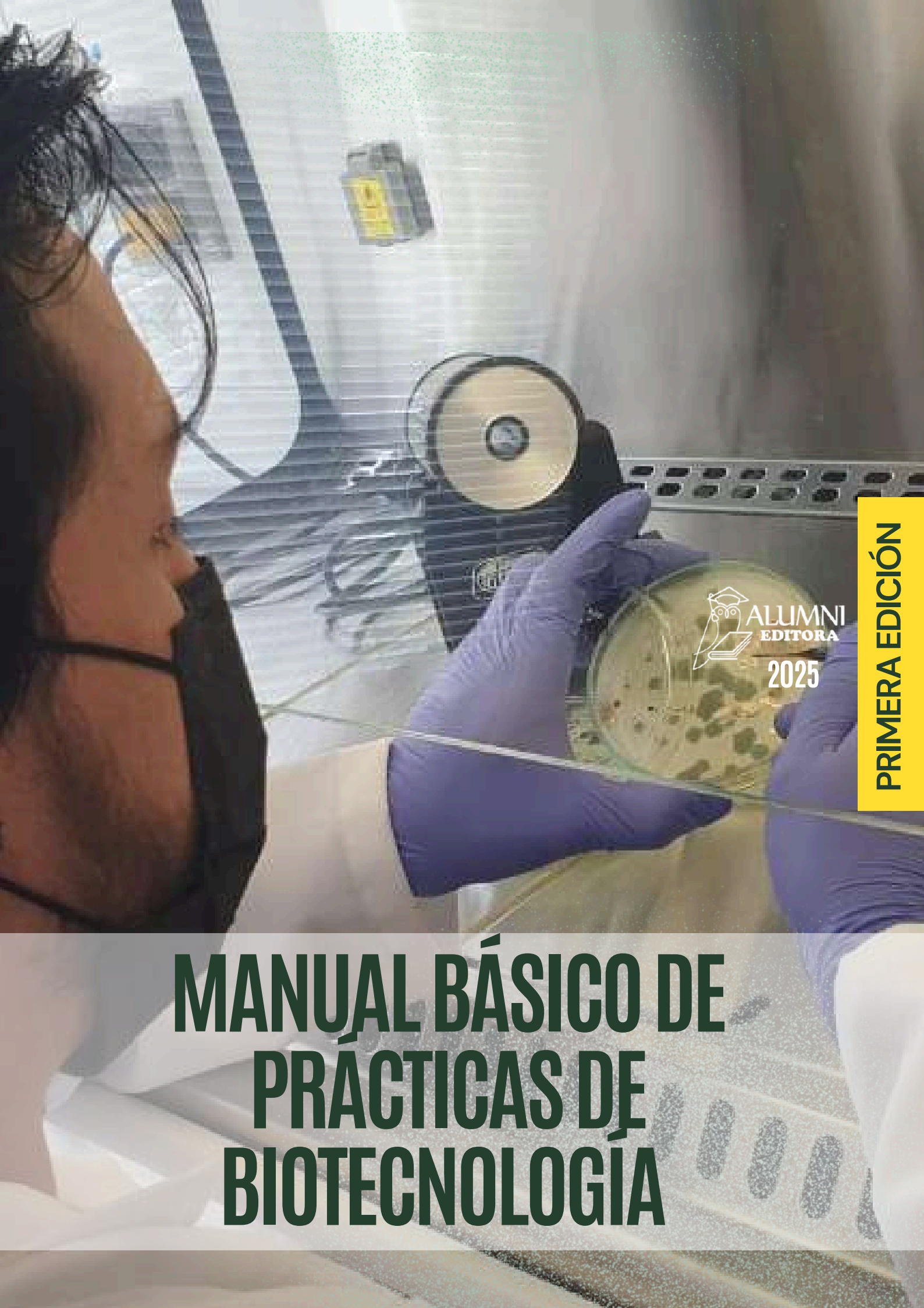




 **ALUMNI
EDITORIA**
2025

PRIMERA EDICIÓN

MANUAL BÁSICO DE PRÁCTICAS DE BIOTECNOLOGÍA

Manual básico de Prácticas de Biotecnología

Autores

Diego Alejandro Barrigas Revelo

- Ingeniero en Biotecnología
- Magister en Productos Farmacéuticos Naturales

 <https://orcid.org/0009-0004-1535-2698>

 dbarrigas@ist17dejulio.edu.ec

Jessica Guadalupe Ballesteros Jerez

- Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

 <https://orcid.org/0009-0001-4142-9378>

 jballesteros@ist17dejulio.edu.ec

Ana Carolina Tituaña Puente

- Ingeniera en Procesos Biotecnológicos
- Magister en Biomedicina

 <https://orcid.org/0009-0008-6595-5613>

 atituana@ist17dejulio.edu.ec

Manual básico de Prácticas de Biotecnología

Autores

María Cristina Chamorro Portilla

- Licenciada en Ciencias Biológicas

 <https://orcid.org/0009-0007-0728-2580>

 cchamorro@ist17dejulio.edu.ec

Marlon Daniel Almeida Vásquez

- Ingeniero Biotecnólogo

 <https://orcid.org/0009-0007-8603-2001>

 malmeida@ist17dejulio.edu.ec

Mauricio Israel Lara Arellano

- Ingeniero en Biotecnología

 <https://orcid.org/0009-0007-5980-7510>

 mlara@ist17dejulio.edu.ec

Manual básico de Prácticas de Biotecnología

Autores

Andrea Estefanía Zurita Miranda

- Ingeniera en Biotecnología



<https://orcid.org/0009-0005-4355-6775>



azurita@ist17dejulio.edu.ec

Manual básico de Prácticas de Biotecnología

Catalogación Bibliográfica

Autores

- Diego Alejandro Barrigas Revelo
- Jessica Guadalupe Ballesteros Jerez
- Ana Carolina Tituaña Puente
- María Cristina Chamorro Portilla
- Marlon Daniel Almeida Vásquez
- Mauricio Israel Lara Arellano
- Andrea Estefanía Zurita Miranda

Título

Manual básico de Prácticas de Biotecnología

Descriptor

Biotecnología, Laboratorio, Microbiología, Ingeniería genética, Cultivos celulares

Dewey

660.6

Thema

TCBG

Publicación

Febrero 2025

Edición

Primera

ISBN

978-9942-7307-9-4

DOI

<https://doi.org/10.70625/alumned/12>

Editorial

Alumni Editora

País - Ciudad

Ecuador - Atuntaqui

Formato

Adobe Acrobat Reader

Páginas

146

Cámara Ecuatoriana del Libro



Todo el contenido de este libro tiene una licencia de Creative Commons Attribution License.

Reconocimiento-No Comercial-No Derivados 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

El contenido del texto y sus datos en su forma, corrección y confiabilidad son de exclusiva responsabilidad del autor y no representan necesariamente la posición oficial de Alumni Editora. Se permite descargar la obra y compartirla siempre que se den los créditos al autor, pero sin posibilidad de alterarla de ninguna forma ni utilizarla con fines comerciales.

Manual básico de Prácticas de Biotecnología

Editor en Jefe

Santiago Andrés Otero, PhD., Alumni Editora, Ecuador

Equipo Editorial

- Óscar Gómez Jiménez, PhD., Universidad Internacional de Valencia (VIU), España
- Shashi Kant Gupta, PhD., Eudoxia Research University, Estados Unidos
- Anabell Fondón Ludeña, PhD., Universidad Rey Juan Carlos, España
- Edwin Ricardo Flores Hernández, PhD., Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer, El Salvador
- Gopi Devarajan, PhD., SRM Institute of Science and Technology, India
- Flérída Moreno Alcaraz, PhD., Universidad Autónoma de Sinaloa, México
- J. Suresh Kumar, PhD., St. Joseph University, India
- Mauricio Lima Narváez, PhD., Universidad Técnica del Norte, Ecuador
- Héctor Luis López López, PhD., Universidad Autónoma de Sinaloa, México
- Samuel Helena Tumbula, PhD., Universidad Católica de Angola, Angola
- Carlos Bolivar Sarmiento Chugcho, PhD., Universidad Técnica de Machala, Ecuador
- Xavier Fernando Acosta Faneite, PhD., Universidad del Zulia, Venezuela
- Mirian Alexandra Valeriano Meneses, PhD., Instituto Superior Tecnológico Liceo Aduanero, Ecuador
- Sivabalan Settu, PhD., CSE SoCI Vignan University Guntur, India
- Lorena Elizabeth Casanova Imbaquingo, MSc., Instituto Universitario Cotacachi, Ecuador
- Gladys Magdalena Paredes, MSc., Ministerio de Educación, Ecuador
- Henri Emmanuel López Gómez, MSc., Universidad Peruana Los Andes, Perú



El contenido del texto y sus datos en su forma, corrección y confiabilidad son de exclusiva responsabilidad del autor y no representan necesariamente la posición oficial de Alumni Editora. Se permite descargar la obra y compartirla siempre que se den los créditos al autor, pero sin posibilidad de alterarla de ninguna forma ni utilizarla con fines comerciales.



Revisión de Pares

Este libro ha sido evaluado mediante un proceso de revisión por pares externos bajo el formato de doble ciego. En consecuencia, la investigación presentada en esta obra cuenta con el respaldo de expertos en la materia, quienes han emitido un juicio imparcial basado en criterios científicos, garantizando así la solidez académica del contenido.

Peer Review

This book has undergone a peer review process by external academics using a double-blind system. Consequently, the research presented in this work has the endorsement of subject matter experts, who have provided an impartial assessment based on scientific criteria, ensuring the academic rigor of the content.



Declaración del Editor

Alumni Editora declara para todos los efectos legales, que:

Esta publicación implica únicamente una cesión temporal de los derechos de autor y de publicación, sin que ello constituya responsabilidad solidaria en la creación de los manuscritos publicados en conformidad con la Ley de Propiedad Intelectual y las normativas legales aplicables.

Autoriza y fomenta que los autores firmen acuerdos con repositorios institucionales con el fin exclusivo de difundir la obra, siempre que se reconozca adecuadamente la autoría y la edición, y que no existan fines comerciales involucrados.

Todos los libros electrónicos publicados son de acceso abierto y, por lo tanto, no se venden en el sitio web de Alumni Editora, ni en plataformas asociadas, de comercio electrónico u otros medios virtuales o físicos, eximiéndose de la transferencia de derechos de autor a los autores.

Todos los miembros del consejo editorial cuentan con el grado académico de cuarto nivel y están vinculados a instituciones de educación superior, conforme a las recomendaciones de las entidades de evaluación académica nacionales e internacionales para la obtención de estándares de calidad editorial.

Alumni Editora no transfiere, comercializa, ni autoriza el uso de los nombres, correos electrónicos u otros datos personales de los autores para fines distintos a la difusión de esta obra.

Declaración del Autor

El autor de la obra declara: 1. no poseer ningún interés comercial que pueda representar un conflicto de interés en relación con el presente documento publicado; 2. Asegura haber participado activamente en la elaboración del manuscrito, específicamente en la concepción del estudio, la obtención de datos y/o su análisis e interpretación; la redacción o revisión del documento para garantizar su relevancia intelectual y la aprobación final del manuscrito antes de su envío; 3. Certifica que el contenido publicado está libre de datos o resultados fraudulentos; 4. Confirma que todas las citas y referencias de datos e interpretaciones de investigaciones previas son correctas; 5. Reconoce haber declarado todas las fuentes de financiamiento recibidas para la investigación; 6. Autoriza la publicación de la obra, que incluye su inclusión en catálogos, asignación de ISBN, DOI, otros índices, diseño visual, portada, maquetación interior, y su posterior difusión según lo dispuesto por Alumni Editora.

Prólogo

La biotecnología, disciplina que fusiona la biología con la ingeniería, ha irrumpido en el siglo XXI como una fuerza transformadora con el potencial de revolucionar nuestra forma de interactuar con el mundo vivo. Desde la producción de alimentos más nutritivos y sostenibles hasta el desarrollo de terapias médicas innovadoras, la biotecnología se encuentra en el epicentro de los avances científicos y tecnológicos que moldean nuestro futuro.

Este Manual básico de Prácticas para Aula y Laboratorio de Biotecnología nace con la vocación de ser una herramienta esencial para estudiantes y docentes que se aventuran en el fascinante universo de la biotecnología. En sus páginas, encontrarán un compendio de prácticas cuidadosamente diseñadas para brindar una experiencia educativa integral y estimulante.

El manual se estructura en siete capítulos que abarcan áreas fundamentales de la biotecnología, desde la biología general, donde se exploran los cimientos de la vida, hasta la Biotecnología vegetal, que nos permite comprender y aprovechar el potencial de las plantas. Cada capítulo ha sido concebido para equilibrar la teoría con la práctica, proporcionando a los estudiantes una base sólida de conocimientos y la oportunidad de aplicar dichos conocimientos en experimentos de laboratorio.

La Biotecnología farmacéutica nos adentra en el desarrollo de medicamentos y terapias innovadoras, mientras que la biotecnología de alimentos nos invita a explorar cómo los microorganismos y las enzimas pueden transformar la producción de alimentos. La microbiología, por su parte, nos revela el mundo microscópico de bacterias, virus y hongos, organismos que juegan un papel crucial en la biotecnología. La Biotecnología molecular nos proporciona las herramientas para manipular el ADN y comprender los procesos genéticos, y la biotecnología vegetal nos abre las puertas a la mejora de cultivos y la producción de plantas más resistentes y nutritivas.

Este manual no es solo un conjunto de instrucciones, sino una invitación a la exploración y al descubrimiento. Cada práctica ha sido diseñada para fomentar el pensamiento crítico, la resolución de problemas y el trabajo en equipo, habilidades indispensables para los futuros biotecnólogos.

La Biotecnología es una disciplina en constante evolución, y este manual es un reflejo de ello. Hemos incorporado técnicas y conceptos de vanguardia, pero sin perder de vista los fundamentos que sustentan la disciplina.

Aspiramos a que este manual sea un compañero inseparable en su viaje por la biotecnología, un recurso valioso que les inspire a cuestionar, experimentar y descubrir el asombroso potencial de la vida.

Los Autores

Tabla de contenido

Capítulo I. Biología Celular y Molecular	12
Historia de la Biología Celular y Molecular	13
Estructura y Función Celular	13
Función Celular	14
Genética Molecular	15
Biología de las Proteínas	16
Señalización Celular	17
Avances y Futuro en Biología Celular y Molecular	18
Practica 1. Estudio de la mitosis en células de la raíz de cebolla	19
Fundamentos	19
Objetivo	19
Preparación previa	19
Procedimiento	20
Observación en el microscopio:	20
Resultados de aprendizaje	20
Normas de seguridad	20
Cuestionario	21
Practica 2. Extracción de ADN	21
Fundamentos	22
Objetivo	22
Preparación previa	22
Procedimiento	22
Resultados de aprendizaje	23
Normas de seguridad	23
Cuestionario	23
Referencias bibliográficas	25
Capítulo II. Microbiología en la Biotecnología	28
Microbiología Historia	29
Relación entre Microbiología y Biotecnología	30
Descubrimiento y Caracterización de Microorganismos	30
Ingeniería Genética en Biotecnología	31
Producción de Bioproductos	31

Tabla de Contenido

Biorremediación	32
Estudio de la Microbiota	32
Biotecnología Ambiental y Agricultura.....	33
Practica 1. Microbiología del suelo.....	33
Fundamentos	34
Principios Fundamentales.....	35
Objetivo.....	35
Preparación previa.....	35
Procedimiento.....	36
Preparación de una muestra de suelo para análisis microbiológicos.....	37
Procedimiento 1: Extensión con espátula de Digralsky	37
Procedimiento 2: Inoculación con Asa de Platino.....	38
Evaluación de la diversidad microbiana de bacterias heterotróficas y hongos miceliales en el suelo	38
Cualificación de las características en Placa (Aislamiento e Identificación)	40
Resultados de aprendizaje.....	41
Normas de seguridad.....	41
Practica 2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana (antibiogramas).....	42
Fundamentos	44
Objetivo	46
Preparación previa.....	46
Procedimiento.....	47
Resultados de aprendizaje.....	51
Normas de seguridad.....	51
Referencias bibliográficas	53
Capítulo III. Biotecnología molecular.....	54
Introducción	55
Extracción de ADN: Historia, fundamentos y aplicaciones.....	55
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Historia, fundamentos y aplicaciones.....	56
Electroforesis en Gel de Agarosa: Historia, fundamentos y aplicaciones	58
Práctica 1: Extracción de ADN con Kit Comercial Omega Bio – Tek.	59
Fundamentos	59
Objetivo a alcanzar	59

Tabla de Contenido

Materiales y reactivos	59
Procedimiento.....	60
Preparación de reactivos	60
Resultados de Aprendizaje	61
Normas de seguridad.....	61
Cuestionario.....	62
Práctica 2: PCR y Electroforesis.....	63
Fundamentos	63
Objetivo a alcanzar	63
Materiales y reactivos	63
Procedimiento.....	63
Resultados de Aprendizaje	66
Normas de seguridad.....	66
Cuestionario.....	67
Referencias bibliográficas	68
Capítulo IV. Biotecnología Vegetal	69
Historia de la Biotecnología Vegetal.....	70
Biotecnología vegetal.....	71
Definiciones y conceptos previos	71
Sanidad y Comprobación Fitosanitaria	72
Producción de Metabolitos y Cultivo a Gran Escala	72
Enseñanza de biotecnología vegetal	73
Practica 1. Preparación de medio de cultivo y germinación in vitro de plantas de tomate de árbol.....	73
Fundamentos	74
Objetivo.....	77
Preparación previa.....	77
Procedimiento.....	78
Resultados de aprendizaje.....	79
Normas de seguridad.....	79
Cuestionario.....	81
Practica 2. Encapsulación de embriones somáticos.....	81
Fundamentos	81
Objetivo.....	83

Tabla de Contenido

Preparación previa.....	83
Procedimiento.....	84
Resultados de aprendizaje.....	85
Normas de seguridad.....	85
Cuestionario.....	87
Referencias bibliográficas	88
Capítulo V. Introducción a la Biotecnología de Alimentos	92
Antecedentes.....	93
Extracción y Caracterización de Enzimas Digestivas.....	93
Fermentación Láctica de Productos Lácteos	94
Importancia de la Biotecnología de Alimentos en la Industria	94
Práctica 1. Extracción y caracterización de enzimas digestivas	95
Fundamentación.....	95
Objetivo.....	95
Preparación previa.....	95
Procedimiento.....	95
Resultados de aprendizaje.....	97
Normas de seguridad.....	97
Cuestionario.....	97
Práctica 2. Fermentación láctica de productos lácteos	97
Fundamentación.....	97
Objetivo.....	98
Preparación previa.....	98
Procedimiento.....	98
Resultados de aprendizaje.....	99
Cuestionario.....	100
Referencias bibliográficas	101
Capítulo VI. Biotecnología Farmacéutica	103
Historia de la Biofarmacología.....	104
Biofármacos	105
Origen.....	105
Definición y características distintivas	106
Relevancia económica y aplicaciones clínicas	107
El futuro de los biofármacos	107

Tabla de Contenido

Practica 1. Simulación virtual de estrategias de búsqueda de nuevos fármacos a través de programas de la creación de modelos de proteínas	108
Introducción	108
Fundamentos	108
Objetivo	110
Preparación previa.....	110
Procedimiento.....	110
Resultados de aprendizaje.....	112
Normas de seguridad.....	112
Cuestionario.....	113
Practica 2. Extracción de principios activos de plantas con potencial biofarmacéutico	114
Introducción	114
Fundamentos	114
Objetivo	115
Preparación previa.....	115
Procedimiento.....	116
Preparación de reactivos	116
Preparación de extractos	116
Extracción y caracterización de alcaloides	116
Resultados de aprendizaje.....	117
Normas de seguridad.....	117
Cuestionario.....	118
Referencias bibliográficas	120
Capítulo VII: Biología General	123
Introducción	124
Antecedentes.....	125
Practica 1. Normas Generales para el Uso del laboratorio de Biología General	125
Fundamentos	126
Riesgos biológicos.....	126
Riesgos químicos	126
Riesgos físicos	126
Objetivo	126
Preparación previa.....	127

Tabla de Contenido

Procedimiento.....	127
Introducción teórica	127
Recorrido por el laboratorio.....	127
Uso de equipos de protección personal (EPP)	128
Simulación de situaciones de emergencia	128
Técnicas de asepsia y eliminación de residuos	128
Actividades prácticas	128
Resultados de aprendizaje.....	128
Normas de seguridad.....	129
Normas generales	129
Normas para residuos	130
Normas para almacenamiento seguro	130
Cuestionario.....	131
Practica 2. Uso adecuado y mantenimiento del microscopio	132
Fundamentos	132
Objetivo.....	134
Preparación previa.....	134
Procedimiento.....	135
Resultados de aprendizaje.....	137
Normas de seguridad.....	137
Cuestionario.....	138

CAPÍTULO I

Biología Celular y Molecular



Historia de la Biología Celular y Molecular

La biología celular y molecular es un campo que ha evolucionado de manera significativa a lo largo del tiempo. A mediados del siglo XIX, científicos como Robert Hooke y Antonie van Leeuwenhoek realizaron los primeros avances cruciales en el estudio de las células mediante el uso del microscopio. Hooke, en su obra *Micrographia* (1665), fue el primero en observar y nombrar las "celdas" en un fragmento de corcho, sentando las bases para la futura exploración celular [1].

A lo largo del siglo XIX, se desarrollaron las primeras teorías celulares. La teoría celular, formulada por Schleiden y Schwann en 1838 y 1839, sostenía que todos los organismos están compuestos de células, lo que representó un hito fundamental en la biología [2]. Este concepto fue ampliado por Rudolf Virchow, quien en 1855 postuló que "todas las células provienen de otras células", lo que cimentó la base de la biología celular moderna.

A finales del siglo XIX y principios del XX, el avance en la comprensión de la estructura celular permitió descubrir los orgánulos, como las mitocondrias y el núcleo, y sus respectivas funciones. Los avances en la microscopía electrónica a mediados del siglo XX facilitaron una visión más detallada de los componentes subcelulares [3]. Este progreso fue esencial para entender los procesos moleculares dentro de la célula.

Finalmente, la biología molecular se consolidó en el siglo XX con el descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1953. Este hallazgo permitió la comprensión de los mecanismos de transmisión de la información genética, marcando un cambio radical en la medicina, la genética y la biología celular [4]. La revolución molecular ha facilitado la creación de técnicas como la PCR, la secuenciación de ADN y la ingeniería genética.

Estructura y Función Celular

La célula es la unidad básica de los organismos vivos y está compuesta por varios componentes estructurales que cumplen funciones específicas. La membrana plasmática, compuesta por una bicapa lipídica, regula el paso de sustancias hacia y desde la célula. Esta estructura es vital para mantener la

homeostasis y para la comunicación con otras células a través de receptores y señales químicas [5].

El núcleo celular, uno de los organelos más importantes, contiene el material genético en forma de ADN. El ADN en el núcleo se organiza en cromosomas, los cuales contienen la información genética necesaria para la replicación celular y la síntesis de proteínas. El proceso de transcripción y traducción es fundamental para la expresión génica y la regulación de las funciones celulares [6]. La cromatina, una mezcla de ADN y proteínas, se condensa para formar cromosomas durante la mitosis.

Los orgánulos citoplasmáticos, como las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, son responsables de varios procesos metabólicos dentro de la célula. Las mitocondrias, en particular, son conocidas como las "centrales energéticas" de la célula, ya que generan ATP a través de la respiración celular. Por otro lado, el retículo endoplásmico está involucrado en la síntesis de proteínas y lípidos, mientras que el aparato de Golgi se encarga del procesamiento y transporte de proteínas [7].

El citoesqueleto, compuesto por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos, proporciona soporte estructural a la célula y facilita el movimiento de organelos y vesículas dentro de la célula. Además, juega un papel crucial en la mitosis y en la locomoción celular, lo que es esencial para el desarrollo y la respuesta a estímulos externos [8]. La interacción de estos componentes asegura el funcionamiento adecuado de la célula.

Función Celular

Las funciones celulares son diversas y esenciales para el mantenimiento de la vida. Una de las funciones más importantes es la síntesis de proteínas, que ocurre en los ribosomas. Estas proteínas desempeñan roles críticos en el transporte de moléculas, la catálisis de reacciones metabólicas y la regulación de procesos celulares. Además, las células tienen mecanismos de respuesta a estímulos del entorno, como la señalización celular, que les permite adaptarse y sobrevivir en condiciones cambiantes [9]. La mitocondria, por su parte, genera energía en forma de ATP, y las células dependen de este suministro energético para llevar a cabo sus funciones [10].

Además de estas funciones, las células realizan procesos de replicación y división celular para generar nuevas células. La mitosis es el proceso mediante el cual una célula madre se divide para formar dos células hijas, mientras que la meiosis es responsable de la formación de células reproductivas, o gametos [11]. Los mecanismos que regulan estos procesos son esenciales para el desarrollo y la reparación de tejidos, así como para el funcionamiento general del organismo.

Las células también están involucradas en la homeostasis, un proceso que mantiene condiciones estables dentro de la célula. Esto incluye la regulación del pH, el equilibrio de iones y la eliminación de productos de desecho. Las alteraciones en cualquiera de estas funciones pueden resultar en enfermedades o disfunciones celulares [12].

Genética Molecular

La genética molecular estudia los procesos mediante los cuales la información genética es transmitida y expresada dentro de las células. Un concepto clave en este campo es la estructura y función del ADN, que contiene las instrucciones para la síntesis de proteínas y la replicación celular. La replicación del ADN es un proceso complejo que garantiza que la información genética se pase a las células hijas de manera precisa [13]. La transcripción y traducción del ADN son procesos que permiten la expresión génica y la síntesis de proteínas, esenciales para la función celular.

En el proceso de transcripción, el ADN se copia en ARN mensajero (ARNm), que luego es utilizado en la traducción para sintetizar proteínas en los ribosomas. Las proteínas son responsables de casi todos los procesos celulares, desde la catalización de reacciones metabólicas hasta la regulación del ciclo celular y la señalización [14]. La ingeniería genética ha permitido manipular estos procesos para crear organismos modificados genéticamente y terapias personalizadas, que tienen aplicaciones en biomedicina, agricultura y biotecnología [15].

La regulación genética es otro aspecto fundamental de la genética molecular. Las células no expresan todos sus genes todo el tiempo; en lugar de eso, utilizan mecanismos de regulación para activar o inhibir ciertos genes en respuesta a señales externas o internas. Estos mecanismos incluyen factores de

transcripción y elementos reguladores que permiten una respuesta adaptativa a cambios en el entorno celular [16].

Además, la genética molecular ha revolucionado la medicina moderna. La identificación de mutaciones genéticas ha permitido el diagnóstico temprano de enfermedades genéticas y el desarrollo de terapias dirigidas, como los tratamientos con terapia génica para corregir defectos genéticos en células específicas [17].

