos mediciones siempre existen imprecisiones debidas a la

incertidumbre propia de los instrumentos y a los errores cometidos por el operador, de tal forma que el valor verdadero en una medición no lo conocemos. Sin embargo, para aproximarnos lo mejor posible al valor real se utilizan algunos materiales de referencia.

- **Material de referencia:** Sustancia cuyas propiedades son lo suficientemente conocidas para ser utilizado en la calibración para evaluar un método de medición.
- **Material de referencia certificado (MRC):** Sustancia cuyas propiedades han sido determinadas mediante un procedimiento validado.

En los métodos descritos en las prácticas siguientes se preparan disoluciones con diferentes concentraciones de los analitos de interés, en este caso, carbohidratos y proteínas. Dichas disoluciones se hacen reaccionar con un reactivo que genera una reacción colorida que puede ser medida en un espectrofotómetro. Con los datos se realiza una curva de calibración que es utilizada posteriormente para determinar la concentración del analito en muestras de concentración desconocida mediante interpolación de los datos en la curva de calibración.

Es importante comprender los siguientes 3 conceptos que nos ayudan a utilizar el espectrofotómetro para realizar cuantificaciones:

Celda de referencia o blanco: Es la celda que contiene la mezcla de reacción sin el compuesto que se va a medir. Se emplea como referencia para determinar la absorbancia del compuesto de interés a diferentes concentraciones. La absorbancia de esta celda se resta al valor de la absorbancia del resto de los tubos que sí contienen el compuesto de interés.

Curva de calibración: Es la gráfica que establece la relación entre la concentración del compuesto de interés (eje x) y la respuesta del instrumento (eje y). Para realizarla se utilizan

disoluciones del compuesto de interés de concentración conocida.

Muestra incógnita o problema: Es una disolución que contiene el compuesto de interés pero se desconoce su concentración. Se procesa en forma simultánea y en las mismas condiciones que la curva de calibración y para conocer la concentración del compuesto de interés se determina su absorbancia y se interpola en la curva de calibración.

Práctica 5

Cuantificación de azúcares reductores

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora y 30 minutos.

5.1. Objetivo

Identificar y cuantificar azúcares reductores, mediante el método de DNS, desarrollando una curva de calibración de glucosa.

5.2. Fundamento

Los carbohidratos son moléculas que poseen en su estructura, *C*, *H* y *O* definidos químicamente como cetonas o aldehídos polihidroxilados. Son la fuente de energía preferida por las células animales y tienen múltiples funciones en el organismo. Estos compuestos conocidos también como hidratos de carbono los podemos encontrar abundantemente en las frutas donde contribuyen a su sabor dulce, a su valor nutritivo y a su apariencia. Los polisacáridos contribuyen a la firmeza de los frutos dándoles estructura y compuestos que involucran carbohidratos en su estructura como son las antocianinas que contribuyen a los atractivos colores de algunas de ellas.

Procesos como la maduración producen cambios en las concentraciones de los carbohidratos en las frutas. Esto como consecuencia de la actividad metabólica, ya que los carbohidratos son utilizados como precursores biosintéticos para la fabricación de otros carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos, glucósidos, etc.). Además, los polisacáridos experimentan hidrólisis y esto aumenta el contenido de monosacáridos que son utilizados

como sustratos para la actividad respiratoria.

Para la determinación de carbohidratos se han desarrollado diferentes métodos, entre ellos, el de Benedict, Fehling, Benedict, Somogy, Hagerdorn-Hensen, Lane-Enyon, Miller, etc. En todos ellos se aprovecha la misma propiedad para su cuantificación, la presencia de un grupo aldehído o cetónico libre. A los azúcares que lo contienen se las llama azúcares reductores y tienen la capacidad de transformarse en Enediones (reductonas) cuando se ponen en contacto con soluciones alcalinas y se someten a altas temperaturas. Estos compuestos son altamente reactivos y oxidables en presencia de oxígeno o agentes oxidantes como Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , y $Fe(CN)_6^{3-}$. Los productos formados en contacto con los diferentes reactivos son coloridos y esta característica es utilizada para llevar a cabo determinaciones cualitativas y cuantitativas.

El análisis de los carbohidratos se realiza con pruebas químicas, enzimáticas y colorimétricas, identificando azúcares reductores y no reductores, por cromatografía a papel, o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés: *High Performance Liquid Chromatography*). En el análisis proximal de alimentos, que cuantifica humedad, grasa, proteína y fibra, los carbohidratos se obtienen por diferencia de la suma de lo cuantificado. Se identifica almidón y dextrinas con Lugol, glucógeno con antrona, y celulosa con pruebas para fibras indigeribles.

Por medio de la espectrofotometría se puede determinar la cantidad de un compuesto disuelto en un líquido midiendo la cantidad de radiación que es capaz de absorber. Para ello se establece a qué longitud de onda el compuesto es capaz de absorber mayor radiación y se determina cuanta ha sido absorbida comparándola contra la sustancia de referencia, es decir, el líquido en el que fue disuelto el compuesto que se desea medir. Para las mediciones espectrofotométricas existe una regla, llamada Ley de Lambert-Beer que relaciona la concentración del compuesto que se desea medir con la cantidad de radiación absorbida.

Uno de los diversos métodos espectrofotométricos para la estimación de azúcares reductores, es el método de Miller conocido también como método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se basa en la capacidad de los azúcares reductores para reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. La cantidad de azúcares reductores se determina colorimétricamente cuantificando la reducción del DNS producida por la glucosa u otro azúcar reductor del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 540-570 nm. Así, el procedimiento se basa en la reacción que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra. Esta es una reacción de oxidación-reducción cuyo producto puede ser cuantificado por espectrofotometría a 540 nm. Los azúcares reductores que entran en contacto con el ácido 3,5-dinitrosalicílico y en presencia de calor este se reduce manifestando un cambio de coloración de una tonalidad amarilla característica del reactivo sin presencia de azúcares reductores hasta una tonalidad café rojiza que incrementa a medida que mayor cantidad de azúcares reductores están presentes en la muestra. La concentración de los azúcares reductores totales presentes en una muestra problema se determina haciendo una interpolación del resultado de la muestra en una curva de calibración obtenida con un azúcar reductor de concentración conocida, graficando la absorbancia de cada punto de la curva en función de la concentración.