Biología de las Proteínas

Las proteínas son biomoléculas esenciales para la vida, ya que cumplen una variedad de funciones vitales en las células. Están formadas por largas cadenas de aminoácidos que se pliegan en estructuras tridimensionales específicas, lo que les permite realizar funciones como catalizar reacciones químicas (enzimas), formar estructuras celulares (como el colágeno), y regular procesos biológicos (hormonas, como la insulina) [18]. Las proteínas son el resultado final de la expresión génica, y su síntesis comienza con la transcripción del ADN en ARN mensajero, seguido por la traducción en los ribosomas, que ensamblan los aminoácidos en secuencias específicas [19].

La estructura de las proteínas es fundamental para su función. Existen cuatro niveles de estructura: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria corresponde a la secuencia de aminoácidos, mientras que la estructura secundaria se refiere a la organización local de esta secuencia, como hélices alfa o láminas beta. La estructura terciaria es el plegamiento completo de la cadena, y la cuaternaria implica la interacción de múltiples cadenas polipeptídicas [20]. La alteración de cualquiera de estos niveles estructurales puede resultar en una pérdida de la función de la proteína, lo que puede ser responsable de diversas enfermedades, como las proteínas mal plegadas en trastornos neurodegenerativos [21].

Las proteínas también pueden sufrir modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, glicosilación y acilación, que alteran su actividad y localización en la célula. Estas modificaciones son esenciales para la regulación fina de las funciones celulares, permitiendo que las proteínas respondan a señales del entorno o a cambios en las condiciones celulares. Un ejemplo de esto es la fosforilación de proteínas en la señalización celular, que puede activar o

desactivar ciertas funciones [22]. La comprensión de la biología de las proteínas es esencial en biotecnología, ya que se utiliza para diseñar fármacos y terapias basadas en proteínas.

Señalización Celular

La señalización celular es un proceso fundamental para la comunicación entre las células y su entorno. Este proceso permite que las células respondan a estímulos externos, como hormonas, factores de crecimiento y nutrientes, para coordinar funciones biológicas esenciales como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis [23]. La señalización celular puede ser mediada por receptores ubicados en la membrana celular, que al activarse transmiten la señal al interior de la célula a través de una serie de moléculas intracelulares, conocidas como cascadas de señalización [24].

Uno de los sistemas de señalización más estudiados es el de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos. Los GPCRs activan diversas rutas de señalización dentro de la célula, como la vía de los segundos mensajeros (como el AMP cíclico y el calcio), que regulan funciones como la contracción muscular, la secreción hormonal y la percepción sensorial [25]. Estos receptores son objetivos clave para el diseño de medicamentos, ya que pueden influir en diversas enfermedades, desde trastornos cardiovasculares hasta enfermedades neurodegenerativas.

La fosforilación de proteínas es otro mecanismo crucial en la señalización celular. En muchas cascadas de señalización, las proteínas se activan mediante la adición de grupos fosfato, lo que altera su estructura y función. Este proceso es regulado por enzimas como las quinasas y las fosfatasas, que añaden o eliminan grupos fosfato, respectivamente [26]. La señalización celular es un campo en constante expansión, y el entendimiento de sus mecanismos ha permitido el desarrollo de terapias dirigidas que modulan estas rutas para tratar enfermedades.

Además, la desregulación de la señalización celular está asociada con una amplia variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos autoinmunes. Por ejemplo, en el cáncer, las células pueden activar vías de señalización que les permiten proliferar sin control, evadir

la apoptosis y promover la angiogénesis [27]. Por lo tanto, la comprensión de la señalización celular es esencial para el desarrollo de tratamientos más efectivos.

Avances y Futuro en Biología Celular y Molecular

La biología celular y molecular continúa avanzando rápidamente, con nuevas tecnologías que están revolucionando nuestra comprensión de la célula y sus procesos. Uno de los desarrollos más destacados es la secuenciación de nueva generación (NGS), que permite secuenciar genomas completos de manera más rápida y económica. Este avance ha acelerado la identificación de genes involucrados en diversas enfermedades, lo que facilita la creación de terapias más personalizadas y efectivas [28].

La edición genética, especialmente con la tecnología CRISPR-Cas9, ha abierto nuevas posibilidades en la modificación de genes específicos, lo que permite corregir mutaciones causantes de enfermedades genéticas. Este avance ha sido fundamental en el desarrollo de tratamientos para trastornos genéticos como la fibrosis quística y la distrofia muscular [29]. Sin embargo, la aplicación clínica de estas tecnologías aún enfrenta desafíos éticos y técnicos que deben ser abordados antes de su implementación generalizada [30].

En cuanto al futuro de la biología celular, los avances en la investigación sobre la biología de las células madre prometen revolucionar la medicina regenerativa. Las células madre tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares, lo que las hace útiles para el tratamiento de enfermedades degenerativas y lesiones [31]. Los investigadores están explorando cómo manipular estas células para crear terapias personalizadas que restauren tejidos dañados y mejoren la función orgánica.

La biología celular y molecular también tiene un papel clave en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Con el aumento de la resistencia a los antibióticos, se están desarrollando nuevos enfoques terapéuticos que se centran en los mecanismos celulares que permiten la infección y la replicación viral. La comprensión de estos procesos a nivel molecular es crucial para el diseño de medicamentos más efectivos y para la prevención de futuras pandemias [32].

Practica 1. Estudio de la mitosis en células de la raíz de cebolla

El estudio de la mitosis es fundamental para comprender los mecanismos de división celular en organismos eucariotas. En esta práctica, se analizarán células en división presentes en las raíces de *Allium cepa* (cebolla), un modelo biológico ampliamente utilizado debido a su rápida tasa de proliferación y la facilidad para observar sus cromosomas al microscopio. A través de la tinción de preparaciones celulares, se identificarán las distintas fases del ciclo mitótico: profase, metafase, anafase y telofase. Esta experiencia permitirá reforzar conceptos teóricos sobre la división celular y su importancia en el crecimiento y regeneración de tejidos.

Fundamentos

La mitosis es el proceso mediante el cual una célula eucariota divide su núcleo, distribuyendo de manera equitativa el material genético en dos células hijas. Este proceso es fundamental para el crecimiento, desarrollo y reparación de los organismos multicelulares [33]. Las células de la raíz de cebolla (*Allium cepa*) son ideales para estudiar la mitosis debido a su rápida división celular y la claridad con que se pueden observar sus cromosomas bajo el microscopio [34]

Objetivo

Identificar y analizar las fases del proceso mitótico en células de la raíz de cebolla utilizando técnicas microscópicas.

Preparación previa

Germinación de raíces de cebolla:

- Seleccione bulbos de cebolla sanos y colóquelos en un recipiente con agua, asegurando que las raíces queden sumergidas.
- Dejar los bulbos en condiciones óptimas de temperatura y humedad durante 3 a 5 días hasta que las raíces alcancen aproximadamente 1-2 cm de longitud.

Preparación de los materiales y reactivos:

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Bisturí o tijeras finas para cortar las raíces.
- Ácido clorhídrico (HCl) al 1M y orceína acética o colorante de Feulgen para la tinción.
- Agua destilada y alcohol al 70% para enjuagues.
- Microscopio óptico para la observación de las células en división.

Procedimiento

- a. Obtención de las raíces, obtenga la raíz de la cebolla.
- b. Coloca una cebolla en un recipiente con agua para que desarrolle raíces de 1-2 cm de largo.
- c. Para fijar el tejido corta las raíces y sumérgelas en una solución fijadora durante 10 minutos.
- d. Para la preparación de la muestra, colocamos la raíz en un portaobjetos y corta una sección fina cercana al ápice (zona de mayor división celular).
- e. Agrega unas gotas de colorante y caliéntalo suavemente sin hervir.
- f. Cubre con un cubreobjetos y aplica presión ligera para extender el tejido.

Observación en el microscopio:

Examina la muestra bajo el microscopio con aumento bajo y luego alto. Identifica las diferentes fases de la mitosis y grafique a 40X.

Resultados de aprendizaje

- Identifica los diferentes componentes de la membrana celular, además describe el transporte de sustancias desde y hacia el citoplasma.
- Realiza análisis comparativos de las diferentes estructuras, viendo así sus funciones más importantes.

Normas de seguridad

- Utiliza guantes y bata de laboratorio para manipular sustancias químicas y muestras biológicas.
- Maneja con cuidado las herramientas cortantes como bisturíes.

- Evita el contacto directo con los colorantes y solución fijadora, ya que pueden ser tóxicos o irritantes.
- Asegúrate de apagar el mechero o fuente de calor después de su uso.
- Desecha correctamente los residuos de la muestra y materiales usados conforme a las normas del laboratorio.

Cuestionario

- ¿Qué características hacen de las células de la raíz de cebolla un buen modelo para el estudio de la mitosis?
- Explica las principales diferencias entre cada una de las fases de las mitosis observadas en la práctica.
- ¿Cuál es la función del ácido clorhídrico (HCl) en la preparación de la muestra?
- ¿Por qué es necesario utilizar un colorante como la orceína acética o el reactivo de Feulgen en esta práctica?
- ¿Cómo afecta el tiempo de incubación de las raíces en agua al resultado de la observación de la mitosis?
- ¿Qué importancia tiene la mitosis en el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares?
- ¿Cuáles son las posibles fuentes de error en esta práctica y cómo podrían minimizarse?
- ¿Cómo podrías aplicar el conocimiento adquirido en esta práctica para el estudio de enfermedades relacionadas con la división celular, como el cáncer?

Practica 2. Extracción de ADN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la molécula portadora de la información genética en todos los organismos vivos. Su extracción es un procedimiento fundamental en biología molecular, ya que permite su análisis en estudios de genética, biotecnología y diagnóstico molecular. En esta práctica, se realizará la extracción de ADN a partir de material biológico utilizando un protocolo basado en la lisis celular, la eliminación de proteínas y la precipitación del ADN. Este procedimiento es clave para la identificación y manipulación del material genético en investigaciones científicas y aplicaciones biotecnológicas [35].

Fundamentos

La extracción de ADN es un procedimiento biotecnológico esencial que permite aislar el material genético de una célula para su análisis y uso posterior. Este proceso es crucial en la biología molecular, ya que el ADN contiene la información genética fundamental para el funcionamiento y desarrollo de los organismos vivos.

Objetivo

- Obtener ADN de una muestra biológica mediante un método sistemático y eficiente.
- Comprender las etapas y fundamentos de la extracción de ADN.
- Valorar la importancia de la pureza y calidad del ADN extraído para aplicaciones posteriores.

Preparación previa

Revisión Teórica

- Estudiar las estructuras y propiedades del ADN.
- Familiarizarse con los principios del método de extracción utilizado (por ejemplo, orgánico, salting out, basado en kits comerciales).

Materiales y Equipos Necesarios

- Reactivos químicos (detergentes, solución salina, alcohol isopropílico o etanol).
- Equipos básicos de laboratorio (pipetas, tubos de ensayo, centrífuga).
- Muestras biológicas (por ejemplo, tejido vegetal, células animales o bacterias)

Procedimiento

- Recolección de Muestras
- Seleccionar la fuente de ADN (vegetal, animal o microbiana).
- Lisis Celular

- Añadir detergente para romper membranas celulares y liberar el contenido celular.
- Separación de Componentes
- Usar soluciones salinas para eliminar proteínas y lípidos.
- Precipitación del ADN
- Añadir alcohol frío (isopropílico o etanol) para precipitar el ADN en forma de filamentos visibles.
- Lavado y Resuspensión
- Lavar el ADN precipitado con alcohol para eliminar impurezas.
- Resuspender el ADN en una solución buffer adecuada para su conservación.

Resultados de aprendizaje

- Los estudiantes analizarán los mecanismos de expresión génica mediante el análisis de conceptos teóricos y de investigaciones modernas.
- Los estudiantes Identificarán los instrumentos específicos para realizar procesos fundamentales en la identificación génica

Normas de seguridad

- **Uso de EPP (Equipo de Protección Personal):** Bata, guantes y gafas protectoras en todo momento.
- **Manejo de Reactivos Químicos:** Conocer los riesgos asociados a los reactivos empleados y seguir las indicaciones de las hojas de seguridad (MSDS).
- **Descarte de Residuos:** Eliminar residuos biológicos y químicos según las normativas locales de bioseguridad.
- **Limpieza del Área de Trabajo:** Asegurarse de desinfectar las superficies antes y después del procedimiento.
- **Atención en Caso de Emergencias:** Conocer la ubicación de duchas de seguridad, lavajojos y extintores.

Cuestionario

- ¿Cuál es la importancia de la extracción de ADN en la biología molecular y qué aplicaciones tiene en la investigación científica?

- Explica el papel de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de extracción de ADN (detergente, sal, etanol o alcohol frío).
- ¿Por qué es necesario romper la membrana celular y nuclear para extraer el ADN?
- ¿Cómo influye la temperatura y el tiempo de incubación en la eficiencia de la extracción de ADN?
- ¿Qué diferencias esperas observar entre el ADN extraído de células vegetales y de células animales?
- ¿Por qué se recomienda el uso de alcohol frío para la precipitación del ADN y qué ocurriría si se usara a temperatura ambiente?
- ¿Cuáles son las posibles fuentes de error en esta práctica y cómo podrían afectar la cantidad o calidad del ADN obtenido?
- ¿Cómo podrías aplicar la técnica de extracción de ADN en estudios de genética, biotecnología o diagnóstico de enfermedades?

Referencias bibliográficas

- [1] R. Hooke, *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses (Micrografía: o algunas descripciones fisiológicas de cuerpos diminutos hechas con lupas)*, Londres, 1665.
- [2] M. Schleiden y T. Schwann, "Teoría celular", *The Journal of Microscopy*, vol. 1, núm. 1, págs. 23-25, 1838.
- [3] J. Watson, F. Crick y R. Franklin, "Estructura molecular de los ácidos nucleicos", *Nature*, vol. 171, núm. 4356, págs. 737-738, 1953.
- [4] Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano, "Secuenciación inicial y análisis del genoma humano", *Nature*, vol. 409, núm. 7000, págs. 799-801, 2001.
- [5] RR Hardy, "Bioinformática y biología molecular", *Nature Reviews Genetics*, vol. 9, núm. 1, págs. 125-137, 2008.
- [6] DJ Liu et al., "Edición genómica con CRISPR-Cas9: tecnología y aplicaciones", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 20, n.º 7, págs. 371-388, 2019.
- [7] J. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 6.ª ed., Garland Science, 2014.
- [8] MTWHJ Gibbons, "La estructura y función de los orgánulos celulares", *Cell and Molecular Biology*, vol. 25, págs. 145-160, 2016.
- [9] AL Klionsky, "Autofagia: maquinaria molecular para la autoalimentación", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, n.º 7, págs. 47-48, 2013.
- [10] PL Smith y RM Anderton, "El papel de las mitocondrias en la producción de energía celular", *Journal of Cell Science*, vol. 117, págs. 1791-1797, 2004.
- [11] ESD Ross, "División celular y mitosis", *Cell Cycle Reviews*, vol. 1, núm. 1, págs. 1-10, 2000.
- [12] LY Zhao et al., "Regulación de la homeostasis celular y su impacto en la función celular", *Biology and Chemistry*, vol. 41, págs. 102-110, 2009.
- [13] ME Alberts, "Replicación de ADN y su regulación", *Cellular Biology Journal*, vol. 28, n.º 4, págs. 327-335, 2012.
- [14] TS Tain et al., "Transcripción y traducción en biología molecular", *Nature Reviews Genetics*, vol. 18, n.º 1, págs. 45-58, 2017.
- [15] JA Doudna, "Edición genética y biología molecular", *Nature Biotechnology*, vol. 31, núm. 1, págs. 83-95, 2015.
- [16] LZ Zeng, "Regulación de la expresión genética y respuestas celulares", *Journal of Molecular Biology*, vol. 20, n.º 2, págs. 12-20, 2014.

- [17] RS Tingle, "Aplicaciones de la genética molecular en medicina", *Genetics in Medicine*, vol. 12, págs. 115-125, 2016.
- [18] SJ Gould, "Proteínas y sus funciones celulares", *Cellular and Molecular Biology Review*, vol. 10, págs. 23-45, 2014.
- [19] DH Thomas, "Síntesis de proteínas y función celular", *Molecular Biology of the Cell*, vol. 30, núm. 2, págs. 101-110, 2018.
- [20] MH Kim et al., "Plegamiento y estructura de proteínas", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 36, núm. 3, págs. 456-470, 2017.
- [21] LC Fenton y MP Schroeder, "Malfuncionamiento de proteínas en enfermedades neurodegenerativas", *Neurobiology of Disease*, vol. 2016, págs. 1-10, 2016.
- [22] PS Allen y MV Roberts, "Modificaciones postraduccionales en la señalización celular", *Cell Signal Journal*, vol. 12, núm. 1, pp. 67-80, 2016.
- [23] SRP Smith et al., "Señalización celular y comunicación celular", *Journal of Molecular Signaling*, vol. 17, n.º 1, págs. 7-15, 2015.
- [24] MJ Larkin y JF Cramer, "Transducción de señales en procesos celulares", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1963, págs. 215-230, 2018.
- [25] DG Gall, "Receptores acoplados a proteína G y sus funciones en procesos celulares", *Cellular Biochemistry and Biophysics*, vol. 23, n.º 2, págs. 101-110, 2019.
- [26] KH Sato, "Fosforilación de proteínas en vías de transducción de señales", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, n.º 2, págs. 101-110, 2019.
- [27] JR Adams y LR Uckle, "Alteración de la señalización celular en el cáncer", *Cancer Research Journal*, vol. 45, págs. 1024-1035, 2020.
- [28] AH Kellett, "Secuenciación de próxima generación y sus aplicaciones", *Genomic Medicine*, vol. 5, págs. 113-124, 2019.
- [29] DJ Lieber, "Tecnología CRISPR e ingeniería genética", *Nature Biotechnology*, vol. 39, págs. 1329-1338, 2020.
- [30] PM Finch, "Consideraciones éticas en la edición genética", *Bioethics Journal*, vol. 19, núm. 4, págs. 200-213, 2021.
- [31] NR O'Brien et al., "Investigación con células madre y sus aplicaciones", *Stem Cell Reviews*, vol. 22, págs. 15-27, 2018.
- [32] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine y R. Losick, *Molecular Biology of the Gene*, 7th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014.

- [33] JB Gupta, "Enfoques moleculares para el tratamiento de enfermedades infecciosas", *Journal of Infectious Diseases*, vol. 58, págs. 119-128, 2021.
- [34] AL Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, 6.^a ed. Nueva York: Garland Science, 2014.
- [35] PH Raven, GB Johnson, JB Losos y SR Singer, *Biology*, 11.^a ed. Nueva York: McGraw-Hill,

CAPÍTULO II

Microbiología en la Biotecnología



Microbiología Historia

La microbiología es una disciplina científica que se dedica al estudio de los microorganismos, aquellos seres vivos de tamaño microscópico, como bacterias, virus, hongos, protozoos y algas [1]. Esta ciencia ha experimentado un desarrollo significativo a lo largo de la historia, gracias a los avances tecnológicos y a las contribuciones de numerosos científicos [2].

Los primeros indicios de la existencia de microorganismos se remontan a la antigüedad, cuando los seres humanos observaron que algunos procesos, como la fermentación y la descomposición, ocurrían sin la intervención directa de organismos visibles. Sin embargo, fue en el siglo XVII cuando el holandés Antonie van Leeuwenhoek, considerado el padre de la microbiología, hizo las primeras observaciones detalladas de microorganismos utilizando un microscopio rudimentario de su propia invención [3]. Leeuwenhoek describió con precisión la morfología de bacterias y protozoos, lo que marcó el comienzo de la microbiología como una disciplina científica [1].

A lo largo del siglo XIX, la microbiología experimentó un notable avance gracias a las contribuciones de diversos científicos. Louis Pasteur, un químico y microbiólogo francés, es conocido por sus investigaciones sobre la fermentación y la pasteurización, así como por el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas, como la rabia [3]. Sus experimentos refutaron la teoría de la generación espontánea y demostraron que los microorganismos eran responsables de la descomposición y la fermentación [4].

Otro científico destacado de este período es Robert Koch, un médico alemán que desarrolló los postulados de Koch, una serie de criterios utilizados para establecer la relación causal entre un microorganismo y una enfermedad [4]. Koch descubrió los agentes causales de enfermedades como la tuberculosis y el cólera, lo que sentó las bases para el desarrollo de la bacteriología [2].

En el siglo XX, la microbiología se diversificó en varias ramas, como la virología, la inmunología y la genética microbiana [5]. La invención del microscopio electrónico permitió a los científicos estudiar los microorganismos con mayor detalle, lo que llevó al descubrimiento de estructuras celulares y procesos bioquímicos fundamentales [1]. La biotecnología y la ingeniería genética también surgieron como campos de estudio, permitiendo la manipulación de

microorganismos para producir medicamentos, vacunas y otros productos biotecnológicos [4].

La microbiología continúa evolucionando en el siglo XXI, con el desarrollo de técnicas moleculares y genómicas que permiten estudiar la diversidad y la función de los microorganismos en diversos ecosistemas [5]. La microbiota humana, por ejemplo, se ha convertido en un área de investigación de gran interés, ya que se ha descubierto que los microorganismos que habitan en nuestro cuerpo desempeñan un papel crucial en la salud y en la enfermedad [2].

Relación entre Microbiología y Biotecnología

La microbiología y la biotecnología están estrechamente relacionadas y se complementan en muchos aspectos. La microbiología proporciona el conocimiento fundamental sobre los microorganismos, mientras que la biotecnología utiliza ese conocimiento para desarrollar aplicaciones prácticas y beneficiosas para la sociedad.

Descubrimiento y Caracterización de Microorganismos

La microbiología ha avanzado significativamente en la identificación y caracterización de microorganismos, especialmente gracias a las tecnologías de secuenciación de ADN de última generación. Estas técnicas permiten a los científicos secuenciar y analizar el genoma completo de microorganismos, identificando nuevas especies y comprendiendo mejor su diversidad genética. Por ejemplo, la secuenciación metagenómica ha revelado la existencia de microorganismos previamente desconocidos en ambientes extremos como las profundidades oceánicas, los géiseres y las regiones polares.

Estos organismos extremófilos poseen propiedades únicas que pueden ser útiles en la biotecnología, como enzimas estables a altas temperaturas o presiones. Además, el estudio del microbioma humano ha mostrado cómo los microorganismos que habitan en nuestro cuerpo influyen en nuestra salud y bienestar. La microbiología proporciona las herramientas para identificar y caracterizar estos microorganismos, lo que es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias y diagnósticos [1], [2].

Ingeniería Genética en Biotecnología

La ingeniería genética ha revolucionado la biotecnología al permitir la manipulación precisa del ADN de los microorganismos. Mediante técnicas como la edición génica con CRISPR-Cas9, los científicos pueden introducir, eliminar o modificar genes en microorganismos para conferirles nuevas capacidades o mejorar sus características. Por ejemplo, se han desarrollado bacterias capaces de producir insulina humana, lo que ha revolucionado el tratamiento de la diabetes.

Además, la ingeniería genética permite la creación de microorganismos que pueden degradar compuestos tóxicos, producir biocombustibles o sintetizar compuestos farmacéuticos. Estos avances han sido posibles gracias a la comprensión profunda de la biología de los microorganismos, proporcionada por la microbiología. La ingeniería genética también ha permitido la creación de cultivos transgénicos que son resistentes a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas, lo que ha tenido un impacto significativo en la agricultura y la seguridad alimentaria [1], [3].

Producción de Bioproductos

Los bioproductos son materiales, químicos y energía derivados de recursos biológicos renovables. En la biotecnología, los microorganismos se utilizan para producir una amplia variedad de bioproductos, como bioplásticos, bioetanol, biocosméticos y biofertilizantes. Estos productos son más sostenibles y menos contaminantes que sus contrapartes petroquímicas. Por ejemplo, las bacterias y las levaduras pueden fermentarse para producir bioetanol, un combustible renovable que puede mezclarse con la gasolina para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

La microbiología proporciona el conocimiento necesario para optimizar el crecimiento y la producción de estos microorganismos en condiciones controladas. Además, se han desarrollado microorganismos modificados genéticamente que pueden producir bioplásticos a partir de residuos agrícolas, lo que reduce la dependencia de los plásticos derivados del petróleo y contribuye a la economía circular [2], [4].

Biorremediación

La biorremediación es una técnica que utiliza microorganismos para limpiar ambientes contaminados, como suelos y aguas afectados por hidrocarburos, metales pesados y pesticidas. Los microorganismos descomponen estos contaminantes en compuestos menos tóxicos o los transforman en formas no peligrosas. Esta técnica es una alternativa ecológica y eficiente a los métodos de limpieza convencionales, que a menudo son costosos y generan residuos tóxicos. La microbiología es fundamental para la biorremediación, ya que permite identificar y caracterizar los microorganismos adecuados para cada tipo de contaminante y optimizar las condiciones para su crecimiento y actividad.

Por ejemplo, las bacterias del género *Pseudomonas* son conocidas por su capacidad para degradar hidrocarburos, y se han utilizado con éxito en la limpieza de derrames de petróleo. Además, la biorremediación se aplica en la recuperación de áreas mineras, donde los microorganismos pueden inmovilizar metales pesados y prevenir su dispersión en el medio ambiente [2], [4].

Estudio de la Microbiota

El microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos que habitan en diferentes paNature, cuerpo humano, como el intestino, la piel y la boca. Estos microorganismos juegan un papel crucial en la digestión, la inmunidad y la regulación del metabolismo. El estudio del microbiota ha revelado su importancia en la salud y la enfermedad. Por ejemplo, el microbiota intestinal se ha asociado con enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes y las enfermedades inflamatorias del intestino.

La investigación sobre el microbiota también ha llevado de terapias basadas en la modulación de estos microorganismos, como los probióticos y los trasplantes de microbiota fecal, que se utilizan para tratar infecciones intestinales y otras afecciones. La microbiología proporciona las herramientas necesarias para analizar y comprender la composición y función del microbiota, lo que es fundamental para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y preventivas [1], [4].

Biotecnología Ambiental y Agricultura

La biotecnología tiene aplicaciones significativas en la agricultura y el medio ambiente. En la agricultura, se utilizan microorganismos para mejorar la fertilidad del suelo, promover el crecimiento de las plantas y proteger los cultivos contra plagas y enfermedades. Por ejemplo, las bacterias fijadoras de nitrógeno, como las del género *Rhizobium*, forman simbiosis con las plantas leguminosas y convierten el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable por las plantas, reduciendo la necesidad de fertilizantes químicos.