Para la aplicación del método DNS o método de Miller, se prepara la disolución de DNS de la siguiente forma: a) Disolver 0.8 g de NaOH en agua destilada, b) Adicionar 15 g de tartrato de sodio y potasio hidratado y 0.5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), c) Aforar a 50 mL con agua destilada, y d) almacenar en un frasco ámbar a 4°C. Para preparar la curva de calibración se preparan diluciones de 200 a 1000 mg/L de glucosa o fructosa como estándar. Estas diluciones se mezclan y se hacen reaccionar con la disolución de DNS y se lee la absorbancia de cada una de

ellas en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 540 nm. Una vez construida la curva de calibración, se aplica el método de DNS a cada una de las muestras y su concentración se determina interpolando los resultados en la curva.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA antes de comenzar con el desarrollo de la práctica.

5.3. Material

- 40 tubos eppendorf de 1.5 o 2 mL
- Micropipeta de 200 μL
- Micropipeta de 1000 μL
- 10 puntas para micropipeta de 200 μL
- 10 puntas para micropipeta de 1000 μL
- Gradilla
- Gradilla flotadora
- Matraz volumétrico de 50 mL
- Espectrofotómetro
- Parrilla de calentamiento con agitación
- 20 Celdas o cubetas limpias
- Guantes de látex
- 5 g de glucosa o fructuosa
- REACTIVO DE DNS (éste será proporcionado por el profesor responsable del laboratorio)

- Agua destilada
- Hielo (alternativamente se puede emplear un congelador)
- 1 g de sacarosa
- 1 g de maltosa
- 1 g de lactosa
- 1 g de almidón
- 1 g de inulina
- 1 g de fructooligosacáridos

5.4. Desarrollo de la práctica

1. Preparar 50 mL de solución estándar de glucosa o fructosa al 0.2 % (p/v).
2. Etiquetar 7 tubos eppendorf de 1.5 o 2 mL con las concentraciones de glucosa o fructosa especificadas en la tabla 5.1.
3. Realizar las diluciones descritas en la tabla 5.1, a partir del estándar de glucosa o fructosa al 0.2 %. Para ello, agregar a cada tubo, el volumen del estándar y el volumen de agua destilada que se requirieren.
4. Realizar la curva estándar empleando el siguiente procedimiento:
 - a. Agregar 50 μ L de cada dilución a cada tubo de 1.5 o 2 mL.
 - b. Adicionar 50 μ L del reactivo de DNS a cada tubo.
 - c. Colocar los tubos en una gradilla flotadora e incubar las muestras en agua hirviendo (> 90 °C) durante 5 minutos.

- d. Retirar los tubos del agua hirviendo e incubarlos en agua con hielo durante 5 minutos.
 - e. Agregar 500 μL de agua destilada a cada tubo.
 - f. Mezclar cada tubo por agitación y trasvasar el contenido del tubo a celdas (cubetas) espectrofotométricas de metacrilato.
 - g. Determinar la absorbancia de cada celda a 540 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro utilizando como celda de referencia la que no contiene el azúcar reductor (etiquetada como 0 g/L). Registrar los valores de absorbancia en la Tabla 5.1.
5. Repetir el procedimiento del paso (2) al (4) para obtener los resultados por duplicado, este paso es considerado el 2do ensayo.
 6. Cuantificar los azúcares reductores de las disoluciones de sacarosa, maltosa, lactosa, almidón, inulina y fructooligosacáridos al 1% (Tabla 5.2). Para ello, realizar el procedimiento del paso (4) a) al (4) b).
 7. DESECHAR EL CONTENIDO DE LAS CELDAS EN UN RECIPIENTE PARA RESIDUOS QUÍMICOS.

5.5. Consideraciones particulares

1. Antes de comenzar la práctica, los alumnos deben leer, analizar e identificar los cálculos que deben realizar para completar las respectivas tablas.
2. IMPORTANTE: El DNS es fotosensible, por lo que debe guardarse en un frasco ámbar, envuelto en papel aluminio y no debe dejarse destapado en ningún momento.

3. Es muy importante el uso de GUANTES DE LÁTEX y cubrebocas, así como el uso de bata y zapatos con suela antiderrapante. El DNS causa irritación y es tóxico, por lo que debe evitarse el contacto con la piel y su ingestión.
4. El DNS es una mezcla corrosiva, evite que la micropipeta entre en contacto con él.

5.6. Literatura consultada

- Ávila, R., Rivas Pérez, B., Hernández Motzezak, R., Chirinos, M. (2012). *Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave Cocui Trelease*. *Multiciencias*, 12 (2): 129-135.
- Alvarado-Ortíz Ureta, C., Blanco Blasco, T. (2011). *Alimentos: Bromatología*. 2ª Edición. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC).
- Miller, G. L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Sánchez Enríquez, S., Flores Alvarado, L. J., Gurrola Díaz, C. M., Heredia Chávez, P. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. 3ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Segal Kischinevzky, C. A., Ortega Lule, G. J. (2005). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula I*. 3ª Edición. México: Las prensas de Ciencias.
- Organización Panamericana de Salud (2005). *Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio* [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.cnts.salud.gob.mx/descargas/LAB_manual-mantenimiento.pdf

5.6.1 Videos tutoriales

Línea Biotecnología TecnoParque Colombia SENA. (2014, diciembre, 15). Azúcares reductores método DNS [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=ESNZjdBGoUc&t=103s>

Sara B. (2015, octubre, 28). Funcionamiento-Espectrofotómetro [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=BHCMvTnzcxY>

5.7. Guía de reporte de resultados

5.7.1 Individual

1. Vuelve a leer el fundamento y realiza un glosario de términos con los conceptos que consideres clave para comprender la práctica.
2. Calcula el número exacto de tubos Eppendorf y cubetas que se emplearán en el desarrollo de la práctica.
3. Realiza un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.

5.7.2 Por equipo

1. Registre los valores de absorbancia de cada solución:

Tabla 5.1.

Preparación de la curva estándar de glucosa o fructosa.

Concentración glucosa o fructosa (g/L)	Volumen de glucosa o fructosa 0.2 % (μL)	Volumen de agua destilada (μL)	Volumen final (μL)	Absorbancia 540 nm (ua) (1 ^{er} ensayo)	Absorbancia 540 nm (ua) (2 ^{do} ensayo)
0	0	1000	1000		
0.250	125	875			
0.500	250	750			
1	500	500			
1.250	625	375			
1.500	750	250			
2	1000	0			

Tabla 5.2.

Cuantificación de azúcares reductores en las soluciones problema

Solución problema (1 %)	Absorbancia 540 nm (ua) (1 ^{er} ensayo)	Concentración (g/L)
Sacarosa		
Maltosa		
Lactosa		
Almidón		
Inulina		
Fructooligosacáridos		

2. Grafiquen en una hoja de cálculo los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de glucosa o fructosa, de la curva estándar.
3. Realicen la regresión lineal de los datos en la hoja de cálculo y determinen el valor de r^2 y los valores de m y b de la ecuación de la recta.