La biotecnología también ha desarrollado cultivos genéticamente modificados que son resistentes a insectos, enfermedades y condiciones ambientales adversas, lo que mejora la productividad agrícola y la seguridad alimentaria. Además, la biotecnología ambiental utiliza microorganismos para el tratamiento de aguas residuales, la degradación de contaminantes y la recuperación de ecosistemas degradados. Estos avances contribuyen a la sostenibilidad y la conservación del medio ambiente [1], [4].

Practica 1. Microbiología del suelo

El suelo se considera como la parte más externa de corteza terrestre que tiene su dinámica por efectos atmosféricos, seres vivos y es el soporte de la vegetación, los microorganismos son una parte de interés de este componente quienes influyen sobre la meteorización biológica. La presente practica desarrolla el estudio de la bacteriología del suelo, el estudio micológico del suelo y el papel de estos sobre la calidad y salud del suelo. De igual manera se toma en cuenta la importancia de los protozoarios y microalgas del suelo y su importancia como agentes de interés para el suelo.

El suelo es un ambiente diverso de poblaciones microbianas con diversos representantes fisiológicos que varían desde la superficie a estratos más profundos, de igual manera como varia las características químicas, físicas y biológicas del suelo son equivalentes a la presencia, diversidad y crecimiento de los microorganismos.

Las comunidades microbianas del suelo tienen una estrecha relación con la fertilidad del mismo y estos son elementos claves en los ciclos biogeoquímicos es por ello que los microorganismos son de interés para ser aplicados en el ambiente como agentes restauradores. Es por esto que es necesario aplicaciones

ambientales e industriales. Por lo que existe la necesidad de conocer, enumerar y aislar los miembros principales y menores de la comunidad microbiana en suelos.

La microbiología de suelos es una disciplina que se encarga del estudio de los microorganismos en número y clase en este componente, así como también de los efectos que estos sobre el ambiente del suelo y desarrollo vegetal. Posee una gran importancia, ya que contribuye a la solución de problemas de baja fertilidad de los suelos, la salinidad, la acidez, la contaminación con metales pesados, y compuestos inorgánicos que son problemas abióticos, puesto que los microorganismos pueden ser usados para remediar esos problemas, de igual manera el conocimiento de los microorganismos en el suelo permiten la solución de problemas bióticos relacionados con la salud del suelo, la cual se relaciona a su vez con factores como la fertilización, el riego, el uso de pesticidas, el vertido o uso de hidrocarburos, los monocultivos y la preparación del terreno en búsqueda de un equilibrio dinámico es estos espacios.

Los microorganismos del suelo son vitales para la salud del mismo puesto que participan en una serie de procesos de interés como la mineralización la cual puede ser promovida por bacterias, la inmovilización que puede ser llevada por hongos como los hongos micorrízicos.

El suelo es definido según la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (1984), como un material mineral no consolidado en la superficie de la tierra, el cual esta y ha estado sometido a los efectos de factores genéticos y ambientales (material parental, clima, macro y microorganismos y topografía), los cuales ha actuado durante un tiempo determinado. Se considera como un cuerpo natural donde existen diversas interacciones dinámicas con la atmósfera. Además de influir en el clima y en el ciclo hidrológico de planeta, es un medio natural para el crecimiento de los microorganismos y otros seres vivos y juega un papel de suma importancia ya que se considera como un reactor donde se descompone la materia la cual es transformada y reciclada [5].

Fundamentos

La microbiología del suelo estudia los microorganismos presentes en los ecosistemas edáficos y su papel en los ciclos biogeoquímicos, la fertilidad del suelo y la degradación de compuestos orgánicos e inorgánicos. La práctica de

microbiología del suelo es fundamental para comprender la biodiversidad microbiana y su impacto en la agricultura, el medio ambiente y la biotecnología.

Principios Fundamentales

1. Diversidad Microbiana del Suelo

El suelo alberga bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y arqueas, que desempeñan funciones esenciales en la transformación de nutrientes y la estabilidad del ecosistema.

2. Ciclos Biogeoquímicos

3. Los microorganismos del suelo participan en el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, facilitando la disponibilidad de nutrientes para las plantas y la descomposición de materia orgánica.

4. Interacción Microbiana y Fertilidad del Suelo

5. Microorganismos como *Rhizobium* y *Azospirillum* fijan nitrógeno, mientras que los hongos micorrícicos facilitan la absorción de agua y nutrientes por las raíces de las plantas.

6. Impacto en la Agricultura y el Medio Ambiente

7. Los microorganismos del suelo pueden mejorar el crecimiento de cultivos, degradar contaminantes (biorremediación) y ayudar en el control biológico de plagas y enfermedades.

8. Técnicas de Estudio Microbiológico del Suelo

9. Se utilizan métodos de cultivo selectivo, conteo de colonias, aislamiento de microorganismos y análisis de actividad enzimática para evaluar la calidad microbiológica del suelo.

Objetivo

Aplicar métodos para el aislamiento e identificación cuantitativa y cualitativa de microorganismos del suelo.

Preparación previa

Antes de realizar una práctica en el laboratorio de microbiología, es fundamental tener en cuenta las siguientes instrucciones:

- Contar con conocimientos básicos sobre el manejo de muestras, material de vidrio y equipos a usar.

- Cumplir con las normas de seguridad, como el uso de bata exclusivamente dentro del laboratorio, abstenerse de comer, beber, masticar chicle.
- Mantener la limpieza constante de la mesa de trabajo.
- Conocer la ubicación y uso de los equipos de seguridad tales como: manta, extinguidores, botiquín de primeros auxilios, etc. De igual forma, deberán conocer la ubicación de las salidas de emergencia y escaleras.
- Deberá rotular e identificar debidamente todos los materiales o cultivos que utilice en los laboratorios.
- Se prohíbe la manipulación de equipos (autoclaves, cabinas de bioseguridad, etc.) sin la debida autorización.

Procedimiento

Muestreo del Suelo para análisis microbiológico

El muestreo microbiológico del suelo se desarrolla con el fin de conocer la diversidad microbiana de este componente para ello se aplicará en este caso el método estándar propuesto por la FAO, el cual consiste en la toma de una muestra superficial.

Materiales y Equipos:

- Bolsas plásticas nuevas o estériles
- Pala de jardinería
- Alcohol isopropílico
- Solución desinfectante
- Etiqueta para la Información de la muestra
- Cinta Plástica adhesiva

Procedimiento

- Escoja un espacio y establezca un cuadrante de 3mts o de 5mts para ello utilice una cinta métrica.
- Marque en el suelo los cuatro puntos del cuadrante y el centro de este.
- Esterilice una pala con alcohol y solución desinfectante, y deje secar al aire, colóquese guantes para siguiente procedimiento.

- Excave en cada punto aproximadamente de 20-30cm de la superficie, en caso de existir piedras o material orgánico como hojas o restos de plantas retire esto de la superficie o la zona donde escaba.
- Voltee la bolsa para tomar la muestra e introduzca la mano dentro de la bolsa y recoja la muestra aproximadamente 200gr sin tocarla, de la misma manera voltee la bolsa, ciérrela, rotúlela y colóquele una etiqueta respectiva.
- Refrigere la muestra para ser tartaleada al laboratorio a una temperatura de 20 °C aproximadamente.
- Una vez trasladada la muestra al laboratorio, puede guardar en refrigeración (nevera) o proceder a su procesamiento.

Preparación de una muestra de suelo para análisis microbiológicos

- Tome cada una de las muestras de cada estación de muestreo e intégrelas para ello utilice una bolsa estéril y coloque las muestras 1,2,3, 4, 5 en una bolsa y mezcle su contenido de forma vigorosa por 5min.
- Con una espátula estéril tome usted puede tomar 10gr - 100gr para diluir en 500ml, 1000ml los gramos y volúmenes son de escogencia de lo que se desee evaluar, así como la fertilidad observable del suelo. Un suelo muy fértil es mejor evaluar con una pequeña cantidad de este diluida en un volumen considerable debido a la gran cantidad de microorganismos que es posible encontrar, mientras que un suelo que se ha observado como poco fértil se sugiere tomar alícuotas grandes en pequeños volúmenes con el fin de recuperar mayor cantidad de microorganismos debido a la escasez de estos.
- Si la muestra proviene de un suelo contaminado en donde no se observa fertilidad y no goza de buena salud. Se sugiere enriquecer la muestra, colocando la muestra previamente en agua peptonada.
- Evaluación Directa

Procedimiento 1: Extensión con espátula de Digrafsky

Tome una muestra en volumen de 0,5 ml previamente preparada para el análisis microbiológico en inocúlela en una placa de Petri. Si previamente se conoce que la muestra posee una alta diversidad microbiana solo coloque una gota en el centro de la placa bien sea con una micropipeta o con pipeta Pasteur previamente estériles.

Extienda la muestra con espátula Digralsky colocando el volumen en el centro de la placa y extendiéndola con la técnica correspondiente.

Procedimiento 2: Inoculación con Asa de Platino

A partir de la muestra previamente prepara para el análisis microbiológico tome un asa de platino e inocule una muestra aplicando el método de zig-zag y triple estría con agotamiento del inóculo.

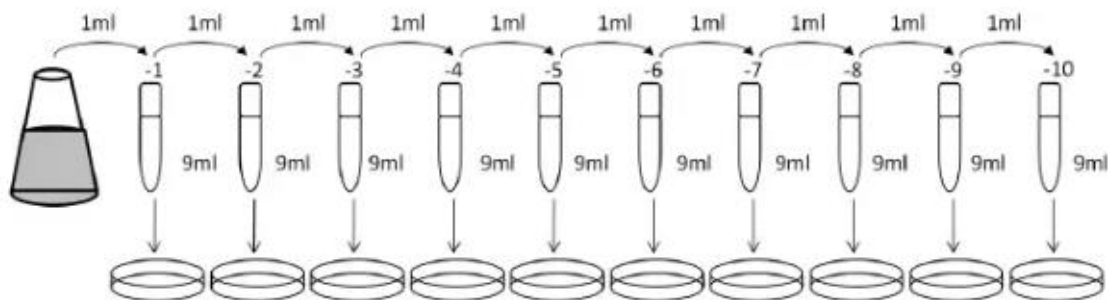
Evaluación de la diversidad microbiana de bacterias heterotróficas y hongos miceliales en el suelo

- **Evaluación por el Método de Dilución en diversas Placas**

Fundamento: El método de dilución en placa se fundamenta en que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación, como la formación de colonias en placas de agar. Este método consiste en la preparación de una serie de diluciones de una muestra de suelo en un diluyente apropiado, esparciendo una alícuota de una dilución sobre la superficie de un medio de cultivo sólido e incubando la placa de agar bajo condiciones ambientales apropiadas.

La dilución debe permitir generar colonias separadas, cada colonia puede proceder de una sola célula o de una agrupación (unidad viable), la cual se contará como una bacteria. Bajo este fundamento, estas placas pueden ser usadas no sólo para el conteo de poblaciones microbianas, sino también para el aislamiento de organismos. Un medio selectivo o no selectivo puede ser usado dependiendo de la naturaleza del microorganismo que se desea contar o aislar (Ramírez et al., 1992).

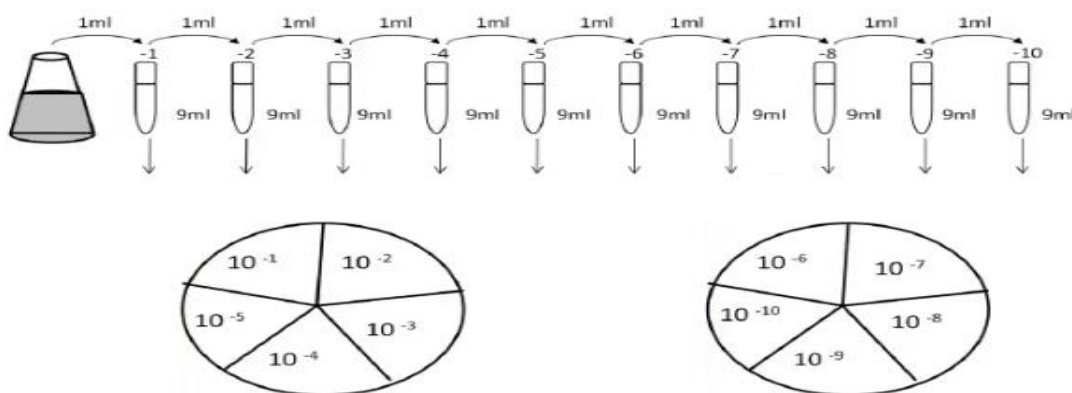
Figura 1
Esquema de dilución seriada



- Realice diluciones seriadas con solución de NaCL al 0.9% a partir de la muestra previamente preparada a partir de un inóculo de 1ml.
- Posteriormente inocule 0,5 ml de la muestra en diversas placas de Petri Previamente Preparadas con Agar Nutritivo para el crecimiento de bacterias y Agar Sabouraud o PDA para evaluar el crecimiento de hongos.
- Incube las placas a 37 °C durante 24 horas para bacterias y 3-5 días para los hongos.

Evaluación por el Método de Dilución en Placas divididas

Figura 2
Distribución de diluciones seriadas en cajas Petri



- Realice diluciones seriadas con solución de NaCL al 0.9% a partir de la muestra previamente preparada a partir de un inóculo de 1ml.
- Tome 2 placas de agar nutritivo y agar sabouraud o PDA y divídala en 5 partes.

- Posteriormente inocule 0,5 ml de la muestra en las placas de Petri previamente preparadas con Agar Nutritivo para el crecimiento de bacterias y Agar Sabouraud o PDA para evaluar el crecimiento de hongos.
- Incube las placas a 37 °C durante 24 horas para bacterias y 3-5 días para los hongos.

Cualificación de las características en Placa (Aislamiento e Identificación)

En caso de existir más de una cepa con características bien diferenciadas en una placa proceda a aislar sembrando en una nueva respectivamente en agar con medio basal bacterias y agar Czapek-Dox para hongos, logrando el aislamiento con un asa de platino en incubando a 24h para bacterias y 3-5 días para hongos a 37 °C.

Para cualificar los crecimientos en las placas de Petri, tome una placa y colóquela en un fondo negro o blanco. Sobre este coloque una regla o un objeto con escala o tamaño conocido y tome una foto.

Identifique si el crecimiento característico es de hongos o bacterias y determine las características de cada crecimiento indicando, el borde, la elevación, la forma y el tamaño.

Realice un cuadro como indica el siguiente ejemplo:

Estación	Cepa	<u>Micromorfología</u>	<u>Macromorfología</u>			
			<u>Color</u>	<u>Forma</u>	<u>Borde</u>	<u>Elevación</u>
1	A1236464	<i>Aspergillus sp</i>	Blanco	Redonda	Entero	Elevado
2	H6326353	<i>Aspergillus niger</i>	Blanco	Redonda	Entero	Elevado

Para poder identificar las características microscópicas de las bacterias realice una tinción de Gram.

Para identificar las características microscópicas de los hongos proceda a realizar un cultivo en cámara húmeda o cultivo de Riddell.

Cuantificación de microorganismos del suelo

Contar el número de colonias y reportar como unidades formadoras de colonias (UFC)/ g de suelo seco.

Contar sólo aquellas cajas (diluciones) que contengan de 30 a 300 colonias.

Con la siguiente ecuación calcular las UFC/g s.s.

$$\text{UFC/g s.s.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/ \text{V}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

UFC/ g s. s. = unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC= número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la caja (10-2 a 10-10).

V= volumen inoculado en la caja = 0.1 ml.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

Resultados de aprendizaje

La realización de la práctica de la Microbiología del suelo permite lograr varios resultados de aprendizaje significativos:

- Conocer la diversidad microbiana mediante el muestreo microbiológico.
- Conocer la preparación de una muestra de suelo para análisis microbiológicos
- Aprender la evaluación directa por extensión con espátula de Digrafsky
- Comprender la evaluación directa por inoculación con asa de Platino.
- Identificar el método de dilución en diversas placas para la evaluación de la diversidad microbiana de bacterias heterotróficas y hongos miceliales en el suelo.
- Comprender la utilización de medios diferenciales para el cultivo de microorganismos propios del suelo.

Normas de seguridad

Para permitir la seguridad de los alumnos que realizan la práctica descrita, se deben seguir las siguientes normas:

- No comer, tomar bebidas, fumar, ni mascar chicle.
- No correr ni empujarse dentro del laboratorio de computación.
- No cepillarse el cabello ni aplicarse maquillaje.
- Mantener un entorno de trabajo tranquilo y libre de distracciones durante la práctica virtual.

- Asegurarse de tener acceso estable a Internet para evitar interrupciones durante la práctica.
- Iniciar sesión en la plataforma virtual designada para la práctica utilizando tus credenciales proporcionadas por el docente.
- Participar activamente en todas las actividades virtuales, incluyendo discusiones, simulaciones y ejercicios prácticos.
- No realizar actividades no éticas, como la manipulación indebida de datos o la copia de trabajos de otros estudiantes.
- Manejar los datos genéticos de manera confidencial y respetar la privacidad de la información.
- No descargar, compartir o utilizar datos de manera no autorizada.
- No intentar acceder a información no relacionada con la práctica virtual.
- Informar al docente de comportamientos sospechosos o problemas de seguridad.
- Cumplir con los plazos asignados para la entrega de tareas y actividades.
- Al terminar la práctica, desconectarse completamente de la plataforma y cerrar todas las aplicaciones relacionadas.
- Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
- No obstruir el paso entre las mesas, ni las salidas del laboratorio de computación

Cuestionario

- ¿Qué papel juegan los microorganismos en la formación y estructura del suelo?
- Describe el mecanismo correcto para realizar un muestreo de suelo para un análisis microbiológico.
- ¿A qué hace referencia el método de dilución en placa?
- ¿Cuál es la diferencia entre el método de siembra por inoculación con asa de platino y el método de dilución en diversas placas?

Practica 2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana (antibiogramas)

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, comúnmente conocidas como antibiogramas, son técnicas microbiológicas esenciales en el ámbito de la salud. Su principal objetivo es evaluar la efectividad de diferentes antibióticos frente a bacterias patógenas. Estas pruebas son fundamentales para determinar qué antibiótico es más adecuado para tratar una infección específica, lo que ayuda a guiar la terapia antimicrobiana y a prevenir la resistencia bacteriana [1], [2]. Existen varios métodos para realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana, entre los cuales se destacan:

Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer): Este método consiste en colocar discos impregnados con diferentes antibióticos sobre una placa de agar inoculada con la bacteria de interés. Después de un período de incubación, se observa la zona de inhibición alrededor de cada disco, la cual indica la efectividad del antibiótico. Este método es sencillo y ampliamente utilizado en laboratorios clínicos [3].

Método de Dilución en Caldo: En este método, se preparan diluciones seriadas del antibiótico en caldo de cultivo y se añade una cantidad fija de la bacteria. Después de la incubación, se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la menor concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento visible de la bacteria [4].

Método de Dilución en Agar: Similar al método de dilución en caldo, este método utiliza placas de agar con concentraciones crecientes de antibiótico. La bacteria se inocula en la superficie del agar y, tras la incubación, se observa el crecimiento bacteriano para determinar la CMI [5].

Etest (Epsilometría): Este método combina aspectos de los métodos de difusión y dilución. Se utiliza una tira de plástico impregnada con un gradiente de concentración del antibiótico. La tira se coloca sobre una placa de agar inoculada con la bacteria y, tras la incubación, se observa una elipse de inhibición que intersecta la tira en la CI [6].

Métodos Automatizados: Existen sistemas automatizados, como el VITEK y el MicroScan, que permiten realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana de manera rápida y eficiente. Estos sistemas utilizan tarjetas o paneles con diferentes concentraciones de antibióticos y proporcionan resultados precisos en poco tiempo [7].

Importancia de las Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana: Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son cruciales para el manejo adecuado de las infecciones bacterianas. Proporcionan información valiosa sobre la eficacia de los antibióticos y permiten seleccionar el tratamiento más adecuado para el paciente. Además, estas pruebas ayudan a monitorizar la aparición de cepas bacterianas resistentes y a orientar las políticas de uso racional de antibióticos, contribuyendo así a la lucha contra la resistencia antimicrobiana [8].

Aplicaciones Clínicas y Biotecnológicas

- Permiten elegir el antibiótico adecuado para infecciones en humanos y animales.
- Se utilizan en investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos.
- Son clave en la industria farmacéutica y en la producción de antibióticos en biotecnología.

Fundamentos

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no solo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene a la larga consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos ha adquirido tanta importancia y sea indispensable para hacer de los antibióticos un uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos [1].

El conocimiento de la sensibilidad a los antibióticos del microorganismo causante de una enfermedad no es solo importante para hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que, además, en aquellos casos en los cuales el paciente presenta intolerancia a determinado fármaco, permite seleccionar el más adecuado para ese paciente en particular [2].

Los antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas [3]. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la

terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados in vitro y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antimicrobianos y los microorganismos en un determinado paciente [4].

Entre los factores podemos resaltar:

Factores del agente antimicrobiano:

- Farmacocinética
- Unión a proteínas del plasma
- Vías de administración
- Acción bacteriostática
- Bactericida
- Concentración en el sitio de la infección

Factores del huésped:

- Enfermedad
- Estado inmunológico
- Formación de absceso
- Presencia de cuerpo extraño
- Función renal y hepática
- Cumplimiento del tratamiento

Factores del microorganismo:

- Virulencia
- Alta concentración de microorganismos
- Infección mixta
- Desarrollo de resistencia durante el tratamiento

La metodología usada para realizar el antibiograma toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder in vivo a un determinado antibiótico [5].

Existen diversos métodos para determinar la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, presentando además cada uno de estos métodos, múltiples variantes.

Cualquiera que sea el método seleccionado, el medio de cultivo a emplear ha de ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitor sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos o quimioterápicos ensayados [6]. Usualmente se utiliza el agar de Mueller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento [7]. Cuando se trata de estreptococos u otros microorganismos exigentes, se le añade al Mueller-Hinton, 5% de sangre desfibrinada [8]. De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel. La variante más utilizada de este método es la de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición [9].

Objetivo

Realizar un ensayo de sensibilidad de un cultivo bacteriano a los antibióticos, usando el método de Kirby Bauer. Interpretar los resultados y hacer el informe correspondiente.

Preparación previa

Antes de realizar una práctica en el laboratorio de microbiología, es fundamental tener en cuenta las siguientes instrucciones:

- Contar con conocimientos básicos sobre el manejo de muestras, material de vidrio y equipos a usar.
- Cumplir con las normas de seguridad, como el uso de bata exclusivamente dentro del laboratorio, abstenerse de comer, beber, masticar chicle.
- Mantener la limpieza constante de la mesa de trabajo.
- Conocer la ubicación y uso de los equipos de seguridad tales como: manta, extinguidores, botiquín de primeros auxilios, etc. De igual forma, deberán conocer la ubicación de las salidas de emergencia y escaleras.
- Deberá rotular e identificar debidamente todos los materiales o cultivos que utilice en los laboratorios.

- Se prohíbe la manipulación de equipos (autoclaves, cabinas de bioseguridad, etc.) sin la debida autorización.

Procedimiento

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco.

En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo con tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards).

Para obtener resultados confiables y reproducibles mediante este método, es imprescindible seguir fielmente las instrucciones que daremos a continuación:

1. Funda el medio de cultivo y déjelo enfriar a 45-50°C.
2. Vierta asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, para obtener una capa de 4 mm de espesor. Para una placa de 10 cm. de diámetro se requieren 30 mL de medio y para una de 15 cm se requieren 70 mL.
3. Deje solidificar el medio de cultivo y luego seque las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación.
4. Inocule la placa mediante un hisopo estéril utilizando una suspensión del germen de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a 1,5 x 10⁶ bacterias (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland). Para la inoculación sumerja un hisopo estéril en el cultivo y elimine el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. Frote el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo.

5. Repita esta operación por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie.
6. Coloque la tapa a la placa y deje secar el inóculo por 3 a 5 minutos.
7. Coloque los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles o usando un aplicador de discos. Oprima los discos suavemente con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm y entre ellos de 30 mm.
8. Incube a 35 – 37°C hasta el siguiente día (aproximadamente 18-19 horas). Si se requieren los resultados con rapidez se pueden leer las zonas de inhibición después de 6-8 horas de incubación, pero estos resultados deben ser confirmados mediante una nueva lectura después de la incubación por las 18 - 19 horas.
9. La medida del diámetro de la zona de inhibición se hace preferentemente desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, esto puede hacerse con una regla milimetrada, un vernier o cualquier otro Instrumento similar.
10. Los resultados se interpretan de acuerdo con la tabla 1.
11. Ensayos de control con microorganismos cuya sensibilidad se conoce, tales como el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, deben ser efectuados simultáneamente con el de los gérmenes en estudio y las zonas de inhibición obtenidas con ellos deben estar comprendidas entre los valores indicados en la tabla 2.