4. Con base en los resultados, respondan a lo siguiente:
 - a. ¿Hay correlación entre los datos obtenidos? ¿Qué necesitan hacer para mejorar la correlación entre los datos?
 - b. ¿La curva tiene un comportamiento lineal? ¿En qué rango de concentraciones de la curva, observan un comportamiento lineal?
3. Utilizando la ecuación de la recta, determinen la concentración de azúcares reductores de las soluciones problema (tabla 5.2).
4. Expliquen por qué se obtienen diferentes resultados si las soluciones fueron preparadas a la misma concentración.

5.7.3 Por grupo

1. Comparen los resultados obtenidos por equipo y determinen:
 - b. ¿Qué equipo obtuvo una mayor correlación en los datos analizados?
 - c. ¿Qué equipo obtuvo la peor correlación en los datos analizados?
 - d. ¿Expliquen el motivo de estas diferencias?
2. Considerando los datos obtenidos por cada equipo y la duplicidad del experimento:
 - a. Determinen el promedio de todos los datos obtenidos por los equipos, para cada punto de concentración de la curva estándar y su desviación estándar.
 - b. Realicen la regresión lineal de los datos en una hoja de cálculo y determinen el valor de r^2 y de la ecuación de la recta.
 - c. ¿La correlación entre los datos mejoró?

Práctica 6

Cuantificación de proteínas

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora y 30 minutos.

6.1. Objetivo

Identificar y practicar un método para efectuar la cuantificación de proteínas en solución.

6.2. Fundamento

Las proteínas son estructuras complejas orgánicas, con carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, algunas con azufre. Están formadas por aminoácidos esenciales: isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, valina, metionina y triptófano; y no esenciales: glicina, alanina, cisteína, cistina, glutámico, glutamina, aspártico, asparagina, arginina, histidina, serina, prolina e hidroxiprolina. Se hallan unidas por enlaces peptídicos y forman proteínas de estructura espacial primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, según sus aminoácidos, disposición estereoquímica y diversos enlaces. Las proteínas son digeridas en el estómago e intestino delgado, gracias a la acción del ácido clorhídrico (*HCl*) y de las enzimas proteasas, liberan péptidos y luego aminoácidos, los que, absorbidos por las vellosidades intestinales, pasan a formar el pool de aminoácidos en sangre, para ser metabolizados en diferentes tejidos, preferentemente en hígado. A nivel celular, en los ribosomas y conforme lo ordena la genética, sintetizan nuevas proteínas.

Los aminoácidos de los alimentos, cuando están libres, son absorbidos para formar nuevas proteínas. Algunos sufren desaminación o transaminación y dan energía. Otros otorgan sabor o enaltecen el propio sabor de los alimentos, por ejemplo: el glutamato, presente en tomates maduros, lentejas, carnes, champiñones, leche humana. La cisteína libre está presente en el arroz acabado de cocer y le da inconfundible y agradable olor. Los aminoácidos libres, al unirse a la glucosa o fructosa, sufren la reacción Maillard o pardeamiento no enzimático, como en la panificación, carne a la parrilla, papas fritas, etc., y ofrece compuestos de delicioso flavor (sabor más olor).

Se puede conocer la cantidad de proteínas de una muestra, empleando el método Kjeldahl, basado en la determinación de sustancias nitrogenadas. Los aminoácidos libres se analizan por cromatografía, previa hidrólisis de la proteína a analizar. Los aminoácidos se identifican con ninhidrina o triketohidrindeno, dando color azul violeta, excepto prolina e hidroxiprolina, que tiñen de amarillo.

La proteína también se puede cuantificar empleando un espectrofotómetro, tal es el caso del método de Bradford, uno de los más utilizados por su fácil uso, confiabilidad y rapidez. El método emplea el colorante azul brillante G-250 coomassie. El colorante se adhiere a la proteína tornándose la disolución de rojiza a azulada y el máximo de absorción del colorante cambia de 465 en tono rojo a 595 *nm* en el tono azul, el cambio en la absorbancia a 595 *nm* es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

El método de Bradford se emplea para determinar la concentración de proteína presente en una disolución. Utiliza un colorante hidrofóbico que en una disolución acuosa en presencia de ácido fosfórico tiene un color pardo y que al establecer una interacción relativamente inespecífica con las proteínas origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente y que es más intenso mientras mayor es la concentración de la proteína presente en la muestra. El

método es relativamente sensible a ciertos compuestos que pueden interferir en la cuantificación, tal es el caso de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Es por ello que es muy importante el adecuado lavado y enjuagado del material donde se realizarán las preparaciones para garantizar que el resultado obtenido de la cuantificación no se vea afectado por este tipo de sustancias interferentes. Este método resulta ser rápido y fácil de desarrollar comparado con otros métodos de cuantificación de proteínas, y es más sensible que la simple cuantificación de absorbancia a 280 *nm* por lo que en muchos casos es el método de elección. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra, se requiere la preparación de una curva de calibración realizada con una disolución de proteína de concentración conocida. La proteína comúnmente utilizada es la seroalbúmina bovina.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA antes de comenzar con el desarrollo de la práctica.

6.3. Material

- 30 Tubos de eppendorf de 1.5 o 2 *mL*
- Micropipeta de 1000 μL
- Micropipeta de 200 μL
- 10 puntas para micropipeta de 1000 μL
- 10 puntas para micropipeta de 200 μL
- Gradilla
- Matraz volumétrico de 25 *mL*
- Espectrofotómetro
- 14 Celdas o cubetas limpias

- Servitoalla
- Guantes de látex
- Reactivo de Bradford
- Agua destilada
- Solución salina al 0.9 %
- Seroalbúmina bovina (BSA)

6.4. Desarrollo de la práctica

1. Preparar 25 *mL* del estándar de seroalbúmina bovina (BSA) al 0.2 % (% p/v).
2. Etiquetar 7 tubos de eppendorf 1.5 *mL* o 2 *mL* con las concentraciones de seroalbúmina bovina especificadas en la tabla 6.1.
3. Realizar las diluciones descritas en la tabla 6.1, a partir del estándar de BSA al 0.2 %. Para ello, agregar a cada tubo el volumen del estándar y el volumen de agua destilada que se describen en la tabla.
4. Para cada concentración de la curva estándar, realizar el siguiente procedimiento:
 - a. Agregar 25 μL de cada dilución a cada tubo Eppendorf de 1.5 o 2 *mL*.
 - b. Mezclar suavemente el reactivo de Bradford y adicionar 750 μL a cada tubo.
 - c. Tapar y mezclar por inversión el contenido de los tubos o con ayuda de un agitador tipo vórtex.
 - d. Incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 minutos.