Tabla 1
Interpretación del método de Kirby Bauer

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		Resistente < o =	Intermedio	Sensible > o =
BETALACTÁMICOS, PENICILINAS				
Ampicilina <i>Enterobacteriaceae</i>	10 µg	13	14-16	17
Ampicilina Estafilococos	10 µg	28	---	29
Ampicilina Enterococos	10 µg	16	---	17
Ampicilina Estreptococos β hemolíticos	10 µg	18	19-25	26
Mezlocilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75 µg	15	---	16
Mezlocilina <i>Enterobacteriaceae</i>	75 µg	17	18-20	21
Oxacilina Estafilococos	1 µg	10	11-12	13
Oxacilina Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina	1 µg	---	---	20
Penicilina G Estafilococos	10 U	28	---	29
Penicilina Enterococos	10 U	14	---	15
Penicilina Estreptococos β hemolíticos	10 U	19	20-27	28
Piperacilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 µg	17	---	18
Piperacilina <i>Enterobacteriaceae</i>	100 µg	17	18-20	21
COMBIN. CON INHIBIDORES B-LACTAMASA				
Amoxicilina / Ácido Clavulánico Estafilococos	20/10 µg	19	---	20
Amoxicilina / <i>Enterobacteriaceae</i>	20/10 µg	13	14-17	18
Ampicilina / Sulbactama	10/10 µg	11	12-14	15
Piperacilina / Tazobactama Enterobacterias	100/10 µg	17	18-20	21
Piperacilina / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100/10 µg	17	---	18
Piperacilina / Esafilococos meticilina S	100/10 µg	17	---	18
CEFALOSPORINAS				
Cefador	30 µg	14	15-17	18
Cefazolina	30 µg	14	15-17	18
Cefepima	30 µg	14	15-17	18
Cefixima	5 µg	15	16-18	19
Cefoperazona	75 µg	15	16-20	21
Cefotaxima	30 µg	14	15-22	23
Cefoxitina	30 µg	14	15-17	18
Ceftazidima	30 µg	14	15-17	18
Ceftixozima	30 µg	14	15-19	20
Ceftriaxona	30 µg	13	14-20	21
Cefuroxima sódica parenteral	30 µg	14	15-17	18
Cefalotina	30 µg	14	15-17	18

CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	13	14-15	16
Meropenem	10 µg	13	14-15	16
MONOBACTAMAS				
Aztreonam	30 µg	15	16-21	22
GLICOPÉPTIDOS				
Teicoplanina	30 µg	10	11-13	14
Vancomicina Enterococos	30 µg	14	15-16	17
Vancomicina Estafilococos	30 µg	---	---	15
AMINOGLUCÓSIDOS				
Amicacina	30 µg	14	15-16	17
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15
Kanamicina	30 µg	13	14-17	18
Netilmicina	30 µg	12	13-14	15
MACRÓLIDOS				
Azítromicina	15 µg	13	14-17	18
Clarítromicina	15 µg	13	14-17	18
Eritromicina	15 µg	13	14-22	23
TETRACICLINAS				
Minociclina	30 µg	14	15-18	19
Tetraciclina	30 µg	14	15-18	19
QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	15	16-20	21
Fleroxacina	5 µg	15	16-18	19
Nalidíxico Ácido	30 µg	13	14-18	19
Norfloxacina	10 µg	12	13-16	17
Ofloxacina	5 µg	12	13-15	16
Trovafloxacina	10 µg	13	14-16	17
OTROS ANTIMICROBIANOS				
Cloranfenicol	30 µg	12	13-17	18
Clindamicina	2 µg	14	15-20	21
Nitrofurantoina	300 µg	14	15-16	17
Polimixina B	300 U	8	9 - 11	12
Rifampicina	5 µg	16	17-19	20
Sulfonamidas	300 µg	12	13-16	17
Trimetoprima - Sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	10	11-15	16

Tabla 2

Controles del método de Kirby Bauer

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN DEL DISCO	DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (en mm)	
		CON <i>S. aureus</i> ATCC 25923	CON <i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicilina	10 µg	24-35	15-20
Bacitracina	10 U	17-22	---
Cefalotina	30 µg	25-37	18-23
Cloramfenicol	30 µg	19-26	21-27
Colistina	10 µg	-	11-15
Eritromicina	15 µg	22-30	8-14
Gentamicina	10 µg	19-27	19-26
Kanamicina	30 µg	19-26	17-25
Meticilina	5 µg	17-22	-
Neomicina	30 µg	18-26	17-23
Novobiocina	30 µg	22-31	-
Oleandomicina	15 µg	19-28	-
Penicilina G	10 U	26-37	-
Polimixina B	300 U	7-13	12-16
Estreptomicina	10 µg	14-22	12-20
Tetraciclina	30 µg	19-28	18-25
Vancomicina	30 µg	15-19	-

Resultados de aprendizaje

- La realización de la práctica de sensibilidad antimicrobiana permite lograr varios resultados de aprendizaje significativos:
- Conocimiento de la sensibilidad a los antibióticos del microorganismo causante de una enfermedad.
- Determinación del fármaco más adecuado para un microorganismo en específico.
- Conocimiento cuantitativo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antimicrobiano.
- Aplicación correcta del método de Kirby Bauer.

Normas de seguridad

Para permitir la seguridad de los alumnos que realizan las prácticas aquí descritas, se deben seguir las siguientes normas:

- No comer, tomar bebidas, fumar, ni mascar chicle.
- No correr ni empujarse dentro del laboratorio.
- No cepillarse el cabello ni aplicarse maquillaje
- Siempre usar bata cuando se permanezca en el laboratorio y guantes para el desarrollo de actividades.

- Calzar zapatos cerrados y de suela antiderrapante.
- Cuando se empleen los guantes, no tocar objetos de uso común (interruptores, manijas de puertas, teclados y mouse de la computadora, entre otros) ni partes del cuerpo (cara o cabello).
- No pipetear ninguna solución con la boca.
- No oler directamente, ni probar ninguna sustancia utilizada en el laboratorio.
- Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
- No obstruir el paso entre las mesas, ni las salidas del laboratorio.
- No utilizar material de vidrio dañado o astillado.
- Manejar sustancias tóxicas, irritantes, inflamables, cancerígenas o mutagénicas en las áreas destinadas para su uso y con la protección adecuada.
- No dejar destapados los frascos que contengan sustancias químicas o algún material estéril.
- Respetar la asignación de espacios y reactivos.
- Al terminar de trabajar, guardar o entregar el material limpio y seco.
- NOTA: Ante una situación de urgencia dar aviso inmediatamente al docente a cargo de la asignatura.

Cuestionario

- ¿Qué es la prueba de sensibilidad antimicrobiana y cuál es su objetivo principal?
- ¿Cuáles son los métodos comunes utilizados para realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana?
- ¿Cuáles son las interpretaciones posibles de los resultados de una prueba de sensibilidad antimicrobiana?
- ¿Qué factores pueden influir en los resultados de una prueba de sensibilidad antimicrobiana?

Referencias bibliográficas

- [1] P. R. Murray, *Microbiología Médica*. Elsevier, 2020.
- [2] M. A. Pfaller, "Antimicrobial Susceptibility Testing," *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 23, no. 4, pp. 855-869, 2003.
- [3] J. H. Jorgensen y M. J. Ferraro, "Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 11, pp. 1749-1755, 2009.
- [4] C. Schwalbe, L. Steele-Moore y A. C. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press, 2007.
- [5] G. M. Eliopoulos y R. C. Moellering Jr., "Antimicrobial Combinations," *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed., V. Lorian, Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pp. 365-440.
- [6] R. Leclercq, E. Canton y M. P. Muller-Series, "Etest: A New Technique for Antifungal Susceptibility Testing," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 28, no. 1, pp. 11-18, 1991.
- [7] J. M. Janda y S. L. Abbott, "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 9, pp. 2761-2764, 2007.
- [8] P. Courvalin, "Predictable and Unpredictable Evolution of Antibiotic Resistance," *Journal of Internal Medicine*, vol. 264, no. 1, pp. 4-16, 2008.
- [9] P. N. Acar y T. A. Goldstein, "Disc Susceptibility Testing," *Methods in Microbiology*, vol. 3, pp. 51-89, 1971.

CAPÍTULO III

Biotecnología molecular



Introducción

La biotecnología molecular es una disciplina clave en la biología moderna que permite la manipulación del ADN con fines científicos, médicos, forenses e industriales [1]. Su desarrollo ha llevado al diseño de técnicas altamente especializadas, como la extracción de ADN, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel de agarosa, que son esenciales para el estudio de los genes y su aplicación en diferentes campos [2].

Extracción de ADN: Historia, fundamentos y aplicaciones

El aislamiento del ADN es una técnica esencial en biología molecular que ha evolucionado significativamente desde sus primeras aplicaciones [3]. Friedrich Miescher, un químico suizo, fue el primero en aislar ADN en 1869 a partir de glóbulos blancos extraídos de pus de vendajes quirúrgicos [4]. En su experimento, Miescher descubrió una sustancia ácida rica en fósforo a la que llamó "nucleína", que más tarde sería identificada como ADN [5].

Durante el siglo XX, con los avances en la comprensión de la estructura del ADN y su papel en la herencia genética, la extracción de esta molécula se convirtió en un paso clave en la investigación biológica [6]. Métodos clásicos, como la precipitación con etanol o isopropanol, fueron desarrollados en laboratorios de investigación y posteriormente optimizados en kits comerciales que garantizan mayor pureza, rapidez y reproducibilidad [7].

Hoy en día, la extracción de ADN es una técnica de rutina en laboratorios de biología molecular, con aplicaciones en diagnóstico clínico, biotecnología, estudios forenses y mejora genética en agricultura [8].

El ADN es una molécula altamente organizada que se encuentra dentro del núcleo de las células eucariotas o dispersa en el citoplasma de las células procariotas [9]. Su extracción implica la ruptura de las membranas celulares y nucleares para liberar el material genético, seguido de su separación de proteínas, lípidos y otras moléculas celulares [10].

El proceso de extracción consta de tres fases principales:

- **Lisis celular:** Se utilizan detergentes y agentes caotrópicos para romper las membranas celulares y nucleares. En bacterias, enzimas como la lisozima ayudan a degradar la pared celular [11].
- **Purificación:** Se eliminan proteínas y contaminantes mediante tratamiento con proteinasa K y sales caotrópicas. En métodos avanzados, se emplean columnas de sílice para retener el ADN y eliminar impurezas [12].
- **Precipitación y elución:** El ADN es precipitado con etanol o isopropanol, centrifugado y disuelto en soluciones buffer como TE o agua libre de nucleasas.
- La obtención de ADN puro y de alta calidad es fundamental para numerosas aplicaciones en biotecnología molecular:
- **Diagnóstico clínico:** Identificación de mutaciones genéticas y detección de patógenos mediante PCR o secuenciación.
- **Investigación forense:** Extracción de ADN a partir de muestras biológicas en escenas del crimen para identificación de individuos.
- **Genómica y transcriptómica:** Secuenciación de ADN para estudios evolutivos, identificación de especies y análisis de expresión génica.
- **Biotecnología industrial:** Aplicación en ingeniería genética para la creación de organismos modificados genéticamente (OGMs).
- **Agricultura y veterinaria:** Detección de enfermedades en cultivos y animales mediante análisis de ADN.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Historia, fundamentos y aplicaciones

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis, un bioquímico estadounidense que revolucionó la biología molecular al crear una técnica capaz de amplificar millones de copias de un fragmento de ADN en pocas horas [13]. Este descubrimiento le valió el Premio Nobel de Química en 1993.

Antes de la PCR, la amplificación de ADN era un proceso lento y laborioso que requería clonación en bacterias. La PCR permitió una alternativa más rápida

y eficiente, posibilitando el avance en el diagnóstico genético, la investigación biomédica y la identificación forense [14].

La PCR es un método de amplificación de ADN que imita el proceso de replicación celular, utilizando un ciclo térmico repetitivo en tres pasos fundamentales:

- Desnaturalización (94-98°C): La doble hélice de ADN se separa en dos cadenas simples.
- Alineamiento o hibridación (50-65°C): Los cebadores (primers) se unen a secuencias complementarias del ADN molde.
- Extensión (72°C): La Taq polimerasa, una ADN polimerasa termoestable, sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de los primers.

Este ciclo se repite de 20 a 40 veces, generando una amplificación exponencial del fragmento de interés.

La PCR ha sido una de las técnicas más influyentes en biología molecular y ha revolucionado múltiples áreas del conocimiento:

- Medicina y diagnóstico molecular:
- Detección de enfermedades infecciosas (SARS-CoV-2, VIH, tuberculosis).
- Diagnóstico de enfermedades genéticas como fibrosis quística y anemia falciforme.
- Genética forense:
- Identificación de individuos mediante huellas genéticas.
- Análisis de ADN en casos criminales y pruebas de paternidad.
- Investigación biomédica y biotecnología:
- Secuenciación de ADN y ARN.
- Identificación de mutaciones en cáncer.
- Agricultura y veterinaria:
- Identificación de plagas y enfermedades en cultivos.
- Control de calidad en la producción de alimentos.

Estos avances han permitido la creación de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico basadas en la amplificación de material genético.

Electroforesis en Gel de Agarosa: Historia, fundamentos y aplicaciones

La electroforesis en gel de agarosa fue desarrollada en la década de 1960 como una técnica para la separación de macromoléculas, especialmente ADN y ARN [15]. Su desarrollo permitió la visualización de fragmentos de ADN de diferentes tamaños, facilitando el análisis de productos de PCR, enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

La electroforesis es una técnica basada en la migración de moléculas cargadas en un campo eléctrico. El ADN es una molécula negativamente cargada debido a los grupos fosfato en su estructura, por lo que migra hacia el ánodo (carga positiva) cuando se somete a un voltaje eléctrico. El gel de agarosa actúa como una matriz porosa que separa los fragmentos de ADN según su tamaño:

- Fragmentos pequeños migran más rápido y recorren mayores distancias.
- Fragmentos grandes se mueven más lentamente y quedan retenidos en la matriz del gel.
- El ADN puede teñirse con colorantes como bromuro de etidio (EtBr) o Safe View Classic, permitiendo su visualización bajo luz ultravioleta o LED, lo cual puede ser usado para:
- Validación de productos de PCR.
- Identificación de fragmentos de restricción en clonación molecular.
- Confirmación de integridad del ADN antes de secuenciación.
- Diagnóstico de enfermedades genéticas mediante análisis de bandas de ADN.

Es así como, gracias a las técnicas antes descritas, la biotecnología molecular ha avanzado significativamente en las últimas décadas, consolidándose como una herramienta esencial en múltiples disciplinas científicas. Por ello, en este capítulo se presentan dos prácticas fundamentales en biotecnología molecular: extracción de ADN y PCR con análisis mediante electroforesis en gel de agarosa. A través de estas prácticas, los estudiantes desarrollarán habilidades experimentales clave en el manejo de ADN, fortaleciendo su formación en biología molecular aplicada

Práctica 1: Extracción de ADN con Kit Comercial

Omega Bio – Tek.

Fundamentos

El objetivo de esta práctica es obtener ADN bacteriano puro y de alta calidad mediante el uso del Kit de Extracción de ADN E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek). Se emplearán procesos de digestión enzimática, lisis celular y purificación mediante centrifugación para obtener ADN adecuado para su posterior análisis por PCR y electroforesis.

Objetivo a alcanzar

Los estudiantes aprenderán a extraer ADN bacteriano, manejar reactivos y equipos especializados, y evaluar la calidad del ADN extraído mediante espectrofotometría.

Materiales y reactivos

- Cultivo bacteriano en medio líquido LB (3 mL por muestra).
- Tampón TE (Tris-EDTA) (100 µL por muestra).
- Lisozima (10 mg/mL) (10 µL por muestra).
- Tampón TL (lisis celular) (100 µL por muestra).
- Proteinasa K (20 mg/mL) (20 µL por muestra).
- RNasa A (10 mg/mL) (5 µL por muestra).
- Tampón BL (solubilización del ADN) (220 µL por muestra).
- Tampón HBC (unión del ADN a la membrana) (preparado con 25 mL de isopropanol).
- Tampón de lavado con etanol al 100%.
- Microtubos estériles de 1.5 mL.
- Pipetas automáticas y puntas estériles.
- Centrífuga de alta velocidad (capaz de alcanzar 13,000 x g).

Procedimiento

Preparación de reactivos

Antes de iniciar la extracción, se debe preparar y verificar la correcta dilución de los tampones:

- Diluir el tampón HBC con 25 mL de isopropanol al 100% y mezclar homogéneamente.
- Diluir el tampón de lavado con etanol al 100% según las indicaciones del kit.
- Disolver lisozima en tampón de elución (1 mL) y almacenar a -20°C.

Pasos para extracción del ADN bacteriano:

Centrifugación del cultivo:

- Transferir 3 mL de cultivo bacteriano en medio LB obtenido previamente a un microtubo estéril.
- Centrifugar a 4,000 x g por 10 minutos y descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet bacteriano en 100 µL de tampón TE.

Digestión de la pared celular:

- Añadir 10 µL de lisozima y mezclar suavemente.
- Incubar a 37°C durante 10 minutos para degradar la pared celular.

Lisis celular:

- Añadir 100 µL de tampón TL y 20 µL de proteinasa K.
- Mezclar e incubar a 55°C por 1 hora con agitación suave.
- Añadir 5 µL de RNasa A, mezclar e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

Purificación del ADN:

- Centrifugar a 13,000 x g por 5 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Añadir 220 µL de tampón BL, mezclar e incubar a 65°C por 10 minutos.
- Transferir a una columna de purificación y centrifugar a 13,000 x g por 1 minuto.

- Lavar con 500 μ L de tampón HBC, centrifugar y descartar el flujo.
- Repetir el lavado con 500 μ L de tampón de lavado con etanol, centrifugar y descartar el flujo.

Elución y almacenamiento:

- Añadir 50 μ L de tampón de elución y centrifugar a 13,000 x g por 1 minuto.
- Almacenar el ADN purificado a -20°C.

Resultados de Aprendizaje

Al finalizar esta práctica, los estudiantes serán capaces de:

1. Comprender los principios fundamentales de la extracción de ADN y su importancia en biología molecular.
2. Aplicar protocolos experimentales estándar para la obtención y purificación de ADN bacteriano.
3. Identificar el papel de cada reactivo en el proceso de lisis, purificación y elución del ADN.
4. Manejar adecuadamente equipos de laboratorio, incluyendo micropipetas, centrífugas y cámaras de flujo laminar.
5. Analizar la calidad y cantidad del ADN extraído mediante espectrofotometría y visualización en gel.
6. Documentar correctamente los procedimientos y resultados, siguiendo buenas prácticas de registro en el laboratorio.
7. Relacionar la importancia de la extracción de ADN con sus aplicaciones en biotecnología, diagnóstico molecular y genética forense.

Normas de seguridad

Precauciones generales:

- Usar bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad en todo momento.
- Desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70% antes y después de la práctica.
- Evitar el contacto directo con reactivos y muestras.

Manejo seguro de herramientas y equipos:

- Verificar la calibración de micropipetas antes de su uso.
- Asegurar el correcto funcionamiento del termociclador y la centrífuga.
- No tocar la agarosa caliente para evitar quemaduras.

Normas para el manejo de sustancias peligrosas:

- Si se usa bromuro de etidio (EtBr), manejarlo en una campana de extracción y con guantes dobles.
- Usar Safe View Classic como alternativa menos tóxica.
- Disponer correctamente los residuos biológicos y químicos.

Procedimientos de emergencia:

- En caso de derrame de reactivos, seguir los protocolos de limpieza del laboratorio.
- Reportar cualquier accidente al instructor.
- Conocer la ubicación del botiquín y las rutas de evacuación.

Cuestionario

- ¿Cuál es la importancia de la extracción de ADN en biología molecular y qué aplicaciones tiene?
- Explique brevemente los tres pasos fundamentales en la extracción de ADN.
- ¿Cuál es la función del tampón de lisis en el proceso de extracción de ADN?
- ¿Por qué es necesario utilizar la lisozima en la extracción de ADN bacteriano?
- ¿Cuál es el papel de la proteinasa K en la purificación del ADN?
- ¿Qué función cumple el RNasa A en la extracción de ADN?
- Explique la importancia del tampón BL y su incubación a 65°C en el proceso de extracción de ADN.
- ¿Por qué es necesario lavar el ADN con tampón HBC y etanol antes de su elución?
- ¿Cómo se puede evaluar la calidad del ADN extraído y qué indicadores determinan su pureza?
- ¿Cómo afectaría la presencia de contaminantes como proteínas o ARN en la eficiencia de técnicas posteriores como la PCR?

Práctica 2: PCR y Electroforesis

Fundamentos

La PCR permite la amplificación específica de ADN para su análisis molecular. En esta práctica, se utilizará una mezcla maestra de PCR optimizada y se evaluará la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Objetivo a alcanzar

Los estudiantes prepararán y ejecutarán una reacción de PCR y verificarán la amplificación de ADN mediante electroforesis.

Materiales y reactivos

Mezcla de dNTPs (200 μ M c/u).

- MgSO_4 (2 mM).
- Buffer Taq Reaction (1X).
- BioTaq DNA Polymerase (0.5 U/ μ L).
- Primers forward y reverse (0.5 μ M c/u).
- ADN molde (20 ng/ μ L).
- Agua ultrapura.
- Tubo de PCR de 0.2 mL.
- Termociclador.
- Agarosa 1%.
- Tampón TAE 1X.
- Colorante de carga y marcador de peso molecular.

Procedimiento

Preparación de la mezcla de reacción para PCR:

1. Etiquetar **tubos de PCR de 0.2 mL** según el número de muestras a amplificar.
2. En una campana de flujo laminar, pipetear los siguientes reactivos en cada tubo de reacción:

Componente	Concentración final	Volumen por reacción (μL)
Buffer de reacción Taq	1X	5.0
MgSO ₄	2 mM	2.5
dNTPs (Mezcla de desoxinucleótidos)	200 μM	1.0
Primer Forward	0.5 μM	1.0
Primer Reverse	0.5 μM	1.0
BioTaq DNA Polimerasa	0.5 U/μL	0.5
ADN molde (extraído en la práctica 1)	20 ng	3.0
Agua ultrapura estéril	-	11.0
Total	-	25.0

Pipeteo correcto:

- Usar **micropipetas calibradas** y puntas estériles.
- Dispensar los reactivos en el **orden indicado**, asegurando homogeneidad en la mezcla.
- Cambiar puntas entre cada pipeteo para evitar contaminación cruzada.
- Mezclar suavemente sin generar burbujas.
- Centrifugar brevemente los tubos para llevar todo el volumen al fondo.

Configuración del termociclador:

Programar el termociclador con los siguientes parámetros de amplificación:

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1

Ciclo de amplificación			35
Desnaturalización	94°C	30 s	
Alineamiento (Hibridación)	55°C	30 s	
Extensión	72°C	45 s	
Extensión final	72°C	5 min	1
Almacenamiento	4°C	Indefini do	-

Electroforesis en gel de agarosa:

Preparación del gel de agarosa 1%:

1. Pesado y disolución:

- Pesar **1 g de agarosa** y transferirlo a un matraz.
- Añadir **100 mL de tampón TAE 1X**.
- Calentar en un microondas hasta disolver completamente.

2. Enfriamiento y teñido:

- Dejar enfriar hasta **60°C** y añadir **5 µL de Safe View Classic (1:20,000)**.
- Verter la mezcla en un molde con peine para formar los pocillos.
- Dejar solidificar durante **30 minutos**.

Carga de las muestras y corrida electroforética:

3. Preparación de las muestras:

- Mezclar **5 µL de producto PCR** con **2 µL de colorante de carga (Easy-Blue Ice + iClone Dye 10X)**.
- Pipetear suavemente y centrifugar brevemente.

4. Carga en el gel:

- Cargar **5 µL del marcador molecular (Opti-DNA Marker 100 bp)** en el primer pocillo.
- Cargar **7 µL de cada muestra de PCR** en los pocillos siguientes.
- **Corrida electroforética:**
- Conectar el equipo y ejecutar a **100 V por 30-45 minutos**.

- Verificar la migración de las bandas en el gel.

5. Visualización y análisis:

- Observar el gel en un transiluminador UV o LED.
- Comparar las bandas obtenidas con el marcador molecular para verificar el tamaño del ADN amplificado.

Resultados de Aprendizaje

Al finalizar esta práctica, los estudiantes serán capaces de:

1. **Comprender los principios teóricos de la PCR**, incluyendo sus etapas y su importancia en biotecnología molecular.
2. **Preparar una reacción de PCR**, seleccionando y mezclando adecuadamente los componentes esenciales (cebadores, dNTPs, ADN polimerasa, tampón, Mg^{2+} y ADN molde).
3. **Configurar y utilizar un termociclador**, estableciendo los parámetros correctos de temperatura y ciclos de amplificación.
4. **Explicar el papel de cada reactivo en la PCR**, incluyendo la función de los cebadores y la Taq polimerasa.
5. **Realizar una electroforesis en gel de agarosa**, comprendiendo los principios de separación de ADN según su tamaño molecular.
6. **Interpretar los resultados de la PCR**, evaluando la presencia, ausencia o especificidad de los productos amplificados.
7. **Aplicar protocolos de bioseguridad en el manejo de reactivos y muestras**, especialmente en la manipulación de colorantes y residuos de PCR.
8. **Identificar las aplicaciones de la PCR y la electroforesis en campos como la medicina, forense y biotecnología.**

Normas de seguridad

Precauciones generales:

- Usar bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad en todo momento.
- Desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70% antes y después de la práctica.
- Evitar el contacto directo con reactivos y muestras.

Manejo seguro de herramientas y equipos:

- Verificar la calibración de micropipetas antes de su uso.
- Asegurar el correcto funcionamiento del termociclador y la centrífuga.
- No tocar la agarosa caliente para evitar quemaduras.

Normas para el manejo de sustancias peligrosas:

- Si se usa bromuro de etidio (EtBr), manejarlo en una campana de extracción y con guantes dobles.
- Usar Safe View Classic como alternativa menos tóxica.
- Disponer correctamente los residuos biológicos y químicos.

Procedimientos de emergencia:

- En caso de derrame de reactivos, seguir los protocolos de limpieza del laboratorio.
- Reportar cualquier accidente al instructor.
- Conocer la ubicación del botiquín y las rutas de evacuación.

Cuestionario

- **Instrucciones:** Responda las siguientes preguntas con base en la práctica realizada.
- ¿Qué significa PCR y cuál es su función principal en biología molecular?
- Explique las tres etapas principales de la PCR y su propósito.
- ¿Cuál es la función de los **cebadores (primers)** en la reacción de PCR?
- ¿Por qué se utiliza la **Taq polimerasa** en la PCR en lugar de otras ADN polimerasas?
- ¿Cómo afecta la concentración de **Mg²⁺** en la eficiencia de la PCR?
- ¿Por qué es importante la temperatura de **alineamiento (hibridación)** en la PCR y cómo se determina?
- ¿Cómo se puede verificar el éxito de una amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa?
- ¿Cuál es la función del **marcador molecular (ladder)** en la electroforesis y cómo se interpreta?
- ¿Qué factores pueden afectar la amplificación del ADN en una reacción de PCR?
- Mencione tres aplicaciones prácticas de la PCR en diferentes áreas científicas.

Referencias bibliográficas

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.
- [2] Lewin, B. (2016). *Genes XII*. Jones & Bartlett Learning.
- [3] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [4] Dahm, R. (2008). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Human Genetics*, 122(6), 565-581.
- [5] Miescher, F. (1871). Über eine neue, im Kerne von Eiterzellen auftretende Substanz. *Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen*, 4(4-5), 441-460.
- [6] Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- [7] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (2003). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- [8] Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., & Carroll, S. B. (2008). *Introduction to genetic analysis* (9th ed.). W. H. Freeman.
- [9] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... & Darnell, J. (2008). *Molecular cell biology* (6th ed.). W. H. Freeman.
- [10] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman.
- [11] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Sattley, W. C. (2018). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- [12] Hengen, P. N. (1996). Purification of DNA from agarose gels. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(6), 224-225.
- [13] Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- [14] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- [15] Helling, R. B., Goodman, H. M., & Jackson, D. A. (1969). A method for the rapid isolation of lambda bacteriophage DNA. *Journal of Virology*, 4(5), 677-679.

CAPÍTULO IV

Biotecnología Vegetal



Historia de la Biotecnología Vegetal

La biotecnología vegetal es una disciplina que combina los principios de la biología, la genética y la ingeniería para mejorar las plantas con fines agrícolas, industriales y ambientales. Esta área del conocimiento se centra en la manipulación de material genético de las plantas para desarrollar variedades más resistentes a enfermedades, tolerantes a condiciones climáticas adversas o con un mayor valor nutricional [1]. Gracias a la biotecnología vegetal, es posible no solo optimizar los procesos de producción agrícola, sino también contribuir a la seguridad alimentaria y a la sostenibilidad ambiental [2].