- e. Transferir el contenido de cada tubo a una celda (cubeta) espectrofotométrica de metacrilato.
 - f. Determinar la absorbancia de cada punto de la curva estándar a 595 *nm* de longitud de onda, en un espectrofotómetro de luz visible. Utilizar como blanco la reacción que sólo contiene agua destilada.
5. Anotar los valores de absorbancia obtenidos, en la tabla 6.1.
 6. Repetir el procedimiento del paso (2) al (5) para obtener los resultados por duplicado, este paso es el 2do. ensayo.
 7. DESECHAR EL CONTENIDO DE LAS CELDAS EN UN RECIPIENTE PARA RESIDUOS QUÍMICOS.

6.5. Consideraciones particulares

1. Es necesario leer detenidamente la práctica y analizar cada punto del desarrollo de la misma, antes de comenzar para desarrollarla rápido y no detenerse a entender el procedimiento.
2. **IMPORTANTE:** El reactivo de Bradford es fotosensible, por lo que debe guardarse en un frasco ámbar y ser envuelto en papel aluminio. No debe dejarse destapado en ningún momento durante el desarrollo de la práctica.
3. Es muy importante el uso de la micropipeta, cuidando las cantidades de las disoluciones, ya que al trasvasar se pueden alterar las muestras, se deben cuidar los volúmenes de la micropipeta (ajustar dependiendo de la cantidad a trasvasar).
4. Los reactivos deben manejarse siempre con cuidado al hacer diluciones, y al trasvasarlas a las celdas o cubetas, deben ser medidas de forma exacta y correcta.

6.6. Literatura consultada

- Alvarado-Ortíz Ureta, C., Blanco Blasco, T. (2011). *Alimentos: Bromatología*. 2ª Edición. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC).
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Sánchez Enríquez, S., Flores Alvarado, L. J., Gurrola Díaz, C. M., Heredia Chávez, P. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. 3ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Segal Kischinevzky, C. A., Ortega Lule, G. J. (2005). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula I*. 3ª Edición. México: Las prensas de Ciencias.
- Organización Panamericana de Salud (2005). *Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio* [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.cnts.salud.gob.mx/descargas/LAB_manual-mantenimiento.pdf
- Instituto Tecnológico Superior de Xalapa (2011). *Manual de operación y mantenimiento de los equipos del laboratorio de química y usos múltiples* [Archivo PDF]. Recuperado de: <http://www.itsx.edu.mx/transparencia/I/reglamentos-alumnos/D-AA-12-Manual-operacion-mantenimiento-equipos-laboratorio-quimica.pdf>

6.6.1. Videos tutoriales

García Artega, R. (2018, septiembre, 2). Cuantificación de proteínas por método de Bradford [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=1NuZrmtGLIY>

Sara B. (2015, octubre, 28). Funcionamiento-Espectrofotómetro [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=BHC-MvTnzcXy>

6.7. Guía de reporte de resultados

6.7.1. Individual

1. Repite la lectura del fundamento y realiza un glosario de términos con los conceptos que consideres clave para comprender la práctica.
2. Calcula el número de tubos Eppendorf y celdas que se deben emplear.
3. Realiza un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.

6.7.2. Por equipo

1. Registre los siguientes datos:

Tabla 6.1.

Preparación de la curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA)

Concentración de seroalbúmina bovina (μL)	Volumen de seroalbúmina bovina al 0.2 % (μL)	Volumen de agua destilada (μL)	Volumen final (μL)	Absorbancia 595 nm (ua) (1 ^{er} ensayo)	Absorbancia 595 nm (ua) (2 ^{do} ensayo)
0	0	1000	1000		
0.250	125	875			
0.500	250	750			
0.750	375	625			
1	500	500			
1.250	625	375			
1.5	750	250			

Después de leer el fundamento y haber realizado la práctica, realicen las siguientes actividades:

2. Grafiquen en una hoja de cálculo los valores de absorbancia, obtenidos para las diferentes concentraciones de seroalbúmina, de la curva estándar.
3. Realicen la regresión lineal de los datos en la hoja de cálculo y determinen el valor de r^2 y de la ecuación de la recta.
4. Con base en los resultados, respondan a lo siguiente:
 - a. ¿Hay correlación entre los datos obtenidos? ¿Qué necesitan hacer para mejorar la correlación entre estos datos?
 - b. ¿La curva tiene un comportamiento lineal? ¿En qué rango de concentraciones de la curva observan un comportamiento lineal?
5. Utilizando la ecuación de la recta, determinen cuál es la concentración de las soluciones problema de la tabla 6.2.

Tabla 6.2.

Soluciones problemas

Soluciones problema	Absorbancia (ua)	Concentración (mg/mL)
A	0.375	
B	0.423	
C	0.986	

6. Para la curva estándar, se requiere preparar las concentraciones de seroalbúmina bovina de la tabla 6.3. ¿Qué volumen de la solución de seroalbúmina al 0.2% y de agua deben utilizar para preparar 1000 μL ?

Tabla 6.3.

Calcular volumen de seroalbúmina y agua

Concentración de seroalbúmina bovina (mg/mL)	Volumen de seroalbúmina bovina 0.2 % (μL)	Volumen de agua destilada (μL)	Volumen final (μL)
0.6			1000
0.8			
1.75			

Utilicen la siguiente fórmula para realizar el cálculo:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

C_1 : Concentración inicial (2 mg/mL).

V_1 : Volumen inicial, el que debe tomarse de la solución concentrada para realizar la dilución.

C_2 : Concentración final de la dilución.

V_2 : Volumen final, el que se quiere preparar (1000 μL).

6.7.3 Por grupo

1. Comparen los resultados obtenidos por equipo y determinen:
 - a. ¿Qué equipo obtuvo una mayor correlación en los datos analizados?

- b. ¿Qué equipo obtuvo la peor correlación en los datos analizados?
 - c. ¿Cómo explican estas diferencias?
2. Considerando los datos obtenidos por cada equipo y la duplicidad del experimento:
 - a. Determinen el promedio de todos los datos para cada punto de concentración de la curva estándar y su desviación estándar.
 - b. Realicen la regresión lineal de los datos en una hoja de cálculo y determinen el valor de r^2 y de la ecuación de la recta.
 - c. ¿Mejóro la correlación entre los datos?