La historia de la biotecnología vegetal se remonta a las primeras prácticas agrícolas, cuando los seres humanos comenzaron a seleccionar y cruzar plantas con características deseables. Sin embargo, el desarrollo moderno de esta disciplina inició con los avances en la biología celular y molecular en el siglo XX. En 1902, el botánico alemán Gottlieb Haberlandt introdujo el concepto de cultivo de células vegetales in vitro, sentando las bases para la propagación clonal y la manipulación de tejidos vegetales. Este descubrimiento permitió el desarrollo de técnicas modernas de cultivo de tejidos, como la micropropagación, que facilita la producción masiva de plantas genéticamente idénticas. Además, abrió el camino para la conservación de especies vegetales raras, la producción de metabolitos secundarios de interés comercial y la investigación en mejora genética a través de la manipulación in vitro de células y tejidos vegetales, sentando las bases para la propagación clonal y la manipulación de tejidos vegetales [3].

Durante la década de 1950, científicos como Skoog y Miller identificaron la importancia de las hormonas vegetales, como las citoquininas y las auxinas, para el desarrollo y la diferenciación de tejidos in vitro, lo que permitió avances significativos en el cultivo de tejidos vegetales [4]. En la década de 1980, con la introducción de las técnicas de ingeniería genética, se logró la inserción de genes específicos en plantas mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, un hito que dio origen a las primeras plantas transgénicas. Los primeros casos de plantas transgénicas incluyeron cultivos como el tabaco, la soja y el maíz, en los que se introdujeron genes que conferían resistencia a herbicidas o a insectos. Estas aplicaciones iniciales permitieron mejorar la productividad agrícola al reducir las pérdidas causadas por plagas y facilitar el manejo de malezas, sentando las bases

para el desarrollo de cultivos transgénicos más complejos y adaptados a diversas condiciones ambientales. se logró la inserción de genes específicos en plantas mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, un hito que dio origen a las primeras plantas transgénicas [5].

En la actualidad, la biotecnología vegetal ha avanzado significativamente con el uso de herramientas de vanguardia como la edición genética con CRISPR-Cas9, la genómica y la bioinformática. Estas tecnologías permiten una manipulación más precisa del material genético y abren nuevas posibilidades para la mejora de cultivos, la producción de biofármacos y la conservación de especies vegetales en peligro de extinción [6].

Biotecnología vegetal

Definiciones y conceptos previos

Antes de profundizar en los aspectos técnicos de la biotecnología vegetal, es fundamental comprender algunos términos clave que forman la base conceptual de esta disciplina. Estas definiciones permiten una mejor comprensión de los procesos y aplicaciones que se desarrollarán a lo largo del estudio.

Biotecnología Vegetal: Aplicación de conocimientos biológicos y tecnológicos para manipular el material genético de las plantas con fines agrícolas, industriales y ambientales [7].

Fitomejoramiento: Proceso de selección y manipulación genética de las plantas para mejorar características como el rendimiento, la resistencia a enfermedades o la adaptación a diferentes condiciones ambientales [7].

Cultivo In Vitro: Técnica que permite el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales en condiciones controladas fuera del organismo [7].

Micropropagación: Método de propagación clonal que permite obtener múltiples plantas genéticamente idénticas a partir de una célula o tejido [7].

Transgénico: Organismo al que se le ha introducido un gen de otra especie mediante técnicas de ingeniería genética [7].

CRISPR-Cas9: Herramienta de edición genética que permite modificar el ADN de forma precisa y eficiente [7].

Sanidad y Comprobación Fitosanitaria

Un aspecto fundamental de la biotecnología vegetal es la sanidad y la comprobación fitosanitaria. Estos procesos garantizan que las plantas producidas estén libres de virus y otros agentes patógenos, lo que es esencial para asegurar la calidad y la viabilidad de los cultivos a gran escala [8]. Además, el estudio de la variación epigenética y somaclonal permite comprender y controlar las modificaciones genéticas que pueden surgir durante el cultivo in vitro, lo cual es crucial para mantener la estabilidad de las características deseadas en las plantas propagadas. Dentro de estos estudios, el pleiotropismo juega un papel importante, ya que se refiere al fenómeno en el cual un solo gen puede influir en múltiples rasgos fenotípicos. Este efecto puede causar variabilidad no deseada en las plantas clonadas, lo que resalta la importancia de monitorear y controlar las mutaciones durante el proceso de cultivo [9].

Producción de Metabolitos y Cultivo a Gran Escala

La biotecnología vegetal ha permitido la producción controlada de metabolitos secundarios, compuestos bioactivos que las plantas sintetizan como parte de sus procesos metabólicos. Estos metabolitos tienen aplicaciones farmacéuticas, cosméticas, agrícolas e industriales. Entre los metabolitos secundarios más relevantes se encuentran los alcaloides, flavonoides, terpenoides y fenoles, que poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas [10].

El cultivo de células vegetales en biorreactores a gran escala permite la obtención de estos compuestos en condiciones controladas, asegurando una producción continua y de alta calidad. Este enfoque tiene ventajas significativas sobre la extracción tradicional de plantas completas, ya que reduce la dependencia de cultivos agrícolas extensivos y permite la obtención de metabolitos de especies vegetales raras o en peligro de extinción [10].

Las principales estrategias para optimizar la producción de metabolitos incluyen:

- Selección de líneas celulares productoras: Identificar y cultivar células con una alta capacidad de síntesis de metabolitos [11].

- Optimización de medios de cultivo: Ajustar la composición de nutrientes, pH y condiciones ambientales para estimular la producción de metabolitos [12].
- Elicitación: Introducir compuestos específicos (elicitadores) que activan las rutas metabólicas en las células vegetales [12].
- Uso de biorreactores: Emplear sistemas cerrados que permiten controlar las variables físicas y químicas, como la aireación, la agitación y la temperatura, para maximizar la producción [12].

El cultivo a gran escala mediante biorreactores ha permitido la producción comercial de importantes metabolitos como la artemisinina (antimalárico), la taxol (anticancerígeno) y la shikonina (colorante natural y agente terapéutico) [12].

Enseñanza de biotecnología vegetal

La enseñanza de la biotecnología vegetal es un campo en constante evolución que abarca tanto aspectos teóricos como prácticos. La integración de conocimientos en genética, biología molecular e ingeniería permite a los estudiantes comprender los procesos fundamentales de manipulación genética y sus aplicaciones agrícolas [13]. Los programas educativos actuales enfatizan el aprendizaje experimental, incluyendo prácticas de laboratorio donde los estudiantes realizan cultivos *in vitro*, análisis genéticos y técnicas de transformación vegetal [14]. Además, el uso de herramientas digitales y plataformas interactivas ha mejorado la comprensión de conceptos complejos y ha facilitado el acceso a investigaciones actualizadas

Practica 1. Preparación de medio de cultivo y germinación *in vitro* de plantas de tomate de árbol

En esta práctica, se llevará a cabo la preparación del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), un medio nutritivo esencial para el cultivo *in vitro* de plantas. El procedimiento consiste en disolver una mezcla de nutrientes, vitaminas, sales minerales y reguladores de crecimiento en agua destilada, ajustando su pH a un valor adecuado para promover el desarrollo óptimo de los explantes vegetales. Los estudiantes seguirán una serie de pasos que incluyen la

disolución de los componentes del medio, la esterilización del medio mediante autoclave y el ajuste final de pH. Esta preparación permitirá que los estudiantes comprendan la importancia de cada componente del medio en el crecimiento vegetal y la necesidad de mantener condiciones estériles para evitar contaminaciones durante los cultivos. Al final de la práctica, se habrá obtenido un medio de cultivo listo para ser utilizado en la propagación y desarrollo de plantas en condiciones controladas [15].

El procedimiento para la germinación in vitro de semillas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) comienza con la desinfección del material vegetal para evitar contaminaciones durante el cultivo. Las semillas se someten a un protocolo de esterilización que incluye tratamientos con agentes desinfectantes y enjuagues con agua destilada estéril. Luego, se siembran en un medio de cultivo previamente preparado, el cual contiene los nutrientes esenciales para su desarrollo. Las condiciones de incubación, como temperatura, fotoperiodo y humedad, se controlan rigurosamente para favorecer la germinación y el crecimiento de las plántulas. Este método permite obtener plántulas vigorosas y uniformes, facilitando su posterior aclimatación y transferencia a condiciones ex vitro [16].

Fundamentos

La germinación y el cultivo in vitro de plantas van a depender mucho del medio de cultivo en el que se encuentre la planta, pues este contiene los nutrientes, reguladores, agua y fuente de carbono que cada planta necesita [17]. Sin embargo, en el cultivo in vitro es muy difícil realizar generalizaciones porque cada especie y cada tipo de planta varía en cuanto a los requerimientos nutricionales para un crecimiento óptimo in vitro [18]. Es así que no se ha podido formular un medio de cultivo con el que se obtengan los mismos resultados para todo tipo de cultivo in vitro (es decir, sin importar la especie de la planta, el tipo de tejido con el que se trabaja, etc.), aunque se ha logrado desarrollar ciertos medios generales, que brindan buenos resultados en el cultivo de cierto tipo de plantas, este es el caso del medio MS (Murashige y Skoog) el cual es ampliamente usado para regeneración y producción de callo (en plantas no leñosas), ya que posee una fuerte concentración de sales [19].

Componentes del medio de cultivo

Los medios de cultivo están compuestos de 95% de agua, además de componentes esenciales que incluyen: macronutrientes, micronutrientes, azúcar, componentes orgánicos, reguladores de crecimiento y vitaminas [20].

Componentes inorgánicos: Los componentes minerales son muy importantes para la vida de una planta. El magnesio es parte de la clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno es una parte importante de los aminoácidos, proteínas, vitaminas y ácidos nucleicos. El hierro, zinc y molibdeno actúan como cofactores de ciertas enzimas [21]. Además del carbono, hidrógeno y oxígeno, son 12 los elementos considerados esenciales para el crecimiento de la planta: nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno. De esta lista, los 6 primeros se requieren en concentraciones abundantes por lo que se los denomina macroelementos (concentraciones en mM); mientras que los seis últimos se requieren en concentraciones menores por lo que se los conoce como microelementos (concentraciones en μM) [22].

Elementos orgánicos: Las vitaminas son sustancias orgánicas que son parte de enzimas o cofactores para funciones metabólicas esenciales para el desarrollo de las plantas in vivo. La mayor parte de plantas cultivadas in vitro son capaces de sintetizar todas las vitaminas necesarias, pero en cantidades sub-óptimas. Para obtener el crecimiento óptimo es necesario suplementar el medio de cultivo con algunas vitaminas y aminoácidos. Las vitaminas suplementadas son en su mayoría tiamina (B1), niacina (B3), piridoxina (B6) y mio-inositol [23].

Fuente de carbono: Una planta cultivada in vitro requiere una fuente externa de carbono, pues se comporta de manera semiautotrófica ya que su capacidad fotosintética está disminuida. La mayoría de las plantas cultivadas in vitro son incapaces de realizar fotosíntesis por varias razones como, por ejemplo: organización celular y desarrollo de tejidos insuficientes, intercambio gaseoso de CO_2 limitado por el frasco de cultivo, y condiciones ambientales subóptimas [24]. La fuente de carbono más comúnmente utilizada es la sacarosa (azúcar común) en una concentración de 2-5%. Las sales minerales adicionadas al medio de cultivo contribuyen con aproximadamente 20-50% del potencial osmótico del medio, y la sacarosa es responsable del porcentaje restante. Fuentes alternativas de carbono son la glucosa, fructosa, maltosa, sorbitol, entre otros [25].

Reguladores de crecimiento: De acuerdo con el tejido de partida, a la concentración endógena de hormonas y al objetivo que se persiga (brotación de yemas, generación de yemas adventicias, embriogénesis, etc.), puede requerirse agregar al medio de cultivo diferentes concentraciones de auxinas, citoquininas y giberelinas. Algunos de estos reguladores de crecimiento son hormonas, sintetizadas naturalmente por plantas superiores, y otros son compuestos sintéticos [26].

Agente solidificante: De acuerdo con la modalidad del cultivo in vitro, se pueden utilizar medios líquidos, sólidos y semisólidos. El agente gelificante más usado es el agar. El agar es un polisacárido de alto peso molecular que se disuelve en agua a ~65°C y solidifica a ~45°C. Es añadido al medio de cultivo en concentraciones en el rango de 0.5%-1% (peso/volumen). Un medio de cultivo sólido permite colocar al explante en contacto directo con el medio de cultivo y a su vez permanecer aireado. Otros agentes gelificantes que pueden ser usados son el gelrite, el phytigel y la agarosa [27].

Adicionalmente a los componentes mencionados, un medio de cultivo puede contener extracto de levaduras, extracto de plantas, leche de coco, caseína hidrolizada, antioxidantes, antibióticos, fungicidas, carbón activado, etc., dependiendo de circunstancias particulares [28].

Germinación in vitro

Una de las condiciones más importantes para el éxito del cultivo in vitro es la asepsia, la cual se consigue mediante la esterilización del material vegetal, la vidriería, el medio de cultivo y trabajando en el interior de una cámara de flujo [29]. La germinación es el proceso que atraviesa el embrión para formar una planta. Esta etapa ocurre después de la formación de la semilla que ocurre por la fecundación del anterozoide que se desplaza a través del tubo polínico hasta llegar a la oósfera, donde se une al óvulo para dar lugar a la semilla, mientras que el ovario se convierte en el fruto [30].

Sin embargo, para que se dé el proceso de germinación las semillas deben encontrarse en un ambiente con condiciones adecuadas de temperatura y humedad [31]. Además, algunas semillas no germinan inmediatamente, pues tienen que romper el estado de dormancia en el cual deben terminar de madurar o bien eliminar ciertos inhibidores de crecimiento que se acumulan en las

cubiertas seminales [32]. En ocasiones es necesario someter a tratamientos de frío o escarificación, para que estas semillas puedan romper este estado de dormancia. Aunque también puede pasar que las semillas pierdan su viabilidad y ya no germinen más pues estuvieron almacenadas por períodos largos [33].

En ciertas especies, la germinación in vitro representa una técnica de gran utilidad sobre todo por la dificultad que tienen para germinar in vivo. También puede ser una alternativa al cultivo de explantes por la dificultad que representa esta técnica [34].

Objetivo

- Preparar el medio de cultivo MS
- Comprender la importancia de la asepsia en el trabajo de laboratorio, en particular en la preparación de medios de cultivos
- Conocer la composición básica que requiere un medio de cultivo
- Germinar semillas de tomate de árbol in vitro.
- Determinar el porcentaje y tiempo de germinación de semillas de tomate in vitro.

Preparación previa

Antes de la práctica de Preparación de Medio de Cultivo MS, los estudiantes deben revisar los principios fundamentales del cultivo in vitro de plantas, incluyendo la composición y función de los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento y fuentes de carbono en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). Es importante comprender la influencia de estos componentes en el desarrollo de los tejidos vegetales y cómo la modificación de su concentración afecta el crecimiento de los explantes [35].

Además, deben familiarizarse con las técnicas de esterilización de medios y materiales, como la autoclave, la filtración de soluciones sensibles al calor y la manipulación aséptica dentro de la cabina de flujo laminar. Se recomienda leer detalladamente el protocolo de preparación del medio de cultivo, incluyendo los cálculos para la correcta dosificación de los componentes y el ajuste del pH.

Como actividad previa, los estudiantes pueden investigar diferentes formulaciones del medio MS y su aplicación en diversas especies vegetales, así

como identificar los factores que pueden afectar la eficacia del medio de cultivo, como la concentración de reguladores de crecimiento o la presencia de agentes contaminantes. Esta preparación garantizará que los participantes comprendan los fundamentos de la práctica y puedan ejecutar el procedimiento con precisión y seguridad en el laboratorio.

Antes de iniciar la práctica de germinación in vitro de semillas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es fundamental realizar una preparación adecuada para garantizar condiciones estériles y optimizar el proceso. Esto incluye la limpieza y esterilización del material de laboratorio, como matraces, tubos de ensayo, pinzas y medios de cultivo, utilizando autoclave o soluciones desinfectantes.

Las semillas deben someterse a un tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio y enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para eliminar posibles contaminantes. Además, es necesario preparar el medio de cultivo con los nutrientes y reguladores de crecimiento adecuados, ajustando el pH antes de su esterilización. Finalmente, se debe organizar el espacio de trabajo dentro de la cabina de flujo laminar para evitar la contaminación y asegurar el éxito de la práctica.

Procedimiento

Preparación Medio MS

1. Colocar en un vaso de precipitación de 1000ml aproximadamente 250 ml de agua destilada.
2. Pesar la cantidad necesaria de medio MS para preparar un volumen de 1 litro y agregarlo al vaso de precipitación.
3. Agregar sacarosa en una proporción de 30 g por litro de medio.
4. Medir el pH y ajustarlo a 5.8 usando una solución 0.1 M de HCl o NaOH según el caso.
5. Aforar al volumen final requerido (1000 ml)
6. Agregar agar en una proporción de 7 g por litro de medio de cultivo
7. Hervir en horno microondas hasta que se disuelva el agar (3-4 minutos)
8. Enfriar el medio y repartirlo en frascos con tapa
9. Esterilizar en el autoclave

10. Mantener los frascos en estanterías hasta su uso.

Germinación in vitro

1. Este proceso se realiza dentro de la cámara de flujo laminar:
2. Colocar las semillas por 3 minutos en alcohol 70%
3. Lavarlas en agua destilada estéril
4. Transferirlas por 15 – 20 minutos a hipoclorito de sodio 2.5% + 4 o 5 gotas de Tween 20
5. Realizar 4 – 5 lavados en agua destilada estéril
6. Sembrarlas en medio de cultivo MS con pinzas flameadas (15-20 semillas / frasco)
7. Incubar en el cuarto de cultivo
8. Realizar observaciones periódicas para determinar el tiempo y porcentaje de germinación. Adicionalmente realizar observaciones y registrar la contaminación del material vegetal

Resultados de aprendizaje

El estudiante identifica los componentes esenciales de un medio de cultivo in vitro y comprende su función en el crecimiento vegetal. Explica la importancia de la asepsia en el proceso de germinación in vitro y aplica técnicas adecuadas para garantizarla. Además, describe el proceso de germinación de semillas, considerando las condiciones necesarias y los factores que influyen en la ruptura de la dormancia. Por último, analiza la utilidad de la germinación in vitro como una alternativa para especies con dificultades para germinar in vivo.

Normas de seguridad

Precauciones generales del taller o laboratorio.

- Usar bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad cuando sea necesario.
- Mantener el área de trabajo limpia y libre de objetos innecesarios.
- Seguir estrictamente las instrucciones del docente o responsable del laboratorio.
- No ingerir alimentos ni bebidas dentro del laboratorio.

- Identificar las salidas de emergencia y ubicar los equipos de seguridad, como extintores y botiquines.

Manejo seguro de herramientas y equipos.

- Verificar el estado de los instrumentos antes de su uso para evitar accidentes.
- Manejar la cámara de presión con precaución, asegurándose de que esté bien cerrada antes de aplicar presión.
- No forzar ni modificar los equipos sin autorización.
- Utilizar las herramientas de medición de acuerdo con las indicaciones del protocolo.
- Al finalizar la práctica, limpiar y guardar correctamente todos los materiales y equipos.

Normas para el manejo de sustancias peligrosas

- Manipular soluciones o reactivos con guantes y evitar el contacto directo con la piel.
- Identificar correctamente las sustancias químicas utilizadas y seguir las hojas de seguridad correspondientes.
- No mezclar sustancias sin conocer sus reacciones potenciales.
- En caso de derrame, informar inmediatamente y seguir los procedimientos establecidos para su contención y limpieza.
- Desechar residuos de manera adecuada, según las normativas del laboratorio

Procedimientos de emergencia

- En caso de accidente o exposición a sustancias peligrosas, informar de inmediato al instructor o supervisor.
- Si ocurre un derrame químico, evacuar la zona y aplicar el protocolo de limpieza.
- En caso de incendio, utilizar los extintores designados y evacuar el área siguiendo las rutas de emergencia.
- Para cortes o quemaduras, lavar la zona afectada y acudir al botiquín de primeros auxilios.

- Mantener la calma y seguir las indicaciones del personal responsable en cualquier situación de emergencia.

Cuestionario

- ¿Por qué es fundamental la asepsia en el proceso de germinación in vitro?
- Menciona tres componentes esenciales del medio de cultivo in vitro y explica su función.
- ¿Cuál es la principal fuente de carbono utilizada en el cultivo in vitro y por qué es necesaria?
- ¿Qué función cumplen los reguladores de crecimiento en el cultivo in vitro? Da un ejemplo de cada tipo.
- ¿Por qué algunas semillas requieren tratamientos como el frío o la escarificación para germinar?

Practica 2. Encapsulación de embriones somáticos

El proceso de encapsulación de embriones somáticos y meristemos axilares consiste en la inmersión de los tejidos vegetales en una solución de alginato de sodio, seguida de su solidificación en una solución de calcio para formar una cubierta protectora similar a la de una semilla natural. Para ello, primero se seleccionan y aíslan los embriones somáticos de zanahoria y los meristemos axilares de camote bajo condiciones asépticas.

Posteriormente, se preparan las soluciones de encapsulación y se procede a la formación de las esferas gelificadas mediante la técnica de goteo en cloruro de calcio. Una vez encapsulados, los tejidos pueden ser almacenados en condiciones de refrigeración para evaluar su viabilidad y tasa de germinación tras diferentes periodos de conservación. Este procedimiento permite mejorar la manipulación y el transporte del material vegetal, facilitando su propagación y uso en programas de mejoramiento genético y producción agrícola.

Fundamentos

Las semillas representan el principal órgano reproductivo en las plantas terrestres, desempeñando funciones esenciales como la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones vegetales. Además, contribuyen a la regeneración

de bosques y participan en la sucesión ecológica. Desde una perspectiva utilitaria, constituyen una fuente alimenticia fundamental tanto para humanos como para animales, ya sea de manera directa o como materia prima en diversas aplicaciones industriales [36].

En este contexto, la semilla es responsable de la generación de nuevas plantas, ya que almacena nutrientes y absorbe el agua circundante, permitiendo el inicio del proceso de germinación. Durante este proceso, primero emerge la raíz, seguida del desarrollo del tallo y la aparición de los cotiledones, momento en el cual se forma la plántula [37].

El endospermo de la semilla proporciona carbohidratos, proteínas y lípidos que favorecen la germinación. No obstante, existen especies vegetales con un endospermo reducido o ausente, lo que prolonga la germinación o requiere la formación de asociaciones simbióticas con otros organismos. Para abordar esta limitación, investigadores y productores han desarrollado un sistema de propagación alternativo basado en semillas sintéticas o artificiales, que cumplen funciones similares a las semillas naturales [38].

El componente esencial en la fabricación de semillas artificiales es el alginato de sodio, un polisacárido extraído de algas marinas, caracterizado por su rigidez, elasticidad y flexibilidad. Una de sus propiedades más destacadas es su capacidad para formar geles al entrar en contacto con soluciones ricas en calcio, lo que facilita su aplicación en biotecnología vegetal [39].

A diferencia de las semillas convencionales, las semillas sintéticas contienen un embrión somático generado mediante embriogénesis somática a partir de tejidos cultivados in vitro. Además, incluyen un endospermo y una cubierta protectora, ambos de origen artificial [40].

El concepto de semilla sintética fue introducido por Murashige, aunque su aplicación efectiva no se consolidó sino hasta la década de 1980. Entre los principales beneficios de esta tecnología destaca la reducción de costos en la propagación de especies vegetales [41]. Otras ventajas incluyen la preservación de la estructura de la semilla, su pequeño tamaño, la rápida propagación y la posibilidad de obtenerlas fuera de su temporada natural en condiciones controladas [42].

La viabilidad de las semillas artificiales depende de las condiciones de almacenamiento. Según el tiempo de conservación, se pueden emplear métodos

a bajas temperaturas para periodos cortos y medios, mientras que para la preservación a largo plazo, la inmersión en nitrógeno líquido es la opción más utilizada [43].

En biotecnología, la encapsulación de embriones somáticos en semillas sintéticas ha cobrado relevancia en la propagación masiva de especies de alto valor comercial [44]. Además de embriones somáticos, se han logrado avances en la encapsulación de raíces, brotes y yemas con el fin de regenerar plantas medicinales [45]

La encapsulación se realiza principalmente en brotes axilares y apicales que contienen meristemos radiculares, aunque también se pueden encapsular brotes sin inducción de raíces. Ejemplos de ello son los brotes de banana y manzana, en los cuales la formación de raíces puede inducirse con ácido indolbutírico. Asimismo, se ha logrado encapsular protocormos de diversas especies de orquídeas, mejorando la salud de las plántulas y su capacidad de adaptación a distintos sustratos durante su establecimiento en condiciones ex vitro [46].

Objetivo

Diseñar un protocolo para el encapsulamiento de embriones somáticos de zanahoria y analizar su respuesta al almacenamiento en condiciones de baja temperatura.

Analizar la efectividad del encapsulamiento de meristemos axilares de camote y determinar el impacto del almacenamiento en frío.

Preparación previa

Antes de realizar la práctica de encapsulación de embriones somáticos y meristemos axilares, es fundamental llevar a cabo una preparación adecuada que garantice el éxito del procedimiento. En primer lugar, se debe investigar la fisiología y características de los tejidos vegetales a encapsular, así como los principios básicos de la embriogénesis somática y la conservación de meristemos. Además, es necesario familiarizarse con las técnicas de trabajo en condiciones asépticas, ya que la contaminación microbiana puede afectar el desarrollo del material encapsulado. También se deben preparar los medios de cultivo adecuados, asegurando la correcta concentración de nutrientes, reguladores de

crecimiento y agentes gelificantes como el alginato de sodio. Finalmente, se recomienda revisar los protocolos de encapsulación y almacenamiento en frío para comprender el procedimiento y anticipar posibles dificultades durante la práctica.

Procedimiento

Preparación Medio MS

1. Pesar los componentes del medio Murashige y Skoog (MS) modificado por Jarret (1991) según la formulación establecida.
2. Ajustar el pH del medio a 5.8 utilizando NaOH o HCl.
3. Agregar 1.8 g/L de Phytigel® si se requiere solidificación.
4. Esterilizar el medio en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos.
5. Distribuir el medio estéril en frascos de cultivo y dejar solidificar bajo condiciones estériles.
6. Extracción y Preparación de Meristemos de Camote
7. Seleccionar vitro plántulas de camote en etapa de multiplicación (subcultivo 2).
8. Bajo condiciones estériles en la cabina de flujo laminar, cortar los meristemos con bisturí estéril.
9. Transferir los meristemos seleccionados al medio de cultivo MS modificado para camote.