Práctica 7

Cuantificación de actividad enzimática de la amilasa salival

Tiempo estimado para el desarrollo de la práctica: 1 hora y media.

7.1. Objetivo

Determinar la actividad de la amilasa salival y comprender la influencia del pH, la temperatura y el tiempo de reacción en la actividad enzimática.

7.2. Fundamento

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica, su función es acelerar la velocidad a la que ocurren las reacciones químicas en los organismos vivos. Se consideran el grupo de proteínas más numeroso y especializado. Las enzimas se encuentran en todas las células y en las secreciones, por ejemplo, en la saliva. Aunque la enzima de la saliva es conocida como ptialina, por su tipo de actividad enzimática pertenece al grupo de las amilasas pues actúa hidrolizando almidón, es decir, rompiendo el polisacárido en unidades menores, maltosas.

Regulación de la actividad enzimática

La naturaleza ha diseñado diferentes formas de regular la actividad de las enzimas y lograr que la vida suceda como la conocemos. Por ejemplo, existen enzimas que actúan en forma conjunta para completar una parte del metabolismo celular, trabajan en serie y conforman las llamadas rutas metabólicas. En algunos casos, pueden

actuar en forma de complejos multienzimáticos que facilitan que el producto de una enzima sea utilizado en forma inmediata por la siguiente enzima y así sucesivamente para aumentar la velocidad con la que se lleva a cabo todo el proceso. Además, las rutas metabólicas son controladas por enzimas reguladoras. Su actividad es modulada por diversos factores y en las rutas metabólicas la enzima reguladora suele ser la primera enzima de la ruta. Entre los moduladores enzimáticos podemos encontrar: al sustrato y al producto de la ruta metabólica, hormonas, cofactores, metabolitos de bajo peso molecular y algunos intermediarios metabólicos. La organización y distribución de las vías enzimáticas suponen una ventaja para la célula, es por ello que, las enzimas que componen una ruta metabólica suelen encontrarse todas ubicadas en un mismo organelo celular y además alineadas en secuencia para facilitar el uso de los intermediarios que forman entre ellas e incluso para proporcionar de inmediato su producto final a una siguiente ruta metabólica.

Efecto de la temperatura y del pH

Cada enzima tiene una temperatura óptima en la que, la reacción que cataliza, se realiza con la velocidad máxima. Por debajo y por encima de esta temperatura, la velocidad de la reacción enzimática procede más lentamente. En muchos casos, la velocidad de una reacción enzimática se duplica cuando se aumenta la temperatura 10 °C y cae drásticamente por encima de los 40 °C. La razón de que aumente la velocidad de reacción al aumentar la temperatura es que la temperatura proporciona energía que es utilizada para proporcionar la energía de activación que requiere el sustrato para reaccionar. Por otro lado, la disminución de la velocidad de la reacción a altas temperaturas se debe a que las enzimas son de naturaleza proteica y se desnaturalizan por acción de la temperatura (la mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de 60 - 70 °C). Por otro lado, la disminución de la velocidad de

reacción a bajas temperaturas no es debida a la desnaturalización de la enzima sino a que no se proporciona la energía suficiente para que el sustrato alcance la energía de activación que requiere para convertirse en producto.

Otro factor que afecta la actividad enzimática es el pH del medio de reacción. El pH óptimo para cada enzima es diferente y cuando la enzima no se encuentra en el rango de pH óptimo, la conformación de la enzima se altera como consecuencia de los cambios que se producen en el estado de ionización de los aminoácidos que componen la enzima, principalmente los del sitio activo, provocando en algunos casos que la enzima no sea funcional. Algunas cadenas laterales de los aminoácidos cercanos al sitio activo actúan como ácidos o bases débiles y son importantes para que se lleva a cabo su función por lo que también la alteración en su estado de ionización puede alterar la velocidad de la enzima. Además, un pH demasiado ácido o básico para la enzima también promueve su desnaturalización que se manifiesta como un decremento paulatino en la velocidad de reacción hasta que la enzima no es funcional.

Amilasa salival

La saliva es un fluido biológico que mantiene la homeostasis de la cavidad bucal. Está compuesta de una gran cantidad de proteínas, entre ellas: hormonas, enzimas, anticuerpos y citocinas. Algunos de estos compuestos utilizan transportes intra y extracelulares para ser trasladados de la sangre a la saliva. Dentro de los más de 50 componentes de la saliva, la amilasa es el que se encuentra en mayor concentración y forma parte de la película adquirida y de la placa dentobacteriana y dentro de las actividades enzimáticas presentes en la saliva la que ejerce la amilasa es la más importante. Esta enzima se produce en el páncreas y en las glándulas salivales, pudiéndose distinguir por su origen la ∂ -amilasa salival y la pancreática. La

amilasa constituye del 10 % al 20 % de las proteínas de la saliva. La amilasa salival es sintetizada y secretada por las glándulas del paladar, las salivares mayores (parótida, submaxilar y sublingual). La glándula parótida es la que produce la mayor proporción de amilasa salival. Otros fluidos corporales, como el plasma sanguíneo, las secreciones bronquiales y las lágrimas contienen amilasa en menor concentración.

La digestión de los alimentos comienza en la boca, particularmente la de los carbohidratos. Esta enzima es considerada glucolítica ya que actúa sobre el almidón y de esta forma contribuye a la digestión de carbohidratos. La degradación de los almidones es más eficiente cuando el bolo alimenticio se mezcla correctamente ayudado por los movimientos de la lengua con la amilasa contenida en la saliva. Es por ello que un adecuado proceso de masticación es tan importante. La amilasa hidroliza los enlaces glicosídicos α 1,4 de la amilosa que forma parte del almidón convirtiéndola en α dextrinas y maltosa. Su pH óptimo es cercano a la neutralidad en el rango de 5.5 a 8.0, mientras que su temperatura óptima es de 37°C, la cual coincide con la temperatura corporal humana interna. La amilasa al atravesar el estómago es inactiva debido al pH tan ácido del estómago, sin embargo, al llegar al intestino delgado donde prevalece un pH alcalino puede recuperar parte de su actividad. Por su actividad enzimática la amilasa es denominada α -1,4-D-glucano glucohidrolasa está clasificada de acuerdo a la convención de enzimas (EC) con el código EC 3.2.1.1. Existen diferentes isoformas de la enzima que se diferencian por su carga y el grado de glicosilación que presentan. Para su funcionamiento esta enzima requiere de calcio.