Encapsulación de Meristemos

1. Preparar una solución de alginato de sodio estéril.
2. Sumergir los meristemos en la solución de alginato.
3. Transferir los meristemos con alginato a una solución de cloruro de calcio para gelificación.
4. Dejar en contacto durante el tiempo requerido para la formación de cápsulas.
5. Lavar las cápsulas con agua destilada estéril y transferirlas a frascos con medio de cultivo MS modificado.
6. Almacenamiento en Frío de Meristemos Encapsulados
7. Para los tratamientos con refrigeración, colocar las cápsulas en medio 1/4 MS.
8. Almacenar a 4 °C durante 7, 14, 21 o 28 días, según el tratamiento.

9. Para el tratamiento sin refrigeración, transferir inmediatamente los meristemos encapsulados al medio MS modificado y colocarlos en la cámara de crecimiento.
10. Germinación y Evaluación de Brotación
11. Transferir los meristemos encapsulados a frascos con medio MS modificado para camote.
12. Colocar los frascos en la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (24-26 °C, 70 % de humedad, 16 horas luz a 2 klx).
13. Evaluar el porcentaje de brotación a los 14 días de incubación.
14. Análisis de Datos
15. Registrar el porcentaje de brotación de cada tratamiento.
16. Realizar análisis estadístico utilizando SAS 9.3, aplicando ANOVA y prueba de separación de medias de Duncan con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

Resultados de aprendizaje

El estudiante comprende el proceso de encapsulación de embriones somáticos, identificando los materiales y reactivos necesarios, como el alginato de sodio y las soluciones de calcio. Aplica de manera precisa las técnicas de encapsulación para formar cápsulas viables que protejan y faciliten la propagación de las plantas. Además, evalúa la viabilidad de las semillas sintéticas al analizar la integridad de la cápsula, la capacidad de germinación y las condiciones óptimas de almacenamiento. Finalmente, relaciona la encapsulación con sus aplicaciones en biotecnología vegetal, reconociendo su importancia en la propagación masiva de especies de alto valor comercial y en la conservación de germoplasma.

Normas de seguridad

Precauciones generales del taller o laboratorio.

- Usar bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad cuando sea necesario.
- Mantener el área de trabajo limpia y libre de objetos innecesarios.
- Seguir estrictamente las instrucciones del docente o responsable del laboratorio.

- No ingerir alimentos ni bebidas dentro del laboratorio.
- Identificar las salidas de emergencia y ubicar los equipos de seguridad, como extintores y botiquines.

Manejo seguro de herramientas y equipos.

- Verificar el estado de los instrumentos antes de su uso para evitar accidentes.
- Manejar la cámara de presión con precaución, asegurándose de que esté bien cerrada antes de aplicar presión.
- No forzar ni modificar los equipos sin autorización.
- Utilizar las herramientas de medición de acuerdo con las indicaciones del protocolo.
- Al finalizar la práctica, limpiar y guardar correctamente todos los materiales y equipos.

Normas para el manejo de sustancias peligrosas

- Manipular soluciones o reactivos con guantes y evitar el contacto directo con la piel.
- Identificar correctamente las sustancias químicas utilizadas y seguir las hojas de seguridad correspondientes.
- No mezclar sustancias sin conocer sus reacciones potenciales.
- En caso de derrame, informar inmediatamente y seguir los procedimientos establecidos para su contención y limpieza.
- Desechar residuos de manera adecuada, según las normativas del laboratorio

Procedimientos de emergencia

- En caso de accidente o exposición a sustancias peligrosas, informar de inmediato al instructor o supervisor.
- Si ocurre un derrame químico, evacuar la zona y aplicar el protocolo de limpieza.
- En caso de incendio, utilizar los extintores designados y evacuar el área siguiendo las rutas de emergencia.
- Para cortes o quemaduras, lavar la zona afectada y acudir al botiquín de primeros auxilios.

- Mantener la calma y seguir las indicaciones del personal responsable en cualquier situación de emergencia.

Cuestionario

- ¿Cuál es la función principal de las semillas en las plantas terrestres y qué papel juegan en la sucesión ecológica?
- ¿Qué componentes nutricionales proporciona el endospermo de una semilla y cuál es su importancia durante la germinación?
- ¿Qué es una semilla sintética y qué elemento esencial se utiliza en su fabricación?
- Menciona dos ventajas de las semillas sintéticas en comparación con las semillas convencionales.
- ¿Por qué la encapsulación de embriones somáticos es importante en la biotecnología vegetal? Da un ejemplo de su aplicación

Referencias bibliográficas

- [1] R. M. Goodman, "Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications," 2nd ed., Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2015.
- [2] M. R. Davey and P. Anthony, *Plant Cell Culture: Essential Methods*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2010.
- [3] G. Haberlandt, "Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen," *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse*, vol. 111, pp. 69–92, 1902.
- [4] F. Skoog and C. O. Miller, "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro," *Symposium on Quantitative Biology*, vol. 11, pp. 118–130, 1957.
- [5] M. De Block et al., "Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny," *The EMBO Journal*, vol. 3, no. 8, pp. 1681–1689, 1984.
- [6] J. Doudna and E. Charpentier, "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9," *Science*, vol. 346, no. 6213, pp. 1258096-1–1258096-9, 2014.
- [7] J. Hammond, P. McGarvey, and V. Yusibov, *Plant Biotechnology: New Products and Applications*, Berlin, Germany: Springer, 2000.
- [8] P. E. Read and M. A. Preece, *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd ed., Dordrecht, Netherlands: Springer, 2013.
- [9] I. Karp, "Somaclonal Variation as a Tool for Crop Improvement," *Euphytica*, vol. 85, no. 1, pp. 295–302, 1995.
- [10] R. Verpoorte and A. W. Alfermann, *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, Dordrecht, Netherlands: Springer, 2000.
- [11] S. Oksman-Caldentey and D. Inze, "Plant Cell Factories in the Post-Genomic Era: New Ways to Produce Designer Secondary Metabolites," *Trends in Plant Science*, vol. 9, no. 9, pp. 433–440, 2004.
- [12] R. Verpoorte, A. W. Alfermann, and T. S. Johnson, *Plant Biotechnology for the Production of Natural Products*, Berlin, Germany: Springer, 2007.
- [13] H. J. Klee and R. F. Davis, *Biotechnology in Agriculture and Food Processing*, 2nd ed., New York, NY: CRC Press, 2012.
- [14] D. P. Clark and N. Pazdernik, *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*, 2nd ed., London, UK: Academic Press, 2016.

- [15] T. Murashige y F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497, 1962.
- [16] J. P. Smith y R. H. Jones, *In Vitro Plant Culture Techniques*, 2^a ed., New York: Academic Press, 2018.
- [17] R. A. Dixon, *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, Oxford: IRL Press, 2003.
- [18] M. George y P. Sherrington, *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3^a ed., Dordrecht: Springer, 2004.
- [19] E. Thorpe, "Tissue culture of woody plants," *Plant Cell Reports*, vol. 21, no. 4, pp. 457-463, 2002.
- [20] O. L. Gamborg, R. A. Miller y K. Ojima, "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells," *Experimental Cell Research*, vol. 50, no. 1, pp. 151-158, 1968.
- [21] I. S. Curtis y J. Power, "Mineral nutrition in plant tissue culture," *Journal of Plant Nutrition*, vol. 32, no. 5, pp. 849-857, 2009.
- [22] P. Bhojwani y M. Razdan, *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, 2^a ed., Amsterdam: Elsevier, 1996.
- [23] F. A. Blazich, "Vitamins and their role in plant tissue culture," *Horticultural Reviews*, vol. 6, pp. 19-38, 2005.
- [24] M. T. Thorpe, "Carbon source and their effects on in vitro plant growth," *Plant Physiology*, vol. 155, no. 2, pp. 356-364, 2011.
- [25] P. Debergh y R. Read, "Carbon sources and their role in plant tissue culture," *Journal of Plant Biotechnology*, vol. 10, no. 3, pp. 245-259, 2003.
- [26] S. Gaspar et al., "Plant hormones and their influence on tissue culture," *Plant Growth Regulation*, vol. 20, no. 3, pp. 272-283, 2001.
- [27] J. H. Heller, "Gelifying agents in plant tissue culture," *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 39, no. 2, pp. 56-60, 2003.
- [28] A. K. Gupta, *Plant Tissue Culture Engineering*, Berlin: Springer, 2008.
- [29] R. N. Trigiano y D. J. Gray, *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*, 2^a ed., Boca Raton: CRC Press, 2011.
- [30] M. J. Chrispeels y D. E. Sadava, *Plant Biology*, 4^a ed., Boston: Jones and Bartlett Publishers, 2014.

- [31] J. R. Harten, *Fisiología de Semillas: Principios y Aplicaciones*, 3^a ed. Madrid, España: Ediciones Agrícolas, 2020.
- [32] L. Gómez-Pando, *Biotecnología Vegetal: Principios y Aplicaciones*, Lima, Perú: Fondo Editorial, 2019.
- [33] P. Martínez y C. Silva, "Factores que afectan la viabilidad de semillas almacenadas," *Revista de Ciencias Agrícolas*, vol. 12, no. 2, pp. 45-52, 2021.
- [34] M. Torres, *Cultivo In Vitro de Plantas: Fundamentos y Aplicaciones*, 2^a ed. Bogotá, Colombia: Editorial Universitaria, 2018.
- [35] R. A. Murashige y F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497, 1962.
- [36] J. Bewley, K. Bradford, H. Hilhorst, y H. Nonogaki, *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd ed. New York: Springer, 2013.
- [37] M. Black y J. D. Bewley, *Seed Technology and Its Biological Basis*, Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000.
- [38] R. L. Redenbaugh et al., "Synthetic seed technology," *Horticultural Reviews*, vol. 15, pp. 1-44, 1993.
- [39] S. Naik y K. D. Chand, "Sodium alginate and its applications in plant biotechnology," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 124, no. 5, pp. 423-431, 2012.
- [40] T. Komatsuda et al., "Somatic embryogenesis and synthetic seed technology," *Plant Cell Reports*, vol. 18, no. 1, pp. 21-25, 1998.
- [41] T. Murashige, "Plant propagation through tissue cultures," *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 25, pp. 135-166, 1974.
- [42] R. L. Redenbaugh, "Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed technology," *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 27, no. 3, pp. 109-115, 1991.
- [43] P. Finkle y U. Ulrich, "Cryopreservation of plant cells and organs," *Cryobiology*, vol. 17, no. 2, pp. 437-450, 1980.
- [44] A. Malik et al., "Advances in synthetic seed technology for mass propagation of plants," *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, pp. 112-123, 2015.
- [45] S. Rai et al., "Synthetic seeds: an alternative for plant conservation," *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 4, pp. 325-347, 2011.

[46] S. Pradhan et al., "Encapsulation and in vitro conservation of orchid protocorms," *Journal of Plant Biotechnology*, vol. 14, no. 2, pp. 67-74, 2018.

CAPÍTULO V

Introducción a la Biotecnología de Alimentos



Antecedentes

La biotecnología de alimentos es una disciplina que aplica los principios de la biotecnología para la producción, mejora y control de alimentos mediante el uso de organismos vivos o sus componentes. Esta área abarca una amplia variedad de procesos que incluyen fermentaciones microbianas, modificación enzimática de compuestos alimentarios, ingeniería genética aplicada a cultivos y producción de aditivos alimentarios. Su objetivo principal es optimizar la calidad, seguridad y funcionalidad de los alimentos, asegurando su valor nutricional y su conservación [1].

Los avances en la biotecnología de alimentos han permitido el desarrollo de productos con mejores características sensoriales, mayor estabilidad y beneficios para la salud. Entre estos avances, se destacan el uso de enzimas en la industria alimentaria para mejorar la digestibilidad y textura de los alimentos, así como la fermentación de productos lácteos para la obtención de probióticos y la conservación de productos perecederos. Estas aplicaciones han transformado la industria alimentaria, reduciendo el desperdicio y promoviendo alimentos más saludables [2].

Extracción y Caracterización de Enzimas Digestivas

Las enzimas digestivas son proteínas especializadas que catalizan la degradación de macromoléculas en nutrientes más simples, facilitando su absorción en el organismo. En la industria alimentaria, estas enzimas se utilizan para la producción de alimentos de fácil digestión, la mejora de la textura de productos procesados y la optimización de procesos industriales, como la hidrólisis de proteínas en la elaboración de fórmulas infantiles y suplementos proteicos [3].

El estudio de las enzimas digestivas es fundamental para comprender su función y optimizar su aplicación en la industria de alimentos. La práctica de laboratorio sobre extracción y caracterización de estas enzimas permite a los estudiantes conocer técnicas de aislamiento, purificación y análisis enzimático, además de evaluar su actividad en diferentes condiciones. La importancia de esta práctica radica en la posibilidad de utilizar enzimas en el desarrollo de alimentos

funcionales y terapéuticos para poblaciones con necesidades nutricionales específicas [4].

Fermentación Láctica de Productos Lácteos

La fermentación láctica es un proceso biotecnológico clave en la producción de productos lácteos fermentados como yogur, kéfir y quesos. En este proceso, bacterias ácido-lácticas (BAL), como *Lactobacillus* y *Streptococcus*, convierten la lactosa en ácido láctico, lo que reduce el pH del producto y mejora su estabilidad y conservación. Además, estas bacterias pueden conferir propiedades probióticas, beneficiando la microbiota intestinal y fortaleciendo el sistema inmunológico [5].

El estudio de la fermentación láctica en laboratorio permite analizar la influencia de variables como temperatura, tiempo de incubación y concentración bacteriana en la calidad del producto final. Durante la práctica, los estudiantes pueden medir parámetros como el pH, la acidez titulable y la concentración de bacterias viables para evaluar la eficiencia del proceso. Este conocimiento es esencial para la optimización de la producción industrial de alimentos fermentados y para el desarrollo de nuevos productos con características mejoradas [6].

Importancia de la Biotecnología de Alimentos en la Industria

Ambas prácticas de laboratorio representan aplicaciones esenciales en la industria de alimentos. La extracción y caracterización de enzimas digestivas permite desarrollar procesos más eficientes y alimentos con propiedades funcionales específicas. Por otro lado, la fermentación láctica es clave en la producción de alimentos con mayor vida útil y beneficios para la salud. Estas aplicaciones no solo mejoran la calidad y seguridad de los alimentos, sino que también impulsan la sostenibilidad y la innovación en la industria alimentaria [7].

La biotecnología de alimentos continuará desempeñando un papel fundamental en la mejora de la producción alimentaria, optimizando procesos y

desarrollando soluciones innovadoras para enfrentar los desafíos de la seguridad alimentaria y la nutrición global.

Práctica 1. Extracción y caracterización de enzimas digestivas

Fundamentación

Las enzimas digestivas desempeñan un papel clave en la descomposición de macromoléculas en los alimentos, facilitando su absorción y digestión. Entre las principales enzimas digestivas están la amilasa (degrada almidón), la proteasa (degrada proteínas) y la lipasa (degrada lípidos). En esta práctica, se extraerán y caracterizarán algunas de estas enzimas a partir de fuentes naturales como la saliva, el páncreas de cerdo o frutas como la papaya y la piña [8].

Objetivo

Extraer y evaluar la actividad enzimática de amilasas, proteasas o lipasas a partir de fuentes naturales, y analizar su comportamiento bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.

Preparación previa

- Revisión sobre la función y estructura de las enzimas digestivas.
- Conocer los principios de espectrofotometría para la medición de actividad enzimática.
- Aprender técnicas básicas de extracción y purificación enzimática [9].

Procedimiento

Parte 1: Extracción de enzimas

1. Selección de la fuente enzimática:

- Amilasa: Saliva humana o extracto de cebada germinada.
- Proteasa: Jugo de piña (bromelina), papaya (papaína) o extracto de páncreas de cerdo.
- Lipasa: Extracto de páncreas de cerdo o germen de trigo [10].
- Preparación del extracto enzimático:

- Triturar la muestra en un mortero con 10 mL de buffer fosfato 0.1 M (pH 7.0).
- Filtrar la mezcla con papel de filtro o centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Recuperar el sobrenadante que contiene la enzima y almacenarlo en hielo para evitar la desnaturalización [11].

Parte 2: Caracterización de la actividad enzimática

A. Medición de actividad de amilasa (degradación de almidón)

1. Preparar una solución de almidón al 1% en agua destilada.
2. Mezclar 1 mL de extracto enzimático con 2 mL de la solución de almidón y dejar reaccionar a 37 °C durante 10 minutos.
3. Agregar 1 mL de reactivo de Lugol (yodo y yoduro de potasio) y observar el cambio de color:
4. Azul oscuro: Almidón sin degradar (baja actividad enzimática).
5. Amarillo claro: Almidón degradado (alta actividad enzimática).
6. Medir la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro para cuantificar la actividad [12].

B. Medición de actividad de proteasa (hidrólisis de caseína)

1. Preparar una solución de caseína al 1% en buffer fosfato pH 7.0.
2. Mezclar 1 mL de extracto enzimático con 2 mL de solución de caseína y dejar reaccionar a 37 °C durante 15 minutos.
3. Agregar 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para detener la reacción y precipitar las proteínas no hidrolizadas.
4. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos y medir la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Un mayor valor de absorbancia indica mayor actividad proteolítica [13].

C. Medición de actividad de lipasa (hidrólisis de triglicéridos)

1. Usar una solución de aceite vegetal emulsionado con Tween-80 como sustrato.
2. Mezclar 1 mL de extracto enzimático con 2 mL de emulsión de aceite y dejar reaccionar a 37 °C por 30 minutos.
3. Agregar 1 mL de fenolftaleína como indicador de pH y titular con NaOH 0.1 N para cuantificar los ácidos grasos liberados.

4. Un mayor volumen de NaOH consumido indica mayor actividad lipasa [14].

Parte 3: Evaluación de condiciones óptimas de la enzima

1. **Efecto del pH:** Preparar soluciones tampón de diferentes valores de pH (5, 7 y 9) y repetir la prueba de actividad enzimática para cada caso.
2. **Efecto de la temperatura:** Realizar la reacción enzimática a diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 37°C y 60°C) para determinar el rango óptimo de funcionamiento.

Resultados de aprendizaje

- Comprender la importancia de las enzimas digestivas en la biotecnología de alimentos.
- Adquirir habilidades prácticas en la extracción y caracterización de enzimas.
- Analizar la influencia del pH y la temperatura en la actividad enzimática.

Normas de seguridad

- Usar guantes y gafas de seguridad al manipular reactivos.
- Evitar el contacto con muestras biológicas crudas.
- Desinfectar correctamente el área de trabajo tras la práctica.

Cuestionario

- ¿Cuál es la función de la amilasa, la proteasa y la lipasa en la digestión de alimentos?
- ¿Cómo afecta la temperatura a la actividad enzimática?
- ¿Por qué es importante medir el pH óptimo de una enzima?
- ¿Cómo se pueden aplicar estas enzimas en la industria alimentaria?

Práctica 2. Fermentación láctica de productos lácteos

Fundamentación

La fermentación láctica es un proceso biotecnológico en el que bacterias ácido-lácticas (BAL), como *Lactobacillus* y *Streptococcus*, convierten la lactosa

en ácido láctico. Este proceso es clave en la producción de productos lácteos fermentados como yogur, kéfir y queso, ya que mejora su textura, sabor y conservación. Además, la fermentación láctica aporta beneficios probióticos y aumenta la biodisponibilidad de nutrientes en los alimentos [15].

Objetivo

Observar y analizar el proceso de fermentación láctica en productos lácteos, evaluando la producción de ácido láctico y el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones.

Preparación previa

- Investigar el metabolismo de las bacterias ácido-lácticas.
- Conocer las condiciones óptimas para la fermentación láctica.
- Aprender técnicas básicas de análisis de pH, acidez titulable y crecimiento bacteriano [16].

Procedimiento

Parte 1: Preparación del cultivo y medio de fermentación

1. Selección de la cepa bacteriana:

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (para yogur).
- *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* (para kéfir).

2. Preparación del medio de cultivo:

- Calentar 500 mL de leche pasteurizada a 42°C.
- Agregar 2% de leche en polvo para mejorar la consistencia del producto final.
- Inocular con un cultivo iniciador comercial o una porción de yogur/kéfir previamente fermentado.
- Mezclar homogéneamente y dividir en frascos estériles.

Parte 2: Fermentación y análisis de parámetros

A. Proceso de fermentación

1. Incubar las muestras a 42°C por 6-8 horas para yogur o a 25°C por 24 horas para kéfir.

2. Realizar mediciones cada 2 horas para evaluar los cambios en pH y acidez.
3. Al final del período de fermentación, refrigerar las muestras a 4°C para detener la actividad bacteriana.

B. Medición de pH y acidez titulable

1. Extraer 10 mL de la muestra fermentada.
2. Medir el pH con un potenciómetro digital.
3. Para la acidez titulable:
 - Tomar 10 mL de la muestra y agregar 3 gotas de fenolftaleína.
 - Titular con NaOH 0.1 N hasta que aparezca un color rosa tenue persistente.
 - Registrar el volumen consumido y calcular la acidez como % de ácido láctico:

$$\text{Acidez (\% ácido láctico)} = \frac{\text{mL de NaOH} \times 0.09}{\text{volumen de muestra en mL}} \times 100$$

4. Comparar los valores de pH y acidez con muestras comerciales [17].

C. Evaluación del crecimiento bacteriano

1. Diluir una muestra de 1 mL en 9 mL de solución salina estéril (1:10).
2. Realizar diluciones seriadas hasta 10^{-6} .
3. Sembrar 100 µL de cada dilución en placas con agar MRS.
4. Incubar a 37°C por 48 horas y contar las colonias formadas.
5. Expresar los resultados en UFC/mL [18].

Parte 3: Evaluación sensorial (opcional)

2. Evaluar las muestras fermentadas en términos de aroma, textura y sabor.
3. Comparar con productos comerciales mediante una prueba de preferencia simple.

Resultados de aprendizaje

- Comprender el proceso de fermentación láctica en productos lácteos.
- Evaluar parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en productos fermentados.

- Identificar la relación entre el crecimiento bacteriano y la producción de ácido láctico. Normas de seguridad
- Usar guantes y gafas de seguridad al manipular cultivos bacterianos.
- Desinfectar correctamente el área de trabajo y los materiales utilizados.
- No ingerir muestras experimentales sin previo control de calidad.

Cuestionario

- ¿Cuál es el rol de las bacterias ácido-lácticas en la fermentación de productos lácteos?
- ¿Cómo influye la temperatura en la velocidad de fermentación?
- ¿Por qué es importante medir la acidez titulable en productos fermentados?
- ¿Cómo afecta la fermentación láctica la conservación de los productos lácteos?

Referencias bibliográficas

- [1] A. K. Rai and M. C. Tamang, "Biotechnology in Food Processing: Innovations and Applications," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 56, no. 4, pp. 1231–1245, 2020.
- [2] F. Mozzi, R. R. Raya y G. M. Vignolo, *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell, 2010.
- [3] P. J. Whitehurst y M. van Oort, *Enzymes in Food Technology*, 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010.
- [4] R. J. Hebert, "Applications of Enzymes in Food Processing," *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 12, no. 1, pp. 305–328, 2021.
- [5] A. Y. Tamime y R. K. Robinson, *Yoghurt: Science and Technology*, 3rd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2007.
- [6] B. Holzapfel, "Advances in the Cultivation and Enumeration of Probiotic Bacteria," *Microbial Biotechnology*, vol. 14, no. 2, pp. 402–415, 2021.
- [7] L. R. McFarland, "Recent Developments in Lactic Acid Fermentation for Dairy Applications," *Food Biotechnology*, vol. 35, no. 3, pp. 215–230, 2022.
- [8] J. Polaina y A. P. MacCabe, *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2007.
- [9] P. F. Stanbury, A. Whitaker y S. J. Hall, *Principles of Fermentation Technology*, 2nd ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1995.
- [10] T. C. Montoya, G. P. Osorio y C. A. Morales, "Purificación y caracterización de enzimas digestivas de origen natural," *Revista de Biotecnología Alimentaria*, vol. 8, no. 2, pp. 35–47, 2021.
- [11] A. M. Smith y J. R. van Staden, "Extraction and analysis of plant amylases," *Journal of Plant Biochemistry*, vol. 56, no. 3, pp. 412–420, 2019.
- [12] R. M. Berg, J. L. Tymoczko y L. Stryer, *Biochemistry*, 8th ed. New York, USA: W. H. Freeman, 2015.
- [13] H. A. G. Hofmann y K. B. Jonas, "Protease activity in natural food sources," *Food Science Journal*, vol. 34, no. 4, pp. 85–92, 2020.
- [14] M. A. Villalba, P. R. González y L. C. Méndez, "Análisis de la actividad lipolítica en alimentos procesados," *Revista de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, vol. 12, no. 1, pp. 77–88, 2022.

- [15] F. Mozzi, R. R. Raya y G. M. Vignolo, *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell, 2010.
- [16] A. Y. Tamime y R. K. Robinson, *Yoghurt: Science and Technology*, 3rd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2007.
- [17] L. R. McFarland, "Determination of titratable acidity in dairy products," *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 4, pp. 2345–2357, 2019.
- [18] B. Holzapfel, "Advances in the cultivation and enumeration of probiotic bacteria," *Microbial Biotechnology*, vol. 14, no. 2, pp. 402–415, 2021.

CAPÍTULO VI

Biotecnología Farmacéutica



Historia de la Biofarmacología

La biotecnología farmacéutica, un campo interdisciplinario que fusiona los principios de la biología, la química y la ingeniería, ha surgido como una fuerza transformadora en la industria farmacéutica moderna [1]. Desde el descubrimiento de la penicilina en la década de 1920, la biotecnología ha revolucionado la forma en que se desarrollan, producen y administran los medicamentos [2]. En el siglo XXI, la biotecnología farmacéutica ha alcanzado nuevas alturas, impulsada por los avances en la genómica, la proteómica y la biología sintética [3].

La biotecnología farmacéutica se define como el uso de organismos vivos o sus componentes para producir productos farmacéuticos terapéuticos y de diagnóstico. Esta disciplina abarca una amplia gama de aplicaciones, desde el desarrollo de terapias basadas en proteínas y anticuerpos monoclonales hasta la producción de vacunas y terapias génicas [4]. La biotecnología farmacéutica también ha desempeñado un papel crucial en la producción de insulina recombinante, hormonas de crecimiento y otros productos biológicos esenciales [5].

Uno de los mayores logros de la biotecnología farmacéutica ha sido el desarrollo de terapias dirigidas. A diferencia de los medicamentos tradicionales, que a menudo tienen efectos secundarios no deseados, las terapias dirigidas se centran en objetivos moleculares específicos asociados con una enfermedad en particular [6]. Esto ha llevado a tratamientos más eficaces y personalizados para enfermedades diversas, como el cáncer, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades infecciosas [7].

La biotecnología farmacéutica también ha impulsado la innovación en el campo de las vacunas. Las vacunas recombinantes, que utilizan técnicas de ingeniería genética para producir antígenos vacunales, han demostrado ser más seguras y eficaces que las vacunas tradicionales [8]. La biotecnología farmacéutica también ha facilitado el desarrollo de vacunas contra enfermedades que antes se consideraban intratables, como el VIH y el cáncer [9]. Además de su impacto en el desarrollo de medicamentos y vacunas, la biotecnología farmacéutica ha revolucionado la producción de productos biológicos.

Los biorreactores, que son sistemas de cultivo a gran escala que utilizan células vivas para producir productos biológicos, han permitido la producción eficiente y rentable de terapias basadas en proteínas y anticuerpos monoclonales [10]. La biotecnología farmacéutica también ha mejorado la calidad y la seguridad de los productos biológicos, lo que ha llevado a tratamientos más seguros y eficaces para los pacientes [11].

A pesar de sus numerosos logros, la biotecnología farmacéutica enfrenta desafíos importantes. Uno de los principales desafíos es el alto costo de desarrollo y producción de productos biológicos. Los productos biológicos son más complejos de producir que los medicamentos tradicionales, lo que se traduce en costos más elevados [12]. Otro desafío es la regulación de los productos biológicos, que requiere enfoques especializados debido a su complejidad y variabilidad propia [13].

En los últimos años, la biotecnología farmacéutica ha experimentado un crecimiento sin precedentes, impulsado por los avances en la genómica, la proteómica y la biología sintética. Estas tecnologías han abierto nuevas vías para el descubrimiento y desarrollo de terapias innovadoras [14]. La biotecnología farmacéutica también ha desempeñado un papel crucial en la lucha contra la pandemia de COVID-19, facilitando el desarrollo de vacunas y terapias eficaces en tiempo récord [15].

La biotecnología farmacéutica se ha convertido en una piedra angular de la industria farmacéutica moderna. Desde el desarrollo de terapias dirigidas y vacunas recombinantes hasta la producción de productos biológicos esenciales, la biotecnología farmacéutica ha transformado la forma en que se tratan y previenen las enfermedades. A medida que la biotecnología continúa avanzando, podemos esperar nuevas innovaciones y descubrimientos que mejorarán la salud humana y el bienestar en las próximas décadas.

Biofármacos

Origen

La biotecnología, con su capacidad para manipular los procesos biológicos a escala molecular, ha abierto un abanico de posibilidades sin precedentes en el campo de la medicina. Entre sus logros más destacados se encuentran los

biofármacos, una clase de medicamentos innovadores que han transformado el tratamiento de numerosas enfermedades y han impulsado un cambio de paradigma en la industria farmacéutica. Los biofármacos tienen sus raíces en los albores de la biotecnología moderna, cuando los científicos comenzaron a comprender y manipular el código genético de los organismos vivos. El desarrollo de técnicas de ADN recombinante en la década de 1970 marcó un hito crucial, permitiendo la producción de proteínas terapéuticas en cantidades suficientes para su uso clínico [16]. La insulina recombinante, producida por primera vez en bacterias, fue uno de los primeros biofármacos en llegar al mercado, revolucionando el tratamiento de la diabetes [17].

A medida que avanzaba la biotecnología, se lograron avances significativos en la producción de otros biofármacos, como la hormona de crecimiento, los factores de coagulación y las eritropoyetinas. Estos medicamentos, derivados de organismos vivos y producidos mediante procesos biológicos complejos, ofrecían ventajas significativas sobre los fármacos tradicionales de síntesis química, especialmente en el tratamiento de enfermedades crónicas y complejas.

Definición y características distintivas

Los biofármacos se definen como productos farmacéuticos terapéuticos o de diagnóstico cuya sustancia activa se produce a partir de un organismo vivo o sus componentes celulares [18]. A diferencia de los fármacos químicos, que se sintetizan mediante reacciones químicas, los biofármacos son moléculas grandes y complejas, como proteínas, anticuerpos monoclonales, vacunas, terapias génicas y células terapéuticas.

Una de las características distintivas de los biofármacos es su alta especificidad y su capacidad para interactuar con objetivos moleculares específicos en el organismo. Esto les permite actuar de manera más precisa y selectiva que los fármacos químicos, lo que se traduce en una mayor eficacia y una menor incidencia de efectos secundarios [19].

Además, los biofármacos suelen ser más complejos de producir que los fármacos químicos, ya que requieren procesos biológicos altamente controlados y tecnología de punta. Esto se debe a que los organismos vivos utilizados para producir biofármacos son sensibles a las condiciones ambientales y pueden generar variaciones en la calidad del producto final.

Relevancia económica y aplicaciones clínicas

Los biofármacos han adquirido una relevancia económica creciente en la industria farmacéutica, representando un mercado global multimillonario y en constante expansión [20]. Su impacto económico se debe no solo a sus altos precios, justificados por sus costos de desarrollo y producción, sino también a su capacidad para mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir los costos sanitarios a largo plazo.

En cuanto a sus aplicaciones clínicas, los biofármacos han revolucionado el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, incluyendo el cáncer, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades infecciosas, las enfermedades raras y las enfermedades genéticas [21]. Algunos ejemplos destacados de biofármacos ampliamente utilizados son los anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer y las enfermedades autoinmunes, las terapias biológicas para la artritis reumatoide y la psoriasis, y las vacunas recombinantes para la prevención de enfermedades infecciosas.

El futuro de los biofármacos

El campo de los biofármacos continúa evolucionando rápidamente, impulsado por los avances en la biotecnología, la genómica, la proteómica y la biología sintética. Se espera que en los próximos años se desarrollen nuevos biofármacos aún más innovadores y eficaces, dirigidos a enfermedades que hasta ahora carecían de tratamientos adecuados.

Además, se están realizando esfuerzos para mejorar la eficiencia y reducir los costos de producción de los biofármacos, lo que podría hacerlos más accesibles para los pacientes en todo el mundo. También se está trabajando en el desarrollo de biosimilares, versiones genéricas de biofármacos cuyos derechos de patente han expirado, lo que podría aumentar la competencia y reducir los precios.

Los biofármacos representan una de las innovaciones más trascendentales en la historia de la medicina. Su capacidad para tratar enfermedades complejas y mejorar la calidad de vida de los pacientes ha transformado la práctica médica y ha abierto nuevas vías para la investigación y el desarrollo de terapias más personalizadas y eficaces. A medida que la biotecnología continúa avanzando, es

de esperar que los biofármacos sigan desempeñando un papel cada vez más importante en el futuro de la medicina.

Practica 1. Simulación virtual de estrategias de búsqueda de nuevos fármacos a través de programas de la creación de modelos de proteínas

Introducción

El desarrollo de la práctica de laboratorio acerca de la búsqueda de nuevos fármacos se realizará *in silico*, mediante programas específicos para el cribado molecular (Docking molecular) como Chimera, Avogadro, Autodock y AutoDock Vina. La búsqueda de los nuevos acoplamiento molecular de potenciales nuevos fármacos dependerá de la computadora y la disponibilidad de búsqueda de información bibliográfica.

Fundamentos

El acoplamiento molecular es una técnica computacional utilizada en el campo de la bioinformática y la química computacional para predecir la interacción entre moléculas, como fármacos y proteínas [22]. Su objetivo principal es simular y predecir la forma en que dos moléculas interactúan entre sí, especialmente cómo un ligando (por ejemplo, un fármaco) se une a un receptor (por ejemplo, una proteína) de manera específica y con una alta afinidad [23].

Existen dos tipos principales de acoplamiento molecular:

- **Docking flexible (Flexible Docking):** En este enfoque, tanto el ligando como el receptor se consideran flexibles, lo que significa que se permite cierta flexibilidad en sus estructuras durante la simulación. Esto tiene en cuenta los posibles cambios conformacionales que pueden ocurrir en las moléculas durante la interacción [24].
- **Docking rígido (Rigid Docking):** En este caso, el ligando y el receptor se consideran rígidos, sin permitir cambios conformacionales significativos durante la simulación. Aunque es menos computacionalmente intensivo,

puede pasar por alto algunos aspectos importantes de la interacción molecular [25].

Aplicaciones del Docking Molecular

- **Descubrimiento de Fármacos:** El acoplamiento molecular se utiliza extensamente en la industria farmacéutica para predecir la afinidad y la eficacia de un ligando potencial con su objetivo biológico, lo que ayuda a acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos [26].
- **Diseño de Fármacos:** Permite la optimización de moléculas existentes o el diseño de nuevas moléculas que se unan de manera específica a sus objetivos, mejorando así la selectividad y eficacia de los fármacos [27].
- **Estudios de Interacciones Moleculares:** No solo se aplica a fármacos, sino que también se utiliza para estudiar interacciones moleculares en otros contextos biológicos, como enzimas y sustratos, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros [28].

Perspectivas a Futuro

El cribado molecular (docking molecular) contribuye a mejorar las técnicas de acoplamiento molecular en términos de precisión y capacidad predictiva, especialmente mediante la incorporación de modelos más avanzados y datos experimentales [29]. Además, la inclusión de la dinámica molecular, que simula el movimiento y cambio en las estructuras moleculares con el tiempo, podría proporcionar una representación más realista de las interacciones moleculares [30].

Por otro lado, la aplicación de técnicas de inteligencia artificial, como el aprendizaje profundo, podría mejorar la capacidad del acoplamiento molecular para predecir interacciones moleculares de manera más precisa [31]. Finalmente, se espera que el acoplamiento molecular contribuya al desarrollo de terapias personalizadas, donde los tratamientos se diseñan específicamente para los perfiles genéticos y moleculares únicos de los pacientes.

Objetivo

Desarrollar el acoplamiento molecular de principios activos de plantas en búsqueda potenciales nuevos agentes terapéuticos con el uso de herramientas bioinformáticas.

Preparación previa

- **Biología Molecular:** Comprender la estructura y función de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas relevantes.
- **Química Orgánica:** Conocer los grupos funcionales, las reacciones químicas y las propiedades de las moléculas orgánicas, especialmente aquellas que actúan como ligandos.
- **Farmacología:** Entender los conceptos de afinidad, selectividad, agonismo, antagonismo y cómo los fármacos interactúan con sus objetivos biológicos.
- **Bioinformática:** Conocer las bases de datos de estructuras moleculares (PDB), software de visualización molecular y herramientas de análisis de datos.

Procedimiento

Selección de la Proteína y Preparación del Receptor

1. Accede al Protein Data Bank (PDB) en www.rcsb.org.
2. Busca y descarga la estructura tridimensional de la proteína de interés en formato PDB.
3. Abre el archivo PDB en un visor molecular o software de visualización como PyMOL o Chimera.
4. Elimina moléculas de agua, iones y otros heteroátomos que no sean relevantes para el docking.

Preparación del Ligando

5. Selecciona o diseña la molécula pequeña (ligando) que se va a acoplar al receptor.
6. Descarga la estructura tridimensional del ligando, preferiblemente en formato SDF (Structure Data File) o mol2.

7. Puedes usar herramientas como Open Babel para convertir el formato del ligando si es necesario.

Preparación del Sistema

8. Alinea la molécula pequeña (ligando) y la proteína en un único archivo, asegurándote de que las coordenadas están en el mismo sistema de referencia.
9. Ajusta la protonación y la asignación de estados de ionización de la proteína según las condiciones fisiológicas deseadas.

Selección del Software de Docking

10. Elige un programa de docking molecular. Algunas opciones populares incluyen AutoDock, AutoDock Vina, DOCK, Glide, entre otros.
11. Instala y configura el software según las instrucciones proporcionadas por el desarrollador.

Configuración de Parámetros del Docking

12. Define los parámetros de búsqueda y los ajustes específicos del programa de docking (tamaño de la cuadrícula, número de poses a generar, etc.).
13. Establece las restricciones o condiciones específicas del experimento, si es necesario.

Ejecución del Docking

14. Inicia la simulación de docking utilizando el software seleccionado.
15. Monitoriza el progreso de la simulación y guarda los resultados para su posterior análisis.

Análisis de Resultados

16. Evalúa las poses generadas para identificar la conformación más probable del complejo ligando-receptor.
17. Analiza las energías de interacción y otros parámetros para seleccionar las poses más prometedoras.

Validación y Optimización

18. Valida los resultados del docking utilizando información experimental si está disponible.
19. En caso necesario, realiza simulaciones de dinámica molecular para refinar la interacción ligando-receptor.

Interpretación y Visualización

20. Visualiza y analiza los resultados utilizando herramientas de visualización molecular.
21. Identifica interacciones clave, como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas y regiones hidrofóbicas.

Resultados de aprendizaje

- El estudiante conoce sobre los principios fundamentales del Docking molecular y cómo se utiliza para predecir las interacciones entre ligandos y receptores.
- Los estudiantes tienen la capacidad para descargar, visualizar y preparar estructuras tridimensionales de proteínas y ligandos desde bases de datos como el Protein Data Bank (PDB).
- Los estudiantes ejecutan simulaciones de docking molecular y comprensión de los procesos involucrados en la generación de poses de interacción ligando-receptor.

Normas de seguridad

- Para permitir la seguridad de los alumnos que realizan la práctica descrita, se deben seguir las siguientes normas:
- No comer, tomar bebidas, fumar, ni mascar chicle.
- No correr ni empujarse dentro del laboratorio de computación.
- No cepillarse el cabello ni aplicarse maquillaje.
- Mantener un entorno de trabajo tranquilo y libre de distracciones durante la práctica virtual.
- Asegurarse de tener acceso estable a Internet para evitar interrupciones durante la práctica.

- Iniciar sesión en la plataforma virtual designada para la práctica utilizando tus credenciales proporcionadas por el docente.
- Participar activamente en todas las actividades virtuales, incluyendo discusiones, simulaciones y ejercicios prácticos.
- No realizar actividades no éticas, como la manipulación indebida de datos o la copia de trabajos de otros estudiantes.
- Manejar los datos genéticos de manera confidencial y respetar la privacidad de la información.
- No descargar, compartir o utilizar datos de manera no autorizada.
- No intentar acceder a información no relacionada con la práctica virtual.
- Informar al docente de comportamientos sospechosos o problemas de seguridad.
- Cumplir con los plazos asignados para la entrega de tareas y actividades.
- Al terminar la práctica, desconectarse completamente de la plataforma y cerrar todas las aplicaciones relacionadas.
- Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
- No obstruir el paso entre las mesas, ni las salidas del laboratorio de computación

Cuestionario

- ¿Qué es el acoplamiento o cribado molecular y cuál es su importancia en el diseño de fármacos?
- Describe brevemente los tipos de programas bioinformáticos utilizados para el modelado de proteínas y qué información se requiere para su uso.
- ¿Qué son las bases de datos de estructuras de proteínas (como el PDB) y cómo se utilizan en el proceso de diseño de fármacos?
- ¿Cuál es la diferencia entre el acoplamiento molecular (docking) flexible y rígido?
- ¿Cuáles son los criterios clave que se consideran al evaluar la calidad de un modelo de proteína y la interacción fármaco-proteína en simulaciones in silico?

Practica 2. Extracción de principios activos de plantas con potencial biofarmacéutico

Introducción

La práctica de extracción de principios activos tendrá una duración de tres semanas, en función de la cantidad de muestras analizadas por cada grupo de estudiantes y los resultados que se obtendrán al final de la práctica.

Fundamentos

La extracción de principios activos de plantas, un campo con raíces históricas en la medicina tradicional continúa siendo una técnica fundamental en la búsqueda de compuestos bioactivos con propiedades terapéuticas [32]. Las plantas medicinales, utilizadas ancestralmente para tratar diversas enfermedades, albergan una vasta diversidad de compuestos químicos que han despertado un creciente interés en la investigación farmacéutica [33]. Su importancia radica en su capacidad para contribuir significativamente al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, abarcando desde la identificación de compuestos bioactivos hasta su relevancia cultural y sostenibilidad [34].

Diversidad de Compuestos Bioactivos

Las plantas medicinales son una fuente prolífica de compuestos químicos, incluyendo alcaloides, flavonoides, terpenoides y polifenoles, entre otros [35]. Estos compuestos exhiben propiedades farmacológicas diversas, como actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y analgésicas [36]. Los principios activos extraídos de las plantas pueden poseer una amplia gama de propiedades, desde antimicrobianas y antioxidantes hasta antiinflamatorias, analgésicas y antitumorales, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos [37].

Métodos de Extracción y Selección de Solventes

La extracción de principios activos se lleva a cabo mediante diversos métodos, siendo los más comunes la maceración, la percolación, la destilación y

la extracción con solventes [38]. La elección del método depende de la naturaleza de los compuestos a extraer, así como de factores como la polaridad y la estabilidad de los compuestos objetivo [39]. Los solventes más utilizados en la extracción de principios activos incluyen el etanol, metanol, agua y mezclas de solventes, cuya selección se basa en la polaridad de los compuestos objetivo [40].

Ensayos de Actividad Biológica y Avances Tecnológicos

Los principios activos extraídos se someten a ensayos de actividad biológica para evaluar su eficacia y seguridad. Estos ensayos pueden incluir pruebas *in vitro* e *in vivo* para determinar propiedades farmacológicas específicas, como la actividad antimicrobiana, la capacidad antioxidante o la actividad antiinflamatoria [41]. Los avances tecnológicos, como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas, han revolucionado la identificación y caracterización de compuestos, acelerando el proceso de descubrimiento de principios activos y facilitando la investigación en el campo de la farmacología y la medicina [42].

Objetivo

Obtener un extracto crudo de alcaloides de una droga y realizar ensayos de caracterización.

Preparación previa

Botánica: Identificación y clasificación de plantas medicinales, conocimiento de las partes de las plantas y sus funciones.

Fitoquímica: Estudio de los compuestos químicos presentes en las plantas (alcaloides, flavonoides, terpenoides, etc.), sus propiedades y funciones biológicas.

Farmacognosia: Ciencia que estudia las drogas naturales y sus componentes, incluyendo su origen, identificación, propiedades y usos.

Química Orgánica: Comprensión de los grupos funcionales, las reacciones químicas y las propiedades de las moléculas orgánicas, especialmente aquellas que actúan como principios activos.

Técnicas de Extracción: Conocimiento de los diferentes métodos de extracción (maceración, percolación, destilación, extracción con solventes, etc.) y sus fundamentos.

Seguridad en el Laboratorio: Normas de seguridad, manejo de productos químicos y equipos de laboratorio.

Procedimiento

Preparación de reactivos

- **Reactivo de Dragendorff**
 - Mezclar 21,3 mL de ácido nítrico ($d = 1,42$) con suficiente agua - destilada para hacer 62 mL.
 - En 20 mL de esta solución se disuelven 5 g de subnitrato de bismuto.
 - Por separado, se disuelven 31,2 g de yoduro de potasio en 69 mL de agua.
 - Mezclar luego ambas soluciones
- **Reactivo de Mayer.**
 - Pesar 1,258 g de cloruro mercuríco se disuelven en 60 mL de agua.
 - Disolver 5 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua.
 - Mezclar ambas soluciones y aforar a 100 mL con agua.

Preparación de extractos

- Pesar 2.5 gramos de la droga vegetal y depositar en un Erlenmeyer de 250 mL.
- Añadir 25 mL de etanol al 70% y agitar por 60 minutos en un agitador mecánico.
- Filtrar y el filtrado depositarlo en un balón aforado de 25 mL
- Aforar con etanol al 70%.

Extracción y caracterización de alcaloides

- A 25 mL de un extracto alcohólico de la planta, añadir 75 mL de ClH al 1 % y 1 g de sulfato de sodio.
- Filtrar y alcalinizar con KOH al 10 %.

- Extraer la solución en embudo separador 2 x15 mL de acetato de etilo. El - acetato de etilo se divide para los siguientes ensayos:

Concentrar una alícuota en baño de agua y realizar una cromatografía en capa delgada, corriendo en acetato de etilo-etanol (1:1) y revelando con solución reactiva de Dragendorff.

- Concentrar una alícuota a sequedad. Añadir 1 mL de HCl al 1 % y realizar el ensayo de Dragendorff y Mayer en tubos de ensayo.
- Observar los resultados y anotarlos en una hoja de registro.

Resultados de aprendizaje

- Los estudiantes podrán identificar diversas plantas medicinales, comprendiendo la diversidad de compuestos bioactivos presentes en ellas.
- Los estudiantes estarán en la capacidad de seleccionar solventes apropiados basados en la polaridad de los compuestos a extraer, demostrando comprensión de los principios químicos involucrados en la extracción.
- Los estudiantes podrán Interpretar los resultados obtenidos durante la extracción y las pruebas de actividad biológica, relacionando la presencia de compuestos específicos con las propiedades terapéuticas potenciales.

Normas de seguridad

Para permitir la seguridad de los alumnos que realizan las prácticas aquí descritas, se deben seguir las siguientes normas:

- No comer, tomar bebidas, fumar, ni mascar chicle.
- No correr ni empujarse dentro del laboratorio.
- No cepillarse el cabello ni aplicarse maquillaje
- Siempre usar bata cuando se permanezca en el laboratorio y guantes para el desarrollo de actividades.
- Calzar zapatos cerrados y de suela antiderrapante.
- Cuando se empleen los guantes, no tocar objetos de uso común (interruptores, manijas de puertas, teclados y mouse de la computadora, entre otros) ni partes del cuerpo (cara o cabello).
- No pipetear ninguna solución con la boca.

- No oler directamente, ni probar ninguna sustancia utilizada en el laboratorio.
- Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
- No obstruir el paso entre las mesas, ni las salidas del laboratorio.
- No utilizar material de vidrio dañado o astillado.
- Manejar sustancias tóxicas, irritantes, inflamables, cancerígenas o mutagénicas en las áreas destinadas para su uso y con la protección adecuada.
- No dejar destapados los frascos que contengan sustancias químicas o algún material estéril.
- Respetar la asignación de espacios y reactivos.
- Al terminar de trabajar, guardar o entregar el material limpio y seco.

NOTA: Ante una situación de urgencia dar aviso inmediatamente al docente a cargo de la asignatura.

Cuestionario

- **¿Cuál es el objetivo principal de la extracción de principios activos de plantas?**
 - a) Aislar compuestos específicos con actividad biológica.
 - b) Identificar todas las sustancias químicas presentes en la planta.
 - c) Cuantificar la cantidad total de compuestos en la planta.
 - d) Estudiar la estructura molecular de los compuestos de la planta.
- **¿Qué factores pueden influir en la eficiencia de la extracción de principios activos?**
 - a) Tipo de solvente, polaridad de los compuestos, temperatura, tiempo de extracción, tamaño de partícula de la planta.
 - b) Presión atmosférica, humedad relativa, fase lunar, tipo de planta, edad de la planta.
 - c) Disponibilidad de equipos de laboratorio, costo de los solventes, experiencia del investigador, tipo de planta.
 - d) Todas las anteriores.
- **¿Qué técnicas de extracción se pueden utilizar para obtener principios activos de plantas?**

- a) Maceración, percolación, infusión, decocción, extracción Soxhlet, extracción asistida por microondas, extracción con fluidos supercríticos.
 - b) Destilación, cromatografía, espectrofotometría, electroforesis.
 - c) PCR, ELISA, Western blot.
 - d) Todas las anteriores.
- **¿Qué criterios se deben considerar al seleccionar un solvente para la extracción de principios activos?**
 - a) Polaridad de los compuestos a extraer, solubilidad de los compuestos en el solvente, toxicidad del solvente, costo del solvente, facilidad de evaporación.
 - b) Disponibilidad del solvente, precio del solvente, color del solvente, olor del solvente.
 - c) Todas las anteriores.
 - **¿Qué pasos se deben seguir para preparar un extracto de planta para su análisis?**
 - a) Filtración, concentración (evaporación del solvente), liofilización (opcional), reconstitución en un solvente adecuado.
 - b) Maceración, filtración, dilución, centrifugación.
 - c) Molienda, tamizado, extracción, cromatografía.
 - d) Ninguna de las anteriores.

Referencias bibliográficas

- [1] Walsh, G. *Pharmaceutical Biotechnology: An Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2018.
- [2] Daugherty, E. *Biotechnology: A Laboratory Course*. Sudbury, MA: Jones & Bartlett Learning; 2019.
- [3] Atala, A.; Lanza, R.; Thomson, J.; Nerem, R., Eds. *Principles of Regenerative Medicine*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2020.
- [4] Dübel, S.; McCafferty, J., Eds. *Therapeutic Antibodies*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2021.
- [5] Plotkin, S. A.; Orenstein, W. A.; Offit, P. A.; Edwards, K. M., Eds. *Vaccines*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2022.
- [6] Sliwinski, A.; Mellor, J. Drug discovery and development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017; 69(10):1253-1262.
- [7] Pardridge, W. M. Blood-brain barrier drug delivery of biologics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018; 125: 43-61.
- [8] Rappuoli, R.; Pizza, M. Vaccine design: innovative approaches and emerging threats. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019; 18(1): 27-41.
- [9] Rosenberg, S. A.; et al. Cancer immunotherapy: challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020; 19(10): 679-699.
- [10] Langer, R.; Kang, S. M. Fundamentals of cell and tissue engineering. *Science*. 2013; 341(6146): 575-576.
- [11] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH Q5A(R1): Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation. 2015.
- [12] Grabowski, H.; Vernon, J. Effective patent life in pharmaceuticals. *International Journal of Technology Management*. 2000; 19(1-2): 101-120.
- [13] U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry: Biosimilars*. 2018.
- [14] Mullard, A. The biotech boom. *Nature*. 2017; 544(7650): 406-409.
- [15] World Health Organization (WHO). *COVID-19 vaccines*. 2021.
- [16] Cohen, S. N., et al. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240-3244.

- [17] Shine, J., et al. (1977). Rat preproinsulin: construction and cloning of a recombinant plasmid containing the coding sequence. *Nature*, 270(5635), 391-395.
- [18] European Medicines Agency. (2014). Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies.
- [19] Reichert, J. M. (2018). Antibodies to therapeutic antibodies. *Nature Biotechnology*, 36(4), 309-316.
- [20] EvaluatePharma. (2023). World Preview 2023, Outlook to 2028.
- [21] Kim, J. Y., et al. (2017). Current landscape and future of bio
- [22] Kitchen, D. B., et al. (2020). Docking and scoring in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 25(8), 1195-1208.
- [23] Meng, X. Y., et al. (2011). A review of target and structure-based drug discovery. *Drug Discovery Today*, 16(15-16), 672-685.
- [24] Amaro, R. E., & Tajkhorshid, N. (2018). Computational methods for studying GPCRs: from structure to function. *Current Opinion in Structural Biology*, 50, 177-186.
- [25] Totrov, M., & Abagyan, R. (2012). Flexible ligand docking. *Methods in Molecular Biology*, 840, 297-321.
- [26] Shoichet, B. K. (2015). Virtual screening of compound libraries. *Nature Chemical Biology*, 11(8), 559-568.
- [27] Gohlke, H., & Klebe, G. (2013). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of protein-ligand complexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(25), 6446-6465.
- [28] Boiteux, A., et al. (2018). Structure-based systems pharmacology: applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 19(5), 949-961.
- [29] Duan, Y., et al. (2016). The accuracy of predicting protein-ligand binding affinities. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1549.
- [30] McCammon, J. A., et al. (2010). Principles of molecular dynamics simulations. *Chemical Reviews*, 110(10), 5898-5928.
- [31] Fleming, N. (2018). How artificial intelligence is changing drug discovery. *Nature*, 557(7707), S55-S57.
- [32] Atanasov, A. G., et al. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582-1614.