La concentración de la amilasa salival es de $476 \pm 120 \mu\text{g/mL}$ de proteína que equivalen a una actividad enzimática en el rango de $1080 \pm 135.6 \text{ UI}$ en adultos. Diversos factores pueden elevar la concentración de esta enzima, tal es el caso del aumento en la actividad del sistema nervioso simpático, el estrés agudo y el ejercicio físico. Es por ello que la concentración de amilasa se ha pro-

puesto como un indicador de cambios relacionados con el estrés y con los cambios en el sistema nervioso simpático. Algunos ensayos empleados para la determinación de la actividad del sistema nervioso simpático como la medición electrofisiológica clásica como la conductancia de la piel y el ritmo cardiaco han sido reemplazados por mediciones más simples como la determinación de la actividad amilasa salival. Además, la variabilidad en la concentración de la amilasa puede servir para detectar anomalías en los órganos que la producen.

REVISAR LOS TUTORIALES DESCRITOS EN LA LITERATURA CONSULTADA antes de comenzar con el desarrollo de la práctica.

7.3. Material

- Reactivo de DNS
- Balanza analítica
- Micropipeta de 1000 μL
- Micropipeta de 200 μL
- 10 puntas para micropipeta de 200 μL
- 5 puntas para micropipeta de 1000 μL
- 2 vasos de precipitado de 25 mL para la recolección de saliva
- Gradilla
- Gradilla flotadora
- Tubos eppendorf de 1.5 o 2 mL
- 14 Celdas o cubetas limpias

- Espectrofotómetro
- Espátula o cucharilla
- Matraz volumétrico de 25 mL
- Centrifuga
- Termobloque o incubadora
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Recipiente de metal o vidrio (depende si la parrilla es de calentamiento o eléctrica) para calentar agua hasta la ebullición
- Guantes de látex
- 10 g de harina de fécula de maíz (maizena u otra marca)
- Amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7
- 3 mL de saliva antes de correr
- 3 mL de saliva después de correr
- Hielo (alternativamente se puede emplear un congelador)
- Agua destilada

7.4. Desarrollo de la práctica

Antes de comenzar, encender el espectrofotómetro para estabilizar la lámpara a 540 nm (aproximadamente durante 15 m) y calentar agua para que llegue a ebullición.

1. Preparar 25 mL de una solución estándar de fécula de maíz al 1 % en amortiguador de fosfato 100 mM pH 7 (% p/v).

2. Incubar la solución a 50 °C por 5 minutos y homogeneizando por inversión cada minuto. De ser necesario, repetir el proceso hasta que se disuelva la fécula de maíz.
3. Preparar la amilasa salival de la siguiente manera:
 - a. Uno de los integrantes del equipo debe escupir en un recipiente para coleccionar 3 mL de saliva.
 - b. Homogeneizar la saliva agitando el recipiente.
 - c. Trasvasar 1 mL de saliva a un tubo eppendorf de 1.5 o 2 mL con una micropipeta de 1 mL.
 - d. Centrifugar la saliva a 10,000 rpm durante 5 minutos.
 - e. Recuperar el sobrenadante con la micropipeta y trasvasar a un tubo limpio.
 - f. El donador de saliva debe correr durante 15 minutos y luego repetir la colecta y preparación de saliva para identificar la actividad enzimática, antes y después de correr.
4. Etiquetar 7 tubos eppendorf de 1.5 o 2 mL con los tiempos de reacción indicados en la tabla 7.1. Etiquetar los tubos por duplicado y colocarlos en una gradilla.
5. Agregar a cada tubo 50 µL de DNS.
6. Para llevar a cabo la reacción enzimática con la muestra de saliva coleccionada antes de hacer ejercicio, se debe:
 - a. Etiquetar 1 tubo eppendorf de 1.5 o 2 mL como tubo de reacción A.

- b. Agregar al tubo 400 μL de la solución de fécula de maíz al 1 %.
 - c. Atemperar el tubo durante un minuto en un termobloque o incubadora a 37 °C.
 - d. Agregar 100 μL de saliva (con amilasa) y homogeneizar inmediatamente.
 - e. De inmediato, tomar 50 μL de la mezcla y adicionarla al tubo con DNS marcado con el tiempo 0.
 - f. Mantener la reacción a 37°C y tomar una muestra de 50 μL cada 2 minutos y agregarla al tubo con DNS correspondiente.
7. Repetir el procedimiento del inciso d) al f) con el tubo de reacción B.
 8. Llevar a cabo la reacción enzimática del paso (5) con la muestra de amilasa recolectada después de correr.
 9. Colocar todos los tubos en una gradilla flotador e incubar en agua hirviendo (> 95 °C) por 5 minutos. Evitar confundir los tubos.
 10. Retirar los tubos de la gradilla con mucho cuidado e incubarlos en agua con hielo durante 5 minutos.
 11. Agregar a cada tubo 500 μL de agua destilada.
 12. Homogenizar la solución en los tubos por inversión y trasvasarlos a las celdas espectrofotométricas y determinar su absorbancia a 540 *nm*.
 13. Registrar los valores en la tabla 7.1.

14. DESECHAR EL CONTENIDO DE LAS CELDAS EN UN RECIPIENTE PARA RESIDUOS QUÍMICOS.

7.5. Consideraciones particulares

1. **IMPORTANTE:** El DNS es fotosensible por lo que debe guardarse en un frasco ámbar, envuelto en papel aluminio y no debe dejarse destapado en ningún momento.
2. Antes de comenzar la práctica, los alumnos deben leer, analizar e identificar los cálculos que deben realizar para completar las respectivas tablas, y ver los tutoriales en línea.
3. Es indispensable mantener concentración y no perder el tiempo para llevar a cabo la práctica en el tiempo establecido.
4. El vórtex es utilizado para mezclar homogéneamente la solución de fécula de maíz y las muestras, ya que ésta es insoluble a temperatura ambiente.
5. Algunos reactivos utilizados en esta práctica son tóxicos y pueden dañar las fibras de la ropa, por lo que se requiere realizar una adecuada manipulación de los materiales.

7.6. Literatura consultada

- Lamby Tovar, C. P., Gómez González, O. L., Jaramillo Gómez, L. M. (2013). *La α -amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general*. Universitas Odontológica, 32(69): 93–101.
- Rohleder, N., Nater, U. M. (2009). *Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations*. Psychoneuroendocrinology, 34(4): 469–485. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.12.004>

- Kathleen Mahan, L., Escott-Stump, S. L., Raymond, J. (2013). Krause: *Dietoterapia*. 13a Edición. España: Elsevier.
- Marshall, J., William K., Bangert, S., Lapsley, M. (2012). *Bioquímica clínica*. 7a Edición. España: Elsevier.
- Miller, G. L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry, 31(3): 426-428©
- Sánchez Enríquez, S., Flores Alvarado, L. J., Gurrola Díaz, C. M., Heredia Chávez, P. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. 3ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Segal Kischinevzky, C. A., Ortega Lule, G. J. (2005). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula I*. 3ª Edición. México: Las prensas de Ciencias.

7.6.1. Videos tutoriales

- Sara B. (2015, octubre, 28). Funcionamiento-Espectrofotómetro [Archivo de video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=BHC-MvTnzcxY>

7.7. Guía de reporte de resultados

7.7.1. Individual

1. Repite la lectura del fundamento y realiza un glosario de términos con los conceptos que consideras clave para comprender la práctica.
2. Responde las siguientes preguntas:
 - a. ¿Cuál es la temperatura óptima para la enzima amilasa?

- b. ¿Cuál es el pH óptimo de la acción de la AASH?
 - c. ¿Cuál es el nombre químico de la AASH?
 - d. Del total de las proteínas de la saliva, ¿Qué porcentaje corresponde a la AASH?
 - e. ¿Qué condiciones aumentan la concentración de AASH?
3. Realiza un diagrama de flujo del desarrollo de la práctica. Observa un ejemplo de un diagrama de flujo en el Anexo III.

7.7.2. Por equipo

1. Registren los siguientes valores:

Tabla 7.1.

Valores de absorbancia

Tiempo de reacción (min)	Antes de correr				Después de correr			
	Abs 540 nm (ua)				Abs 540 nm (ua)			
	A	B	Promedio	Error estándar	A	B	Promedio	Error estándar
0								
2								
4								
6								
8								
10								
12								

2. Calculen el número de tubos Eppendorf y cubetas que se deben emplear.
3. Utilicen las claves que se proporcionan a continuación para

identificar las respuestas y completar la sopa de letras de la figura 7.1.

- a. Actúan como catalizadores de reacciones químicas, específicas en los seres vivos o sistemas biológicos.
- b. Conjunto de enzimas organizadas para regular la actividad enzimática.
- c. Es conocida también como ptialina.
- d. Factor que contribuye a que la enzima aumente o ralentice la velocidad de la reacción enzimática.
- e. Condición de pH en la cual, la amilasa se desempeña más eficazmente.
- f. Son las glándulas salivales mayores, en ellas es sintetizada y secretada la amilasa.
- g. Factores que aumentan la concentración de la AASH.
- h. Mantiene la homeostasis en la cavidad oral.
- i. Tipo de macromolécula a la que pertenecen las enzimas.

P A R O T I D A G R O C S T T Y Y
 Q T V V D S I U X A A Y A L Q E R
 V E N I U U U K X I T Q L M W I Q
 K M S E A M W B J T O O I R M A T
 U P F T U M F E L V E J V K V M V
 F E F M R T E A R I Y M A T Y O Z
 U R G G Q E R T J F N Z V E C I K
 A A S D Z J S O A K F G Y O H V Q
 E T H E X M G U Y B Q A U A D O V
 J U N Q O F V T B M O F L A O I C
 E R Y E A X A W U M H L Y T L E J
 R A Z N B L X V G D A C I J Q K O
 C P R O T E I N A E I X Y C A Z X
 I R R S U I L F N R L V I E A U I
 C E N Z I M A B G O F D O L F A C
 I X N U A M I L A S A Z Q J A O E
 O K W L F M O R U A V E E N T R E

Figura 7.1. Sopa de letras de actividad enzimática

4. Después de leer el fundamento y haber realizado la práctica, realicen las siguientes actividades:
 - a. Grafiquen en una hoja de cálculo los valores de absorbancia obtenidos a lo largo de la reacción (tiempo de reacción) con la saliva recolectada antes y después de correr.
 - b. Realicen la regresión lineal de los datos en la hoja de cálculo y determinen el valor de r^2 y de la ecuación de la recta.

5. Con base en los resultados, responda lo siguiente:
 - a. ¿Hay correlación entre los datos obtenidos? ¿Qué necesitarían hacer para mejorar la correlación entre los datos?
 - b. ¿La curva tiene un comportamiento lineal? ¿En qué rango de concentraciones de la curva, observan un comportamiento lineal?
 - c. ¿Qué diferencias observan en las gráficas?
 - d. ¿Cómo es la pendiente de la recta que representa la muestra de saliva antes de hacer ejercicio con respecto a la pendiente de la recolectada después de hacer ejercicio?
 - e. Utilizando la pendiente de la ecuación de la recta de la curva estándar de glucosa o fructosa de la práctica 5 y la pendiente de la ecuación de la recta de la velocidad de reacción enzimática, antes y después de hacer ejercicio, determinen cuál es la actividad enzimática

(velocidad inicial: v_i) en la saliva, antes y después de hacer ejercicio. Utilicen las fórmulas que se describen a continuación:

$$v_i = \frac{m_x}{m_{STD}}$$

Donde

v_i : Velocidad de reacción enzimática, expresada como

$$\left(\frac{mg \text{ AR}}{\text{min} \times mL} \right)$$

m_x : Pendiente de la reacción enzimática, expresada como

$$\left(\frac{Absorbancia}{min} \right)$$

m_{STD} : Pendiente de la curva estándar, expresada como

$$\left(\frac{Absorbancia}{mg \text{ AR}/mL} \right)$$

La actividad enzimática comúnmente se expresa en unidades de actividad enzimática por volumen de extracto enzimático

$$\left(\frac{U}{mL} \right)$$

Una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 μmol de producto por unidad de tiempo, $U =$

$$\left(\frac{\mu\text{mol Glu}}{\text{min}} \right)$$

por lo tanto, la actividad enzimática también se puede expresar en

$$\left(\frac{\mu\text{mol Glu}}{\text{min} \times \text{mL}} \right)$$

para ello, se involucra en la fórmula el peso molecular de la glucosa:

$$\begin{aligned} v_i &= \left(\frac{\text{mg-AR}}{\text{min} \times \text{mL}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ mmol}}{180 \text{ mg-AR}} \right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right) \times \frac{\text{Vol. final de rx } (\mu\text{L})}{\text{Vol. de saliva } (\mu\text{L})} \times (FD) \\ &= \frac{\mu\text{mol Glu}}{\text{min} \times \text{mL}} = \frac{U}{\text{mL}} \end{aligned}$$

Donde:

AR: Azúcares reductores

FD: Factor de dilución

Vol. final de rx: 500 μl

Vol. de saliva: 100 μl

6. Después de analizar los resultados de actividad enzimática obtenidos antes y después de correr, responda lo siguiente:
 - a. ¿En cuál situación, antes o después de correr, se observó mayor actividad enzimática? ¿Cuántas veces fue mayor?
 - b. ¿Coincide este valor con lo reportado en la literatura? ¿Cuál es la razón por la cual se obtiene este resultado?