- [33] Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(S1), 69-75.
- [34] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Three Decades from 1981 to 2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803.
- [35] Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- [36] Scalbert, A., et al. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- [37] Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(10), 4707-4723.
- [38] Azmir, J., et al. (2010). Techniques for the extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 1-12.
- [39] Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- [40] Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(5), 919-930.
- [41] Raso, G. M., et al. (2015). In vitro and in vivo evaluation of the anti-inflammatory activity of a polyphenolic extract from black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 106-115.
- [42] Wolfender, J. L., et al. (2019). Recent developments in the rapid identification of bioactive natural products from plant extracts using hyphenated techniques. *Progress in Drug Research*, 74, 25-58.

CAPÍTULO VII

Biología General



Introducción

La biología es la ciencia que estudia la vida en todas sus formas y manifestaciones. Desde los organismos más pequeños, como las bacterias y los virus, hasta los más complejos, como las plantas, los animales y los seres humanos, la biología busca comprender los procesos que permiten la existencia, el desarrollo, la reproducción y la evolución de los seres vivos [1]. Esta disciplina no solo se enfoca en los organismos individuales, sino también en las interacciones que establecen entre sí y con su entorno, abarcando desde el nivel molecular hasta los ecosistemas globales [2].

Uno de los pilares fundamentales de la biología es la célula, considerada la unidad básica de la vida. Todas las formas de vida están compuestas por una o más células, las cuales llevan a cabo funciones esenciales como el metabolismo, la reproducción y la respuesta a estímulos. A partir de este concepto, la biología se ramifica en diversas áreas de estudio, como la genética, que explora cómo la información hereditaria se transmite de generación en generación; la ecología, que analiza las relaciones entre los organismos y su ambiente; y la fisiología, que investiga el funcionamiento de los sistemas biológicos [3].

Además, la biología tiene una conexión inherentemente profunda con la teoría de la evolución, planteada por Charles Darwin en el siglo XIX. Investigaciones recientes han evidenciado que los procesos evolutivos, tales como las mutaciones y la deriva genética, siguen modelando la biodiversidad en respuesta a alteraciones ambientales [4].

Hoy en día, la biología se ha transformado en una disciplina interdisciplinaria que se nutre de áreas como la química, la física, las matemáticas y la computación. Progresos tecnológicos, tales como la secuenciación genética, la ingeniería genética y la biología sintética, han transformado nuestra percepción de la vida y han generado nuevas oportunidades en campos como la medicina, la agricultura y la preservación del medio ambiente. Por ejemplo, técnicas como CRISPR-Cas9 han facilitado la modificación de genomas con una exactitud nunca antes vista, brindando capacidad para tratar enfermedades genéticas y optimizar cultivos [5].

En conclusión, la biología no solo nos facilita comprender el funcionamiento de los organismos vivos, sino que también nos proporciona recursos para enfrentar retos mundiales, tales como el cambio climático, las

enfermedades en ascenso y la seguridad en la alimentación. Es una disciplina en permanente cambio que nos incita a descubrir los enigmas de la vida y a meditar sobre nuestro espacio en el universo natural.

Antecedentes

La Biología General es fundamental debido a que proporciona la información correspondiente a los principios biológicos que abarcan desde la organización molecular hasta la ecología y evolución de los organismos [2]. En los últimos años, la biología ha experimentado avances significativos, impulsados por investigaciones que abarcan desde la comprensión de la relación genotipo-fenotipo hasta estudios sobre biodiversidad y ecología [3].

La biología es una de las asignaturas más antiguas de la civilización, permitiendo que la estudien personajes como Aristóteles quien realiza las primeras clasificaciones de los seres vivos, pero es en el siglo XVII cuando la invención del microscopio la biología toma fuerza y logra llevar a otro nivel visualizando la vida a nivel celular [1]. Más tarde, en el siglo XIX, la teoría de la evolución de Charles Darwin y las leyes de la herencia de Gregorio Mendel sentaron las bases de la biología moderna [5].

En el siglo XX la ciencia marca un punto clave como la estructura del ADN, revolucionando la genética y dando paso al desarrollo de la biotecnología, convirtiéndose así en una disciplina evolutiva permitiendo dar un viaje a través de la biología molecular, la bioinformática y la ecología, que buscan comprender mejor los procesos vitales y su relación con el medio ambiente [4].

Practica 1. Normas Generales para el Uso del laboratorio de Biología General

Cumplir las normas de laboratorio permite garantizar la seguridad de todos los estudiantes y personal docente, evitando la prevenir accidentes y asegurar el correcto desarrollo de las prácticas. Las normas se dividen en, personales, manejo o manipulación de equipos y materiales, orden y limpieza, conducta y emergencias.

Fundamentos

El laboratorio de Biología General es un espacio fundamental para el aprendizaje y la aplicación de conceptos biológicos. Sin embargo, también puede ser un entorno con riesgos potenciales si no se toman las precauciones adecuadas. Las normas de laboratorio son esenciales para garantizar la seguridad de todos los usuarios, mantener el orden y la limpieza, y asegurar la integridad de los experimentos [6].

Seguridad en el laboratorio

Riesgos biológicos

- **Manejo de microorganismos:** Uso de técnicas de asepsia, eliminación adecuada de cultivos [7], [8].
- **Manejo de muestras biológicas:** Precauciones con sangre, tejidos y fluidos corporales [9], [10].

Riesgos químicos

- **Sustancias tóxicas, corrosivas, inflamables:** Almacenamiento, manipulación y eliminación segura [11], [12].
- **Reactivos:** Uso de guantes, gafas de protección y campanas de extracción [13], [14].

Riesgos físicos

- **Equipos y materiales:** Uso correcto de microscopios, centrífugas, etc. [15], [16].
- **Incendios:** Manejo de mecheros, salidas de emergencia [17], [18].
- **Lesiones:** Uso de objetos punzantes, cristales rotos [19], [20].

Objetivo

Aprender las medidas de seguridad que se debe tener en el laboratorio de Biología General, con la finalidad de proteger la salud de quienes ocupan el laboratorio.

Preparación previa

Para prepararse adecuadamente para la práctica de laboratorio sobre Normas del laboratorio de Biología General, el estudiante debe realizar las siguientes tareas:

1. Leer y comprender la guía de prácticas: Revisar detenidamente el material proporcionado por el profesor, incluyendo los objetivos de la práctica, el fundamento teórico y los procedimientos a seguir.
2. Investigar los conceptos básicos: Familiarizarse con los términos clave relacionados con la seguridad en el laboratorio, los riesgos biológicos, químicos y físicos, y las normas generales de laboratorio.
3. Preparar el equipo de protección personal (EPP): Asegurarse de contar con los elementos necesarios, como bata de laboratorio, gafas de protección y guantes, en caso de que sean requeridos.
4. Repasar las técnicas de laboratorio: Recordar las técnicas básicas de manejo de materiales y equipos, así como los procedimientos de limpieza y eliminación de residuos.

Procedimiento

Introducción teórica

- El docente presentará y explicará las normas de seguridad del laboratorio, **incluyendo:**
- Riesgos biológicos, químicos y físicos.
- Uso de EPP.
- Procedimientos de emergencia.
- Manejo de residuos.
- Se discutirán ejemplos de situaciones de riesgo y cómo prevenirlas.

Recorrido por el laboratorio

El docente guiará a los estudiantes en un recorrido por el laboratorio, señalando:

- Ubicación de equipos de seguridad (extintores, botiquín, lavaojos).
- Almacenamiento de productos químicos y biológicos.
- Áreas de trabajo y equipos de laboratorio.

- Salidas de emergencia.

Uso de equipos de protección personal (EPP)

- Se demostrará y practicará el uso correcto de la bata de laboratorio, gafas de seguridad y guantes.
- Se explicará la importancia de utilizar los EPP adecuados para cada tipo de actividad.

Simulación de situaciones de emergencia

- Se simularán situaciones de emergencia, como derrames de productos químicos o accidentes con material biológico.
- Se practicarán los procedimientos de respuesta y primeros auxilios.

Técnicas de asepsia y eliminación de residuos

- Se demostrarán y practicarán técnicas de asepsia para prevenir la contaminación en los experimentos.
- Se explicará la clasificación y eliminación adecuada de residuos (biológicos, químicos, punzocortantes).

Actividades prácticas

- Los estudiantes realizarán actividades prácticas relacionadas con las normas de seguridad, como:
- Identificación de riesgos en el laboratorio.
- Uso de equipos de laboratorio (microscopio, centrífuga) siguiendo las normas de seguridad.
- Simulación de limpieza de derrames.

Resultados de aprendizaje

Al finalizar esta práctica de laboratorio, los estudiantes serán capaces de:

- Conocer y comprender las normas de seguridad y bioseguridad en un laboratorio de biología general, incluyendo la identificación de riesgos biológicos, químicos y físicos.

- Aplicar correctamente las normas de vestimenta, higiene y comportamiento dentro del laboratorio, demostrando responsabilidad y conciencia sobre los riesgos.
- Utilizar de manera adecuada los equipos de protección personal (EPP), tales como guantes, gafas de protección y batas de laboratorio, comprendiendo su importancia para la prevención de accidentes.
- Identificar y clasificar los diferentes tipos de residuos generados en el laboratorio, así como los procedimientos correctos para su eliminación, contribuyendo al mantenimiento del orden y la limpieza.
- Comprender y seguir los protocolos establecidos para el manejo de sustancias químicas y reactivos, incluyendo su almacenamiento, manipulación y eliminación segura.
- Actuar de manera adecuada ante situaciones de emergencia, como derrames, incendios o lesiones, aplicando los procedimientos establecidos y comunicando los incidentes de manera oportuna.
- Desarrollar habilidades de trabajo en equipo y comunicación efectiva dentro del laboratorio, fomentando un ambiente de colaboración y respeto entre los compañeros.
- Internalizar la importancia del cumplimiento de las normas del laboratorio para garantizar la seguridad de todos los usuarios, la integridad de los experimentos y el cuidado de los equipos e instalaciones.

Normas de seguridad

Normas generales

- No, se permitirá comer, beber, fumar o maquillarse.
- No se deberán guardar alimentos en el laboratorio, ni en las heladeras que contengan sustancias químicas.
- Se deberá utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio y el cabello recogido (guardapolvo preferentemente de algodón y de mangas largas, zapatos cerrados, evitando el uso de accesorios colgantes).
- Es imprescindible mantener el orden y la limpieza. Cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.

- Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
- No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
- Todo debe estar identificado correctamente
- El almacenamiento en estantería debe ser tal que garantice que todo este colocado en una forma estable.
- Se debe respetar la altura libre de un metro entre el último elemento estibado y el techo

Normas para residuos

- El material de vidrio roto, contaminado no se deposita con los residuos comunes. Se descartó en bolsa amarilla envuelta en papel.
- El que sea necesario reparar se entregará limpio al taller.
- Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos o material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos.
- En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.
- Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros.) Deberá tener a mano un extintor apropiado para ese material.
- Cuando se trasvase material combustible o inflamable de un tambor a un recipiente más pequeño, realice una conexión con una cadena del tambor a tierra y con otra entre el tambor y el recipiente de manera de igualar potenciales y eliminar la posible carga estática.

Normas para almacenamiento seguro

- No almacene en estantes sobre mesadas ó en altura sustancias corrosivas, tóxicas, inflamables, irritantes, etc . Los estantes en altura donde se coloquen materiales deben contar con una baranda de contención para evitar accidentes por.
- Almacene sustancias químicas en estantes bajo mesadas. Deben ser mantenidas en bandejas de material adecuado, capaces de contener el volumen derramado.

- Los cilindros de gases comprimidos y licuados deben asegurarse en posición vertical con pinzas, grapas y correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, protegidos de la humedad y fuentes de calor, de ser posible en el exterior.

Cuestionario

¿Cuál es la razón principal para el uso de Equipo de Protección Personal (EPP) en el laboratorio?

- Verse profesional y presentable.
- Cumplir con los reglamentos de la universidad.
- Proteger al personal de riesgos biológicos, químicos y físicos.
- Evitar dañar la ropa personal con manchas.

¿Qué acciones debes tomar si accidentalmente derramas un producto químico en la piel?

- Limpiarlo rápidamente con una toalla de papel.
- Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón, y notificar al instructor.
- Aplicar un neutralizador químico y cubrir la zona con un vendaje.
- Ignorar la situación si la cantidad derramada es pequeña.

¿Cómo se deben desechar los materiales contaminados con microorganismos?

- En la basura común, ya que los microorganismos mueren rápidamente fuera del cuerpo.
- En contenedores especiales para residuos biológicos, siguiendo las indicaciones del laboratorio.
- Por el desagüe, después de enjuagar con abundante agua.
- En bolsas de plástico, cerradas herméticamente.

¿Qué debes hacer antes de manipular cualquier equipo o reactivo en el laboratorio?

- Asumir que su uso es intuitivo y proceder con precaución.
- Leer las instrucciones y/o consultar con el instructor para comprender su correcto funcionamiento y precauciones.
- Observar cómo otros compañeros lo utilizan y replicar sus acciones.

d. Utilizarlo rápidamente para ahorrar tiempo y avanzar con la práctica.

¿Por qué es importante mantener el área de trabajo limpia y ordenada?

- a. Para evitar perder materiales y facilitar la búsqueda de objetos.
- b. Para prevenir accidentes, contaminaciones y garantizar un ambiente de trabajo seguro.
- c. Para cumplir con los estándares de higiene del laboratorio.
- d. Todas las anteriores.

Practica 2. Uso adecuado y mantenimiento del microscopio

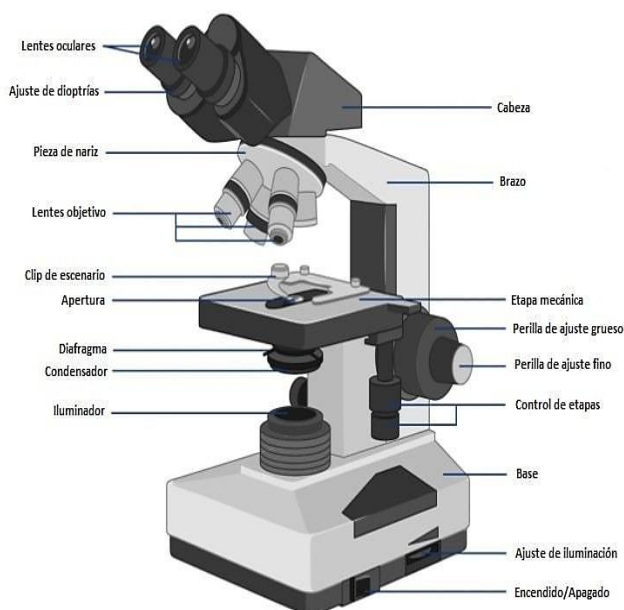
Fundamentos

El microscopio es un instrumento óptico que permite observar objetos y estructuras diminutas, invisibles a simple vista. Amplía la imagen de la muestra, revelando detalles que de otro modo pasarían desapercibidos [21].

Existen diferentes tipos de microscopios, pero el más común en laboratorios de biología general es el microscopio óptico compuesto. Este utiliza un sistema de lentes para aumentar la imagen y funciona mediante la refracción de la luz [22].

El microscopio óptico compuesto consta de varios componentes principales, como los que se observan a la figura:

Figura 3
Partes de un microscopio



1. **Lentes oculares:** Son las lentes a través de las cuales se observa la muestra. Tiene como misión aumentar la imagen producida por el objetivo. Su aumento viene señalado por una cifra y el signo X (4X, 10X, 40X y 100X) [23].
2. **Objetivos:** Son las lentes que se encuentran más cerca de la muestra y proporcionan el primer aumento. Es el elemento óptico más importante, puesto que es el que produce la imagen aumentada del objeto, esta imagen, además, la observamos invertida (el objetivo funciona como una cámara fotográfica) de ahí que, lo que observamos a la derecha de la preparación se encuentre realmente a la izquierda y viceversa [24].
3. **Platina:** Es la plataforma donde se coloca la muestra [25].
4. **Condensador:** Concentra la luz y la dirige hacia la muestra [26].
5. **Fuente de luz:** Proporciona la iluminación necesaria para visualizar la muestra [27].
6. **Tornillos macrométrico y micrométrico:** Se utilizan para enfocar la imagen [28].
7. El **microscopio** es una herramienta esencial en biología, ya que permite el estudio de células, tejidos, microorganismos y otras estructuras microscópicas. Su correcto uso y mantenimiento son fundamentales para obtener resultados precisos y confiables en las observaciones [29].

Objetivo

Capacitar a los estudiantes en el conocimiento de la estructura y el manejo del microscopio compuesto.

Preparación previa

Lectura y comprensión de la guía de prácticas

- Lee detenidamente la guía de prácticas antes de la sesión de laboratorio. Familiarízate con los objetivos, fundamentos teóricos, materiales y procedimientos.
- Asegúrate de comprender los principios básicos de microscopía, las partes del microscopio y sus funciones, así como las técnicas de enfoque y observación de muestras.

Investigación adicional

- Consulta fuentes adicionales, como libros de texto, artículos científicos o recursos en línea, para ampliar tus conocimientos sobre el microscopio y su uso.
- Busca imágenes o diagramas que te ayuden a identificar las diferentes partes del microscopio y comprender su funcionamiento.

Preparación de materiales

- Si la práctica requiere el uso de muestras biológicas, asegúrate de tenerlas listas y preparadas según las indicaciones de la guía.
- Reúne los materiales necesarios, como portaobjetos, cubreobjetos, pipetas, etc.

Familiarización con el microscopio

- Si es posible, observa y manipula un microscopio antes de la práctica para familiarizarte con sus partes y mecanismos.
- Intenta enfocar una muestra sencilla para practicar las técnicas básicas.

Precauciones de seguridad

- Lee y comprende las normas de seguridad del laboratorio, especialmente aquellas relacionadas con el uso y cuidado del microscopio.
- Utiliza los equipos de protección personal (EPP) necesarios, como guantes y bata de laboratorio.

Disposición para el aprendizaje

- Asiste a la práctica con una actitud positiva y disposición para aprender.
- Participa activamente en las actividades propuestas por el profesor y plantea tus dudas.

Procedimiento

Preparación del microscopio

- Coloque el microscopio sobre una superficie plana y estable, alejada de bordes y fuentes de calor.
- Asegúrese de que el microscopio esté conectado a la corriente eléctrica (si aplica) o que tenga pilas en buen estado.
- Limpie las lentes del objetivo y del ocular con papel para limpieza de lentes. Si es necesario, utilice una solución limpiadora de lentes.

Enfoque inicial

- Baje la platina completamente y coloque el objetivo de menor aumento (generalmente 4x o 10x) en posición de uso.
- Encienda la fuente de luz del microscopio y ajuste la intensidad lumínica.
- Coloque la muestra preparada en la platina, asegurándola con las pinzas.
- Mire a través del ocular y ajuste los tornillos macroscópico y micrométrico para enfocar la muestra. Comience con el tornillo macroscópico para un enfoque grueso y luego utilice el micrométrico para un enfoque fino.

Observación con mayor aumento

- Una vez que haya enfocado la muestra con el objetivo de menor aumento, puede cambiar a un objetivo de mayor aumento (generalmente 40x).

- Ajuste nuevamente el enfoque con los tornillos macroscópico y micrométrico si es necesario.
- Centre la imagen moviendo la platina.

Uso del objetivo de inmersión (100x)

- Si necesita observar detalles más pequeños, puede utilizar el objetivo de inmersión (100x).
- Coloque una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos, justo encima de la muestra.
- Gire el revólver para colocar el objetivo de inmersión en posición de uso, asegurándose de que toque el aceite.
- Ajuste el enfoque con el tornillo micrométrico.

Ajuste de la iluminación

- Ajuste el diafragma del condensador para controlar la cantidad de luz que llega a la muestra. Un diafragma más abierto proporciona más luz y contraste, mientras que un diafragma más cerrado reduce la luz y aumenta la profundidad de campo.
- Ajuste la intensidad de la fuente de luz para obtener una imagen clara y brillante.

Observación y registro

- Observe la muestra a través del ocular y realice dibujos o tome fotografías si es necesario.
- Anote cualquier observación relevante sobre la muestra.

Finalización de la observación

- Baje la platina completamente.
- Gire el revólver para colocar el objetivo de menor aumento en posición de uso.
- Apague la fuente de luz del microscopio.
- Retire la muestra de la platina.
- Limpie las lentes del objetivo, el ocular y la platina con papel para limpieza de lentes.

- Cubra el microscopio con una funda protectora para evitar la acumulación de polvo.

Mantenimiento y cuidado del microscopio

- No toque las lentes con los dedos.
- Utilice únicamente papel para limpieza de lentes para limpiar las lentes.
- No fuerce los tornillos ni las piezas móviles.
- Transporte el microscopio sujetándolo por el brazo y la base.
- Guarde el microscopio en un lugar seco y libre de polvo.
- Realice mantenimiento preventivo periódico, como la limpieza de las lentes y la lubricación de las piezas móviles.

Resultados de aprendizaje

- Construye e interpreta los procesos y patrones naturales y las consecuencias del desarrollo anormal del ciclo celular mediante investigación y autoaprendizaje.

Normas de seguridad

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde y dejarlo cubierto con su funda.
- Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
- Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso, se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el

objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.

- No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo, ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
- Es importante limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y al acabar el curso, encargar un técnico un ajuste y revisión general.

Cuestionario

- **¿Cuál es la función principal del condensador en el microscopio óptico?**
 - a. Ampliar la imagen de la muestra.
 - b. Concentrar la luz y dirigirla hacia la muestra.
 - c. Ajustar la intensidad de la luz.
 - d. Proteger el objetivo de la muestra.
- **¿Qué diferencia hay entre los tornillos macrométrico y micrométrico?**
 - a. El macrométrico se utiliza para enfocar objetos grandes y el micrométrico para objetos pequeños.
 - b. El macrométrico acerca o aleja el objetivo de la muestra y el micrométrico realiza ajustes finos del enfoque.
 - c. El macrométrico ajusta la intensidad de la luz y el micrométrico el contraste.
 - d. No hay diferencia, ambos tornillos cumplen la misma función.
- **¿Qué objetivo se debe utilizar para observar detalles más pequeños de una muestra, como bacterias?**
 - a. El objetivo de menor aumento (4x).

- b. El objetivo de 10x.
- c. El objetivo de 40x.
- d. El objetivo de inmersión (100x).
- **¿Por qué es importante limpiar las lentes del microscopio después de su uso?**
 - a. Para evitar que se rayen las lentes.
 - b. Para eliminar restos de muestras o aceite de inmersión que puedan dañar las lentes.
 - c. Para asegurar una mejor calidad de imagen en futuras observaciones.
 - d. Todas las anteriores.
- **¿Qué precauciones se deben tomar al transportar el microscopio?**
 - a. Sujetarlo por el brazo y la base con ambas manos.
 - b. Utilizar una funda protectora para evitar golpes y acumulación de polvo.
 - c. No inclinarlo para evitar que se caigan las lentes.
 - d. Todas las anteriores.

Referencias bibliográficas

- [1] Raven, P. H., Johnson, G. B., Mason, K. A., Losos, J. B., & Singer, S. R. (2014). *Biology*. McGraw-Hill Education.
- [2] Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2018). *Biology*. Pearson Education.
- [3] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
- [4] Futuyma, D. J. (2017). *Evolution*. Sinauer Associates.
- [5] Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 346(6213), 1074-1079.
- [6] National Research Council (US) Committee for the Development of Guiding Principles for the Safe Conduct of Research in Chemical Laboratories. (2011). *Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Management of Chemical Hazards*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- [7] World Health Organization. (2004). *Laboratory biosafety manual* (3rd ed.). Geneva: World Health Organization.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (6th ed.). Washington (DC): U.S. Government Printing Office.
- [9] Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS). (2019). *Biosafety: Working with Human Blood and Body Fluids*. Hamilton, ON: CCOHS.
- [10] Occupational Safety and Health Administration (OSHA). (2012). *Bloodborne Pathogens*. Washington (DC): U.S. Department of Labor.
- [11] United Nations Environment Programme (UNEP). (2021). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)* (9th rev. ed.). New York: United Nations.
- [12] European Chemicals Agency (ECHA). (2017). *Guidance on the compilation of safety data sheets*. Helsinki: ECHA.
- [13] American Chemical Society (ACS). (2016). *Chemical Safety Manual*. Washington (DC): ACS.
- [14] National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (2018). *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards*. Cincinnati, OH: NIOSH.

- [15] Olympus Corporation. (2023). *Olympus BX Series Microscope Instruction Manual*. Tokyo: Olympus Corporation.
- [16] Thermo Fisher Scientific. (2022). *Thermo Scientific Sorvall Centrifuge User Manual*. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific.
- [17] National Fire Protection Association (NFPA). (2019). *NFPA 45: Standard on Fire Protection for Laboratories Using Chemicals*. Quincy, MA: NFPA.
- [18] International Fire Code Council (ICC). (2021). *International Fire Code*. Country Club Hills, IL: ICC.
- [19] Occupational Safety and Health Administration (OSHA). (2011). *Laboratory Safety*. Washington (DC): U.S. Department of Labor.
- [20] Royal Society of Chemistry (RSC). (2015). *Chemical Safety in Schools and Further Education*. London: RSC.
- [21] Ross, F. M., & Pawley, J. B. (2016). *Modern microscopy techniques for cell biology*. Springer.
- [22] Murphy, D. W. (2018). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. John Wiley & Sons.
- [23] Sanderson, M. J. (2019). *Light microscopy for biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [24] Inoué, S., & Spring, K. R. (2017). *Video microscopy: the fundamentals*. Springer.
- [25] Pawley, J. B. (2015). *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer.
- [26] Pluta, M. (2016). *Advanced light microscopy*. Elsevier.
- [27] Slavik, J. (2014). *Light microscopy*. CRC press.
- [28] Born, M., & Wolf, E. (2019). *Principles of optics: electromagnetic theory of light*. Cambridge university press.
- [29] Carter, M. L. (2018). *Microscopy and analysis of biological materials*. Humana Press.

 **ALUMNI**
EDITORA
2025

PRIMERA EDICIÓN

MANUAL BÁSICO DE PRÁCTICAS DE BIOTECNOLOGÍA

ISBN: 978-9942-7307-9-4



9 789942 730794