7.7.3. En grupo

1. Comparen los resultados obtenidos por equipo y determinen:
 - a. ¿Qué equipo obtuvo la mayor actividad enzimática basal?
 - b. ¿Qué equipo obtuvo la mayor actividad enzimática después de correr?
 - c. ¿Qué equipo obtuvo la mayor diferencia entre ambas situaciones?
 - d. ¿Qué equipo obtuvo los datos más confiables?

Anexo I. Vinculación del manual con el programa de la asignatura de Bioquímica Estructural

El *Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica* está vinculado al contenido del programa de la asignatura de Bioquímica Estructural de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

En la siguiente tabla se indica la unidad en la que deberá ser realizada y evaluada cada una de las prácticas.

Tabla I.

Vinculación del manual con el programa de la asignatura de Bioquímica Estructural





Unidad	Nombre de la Unidad	Prácticas
I	Introducción a la química de la vida.	1. Uso de la balanza granataria y analítica. 2. Uso y verificación de las micropipetas.
II	Agua y pH	3. Preparación de disoluciones. 4. Uso del potenciómetro.
III	Carbohidratos	5. Cuantificación de azúcares reductores.
VI	Proteínas y enzimas.	6. Cuantificación de proteínas. 7. Cuantificación de la actividad enzimática de la amilasa salival.

Anexo II. Instrumentos de Laboratorio







Al emplear el laboratorio y de acuerdo a cada una de las prácticas que se van desarrollando en el transcurso de la asignatura, se utilizarán ciertos instrumentos y equipo de laboratorio que son de gran utilidad para el aprendizaje y correcto desarrollo de las actividades; tal vez sea material con el que no se esté familiarizado, por lo que, a continuación, se presenta una tabla que describe brevemente los instrumentos más utilizados en este manual para el desarrollo de las prácticas.

Tabla II.

Equipo y material necesario para la realización de las prácticas

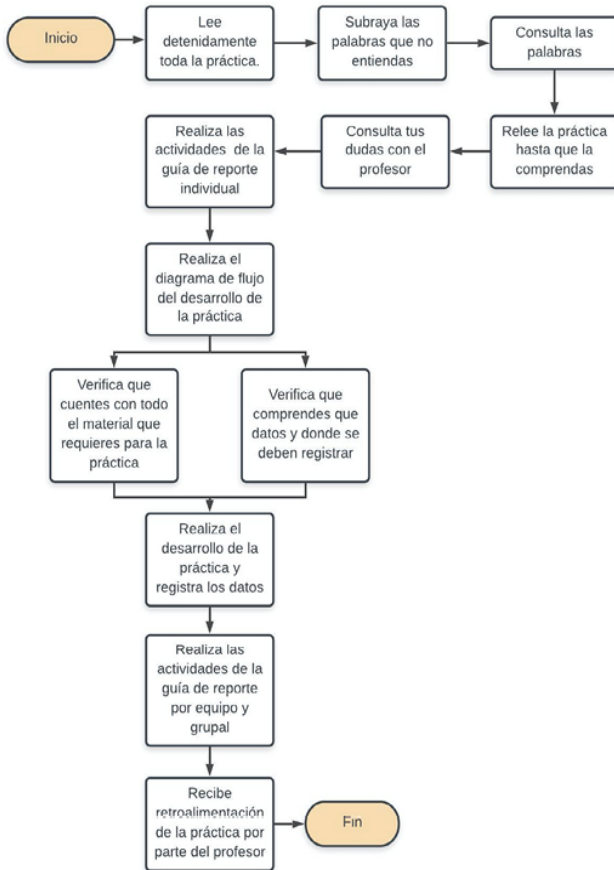
NOMBRE	FUNCIÓN	IMAGEN
Vaso de precipitado	Se utiliza para preparar o calentar sustancias, y trasvasar y medir líquidos.	
Pipeta Pasteur	Permite dosificar líquidos por goteo.	
Pipeta graduada de 10 mL	Permite medir volúmenes exactos dentro del rango de la pipeta.	
Probeta de vidrio	Permite medir volúmenes con un ligero grado de inexactitud.	

<p>Matraz Volumétrico (aforado)</p>	<p>Permite medir con exactitud un volumen y se usa para la preparación de disoluciones.</p>	
<p>Micropipeta</p>	<p>Permite medir con exactitud volúmenes pequeños dentro de un rango establecido. Emplean puntas desechables.</p>	
<p>Varilla de vidrio</p>	<p>Ayuda a mezclar disoluciones</p>	
<p>Cucharilla o Espátula</p>	<p>Permiten tomar de los frascos de sustancias sólidas, las cantidades que se necesitan para pesar.</p>	
<p>Pinzas</p>	<p>Permiten sujetar tubos de ensayo, matraces o vasos de precipitado.</p>	
<p>Pizeta</p>	<p>Contenedor de líquidos utilizado para dispensar disoluciones cuando no se requiere un volumen definido.</p>	

<p>Barra magnética de agitación</p>	<p>Permite homogeneizar las disoluciones.</p>	
<p>Balanza analítica</p>	<p>Permite pesar cantidades pequeñas de sustancias, de una manera exacta y precisa.</p>	
<p>Balanza granataria</p>	<p>Permite pesar objetos, sustancias, y materiales con cierto grado de inexactitud.</p>	
<p>pH-metro o Potenciómetro</p>	<p>Permite medir el pH de una disolución.</p>	
<p>Espectrofotómetro</p>	<p>Brindar información sobre la concentración de una muestra problema comparada con una curva estándar que contiene la misma sustancia.</p>	
<p>Agitador tipo vórtex</p>	<p>Permite homogeneizar soluciones mediante agitación intensa. Disuelve altas concentraciones de soluto.</p>	

Centrifuga	Permite precipitar células y macromoléculas de una disolución.	
Termobloque o incubadora	Permite mantener una temperatura fija dentro del rango del dispositivo para incubar cultivos microbiológicos, celulares, etc.	
Parrilla de calentamiento con agitación	Permite calentar vasos, matraces o recipientes con fondo plano.	

Anexo III. Diagrama de flujo de cómo realizar una práctica



Wilfrido Miguel Contreras Sánchez
Secretario de Investigación, Posgrado y Vinculación

Pablo Marín Olán
Director de Difusión, Divulgación Científica y Tecnológica

Francisco Cubas Jiménez
Jefe del Departamento Editorial de Publicaciones No Periódicas