



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ

GUÍA DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA II

Docente:

Alberto Cuello Sierra

Bacteriólogo e Ing. de Alimentos

Especialista en Gestión Gerencial

Candidato a Maestría en Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Enfermería e Instrumentación
Quirúrgica





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Directora de Programa Enfermería

Martha Zabaleta

Directora de Programa Instrumentación Q.

Mónica Aldana

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Revisión y corrección de estilo

Edmundo Altamiranda Baldiris

Zarina Durango Herazo

Autor

Alberto Cuello Sierra



TABLA DE CONTENIDO

Presentación.....	4
Normas generales de Bioseguridad en el Laboratorio.....	5
Plan de Trabajo del estudiante.....	7
Materiales para todas las clases.....	8
Práctica N° 1: Uso y manejo del material de laboratorio.....	11
Práctica N° 2: Determinación de glúcidos mediante reacciones de coloración.....	14
Práctica N° 3: Propiedades de los lípidos.....	17
Práctica N° 4: Toma de muestra de sangre.....	21
Práctica N° 5: Cuantificación de glucosa en suero (glicemia).....	25
Práctica N° 6: Cuantificación colesterol.....	28
Práctica N° 7: Cuantificación triglicéridos.....	31
Práctica N° 8: Cuantificación de hemoglobina.....	35
Bibliografía.....	38



PRESENTACIÓN

La bioquímica representa la base molecular de todos los procesos que tienen lugar en los seres vivos. En el área de la salud es necesario el conocimiento tanto del individuo sano como del enfermo, lo cual obliga a saber, no sólo la composición química del organismo, sino los procesos físico – químicos que rigen los fenómenos fisiológicos y patológicos.

El conocimiento de la bioquímica constituye un pilar fundamental para el desarrollo de las ciencias de la salud. Por lo tanto, es de primordial importancia la realización y estudio de prácticas de laboratorio que permitan un acercamiento a los estudiantes de Enfermería y de Instrumentación Quirúrgica a ciertos procedimientos, a la determinación de datos de metabolitos y a su interpretación.

En la parte inicial dentro de las prácticas se realiza un laboratorio de preparación de soluciones y se proponen cálculos que deberán ser de manejo de los estudiantes en posteriores semestres, e importantes para su formación. Se hace énfasis en la forma de expresar los datos y la incidencia de estos en el estado salud o enfermedad de un paciente.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- Utilizar siempre los elementos de barrera apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas, mecheros, etc.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos cortopunzantes como agujas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Utilice, siempre, dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente. Si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7%, y se limpiará luego, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- En caso de rompimiento de un tubo, o derrame en la centrífuga, apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.



- Al inicio y al final de una práctica de laboratorio, o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales, las superficies de las mesas de laboratorio deberán ser descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.
- Toda muestra biológica diferente a orina deberá ser descontaminada con peróxido de hidrógeno al 30% para luego ser eliminada en bolsas rojas.
- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja para su posterior incineración.

PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

1. Lectura, previa, de la guía del laboratorio.
2. Presentarse a la práctica de laboratorio con sus implementos de bioseguridad (Bata blanca, gorro, guantes y tapaboca).
3. Traer a la práctica el portafolio al día.
4. Revisar el sitio de trabajo para constatar su limpieza.
5. Recibir, atentamente, las instrucciones del docente.
6. Realice la práctica siguiendo los pasos definidos por el docente para el procedimiento.
7. Tomar notas sobre los resultados.
8. Finalmente, recoger los materiales, equipos y reactivos utilizados y dejar el puesto de trabajo ordenado y limpio.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

Práctica 1: Uso y Manejo de material de Laboratorio:

- Material de Vidrio
- Material de Porcelana.
- Material metálico.
- Material plástico.
- Material de madera.
- Material de caucho

Práctica 2: Determinación de glúcidos mediante reacciones de coloración:

- Tubos de ensayo
- Estufa.
- Baño serológico.
- Pipetas de 10 ml.
- Pinzas.
- Beakers.
- Gradillas.
- Reactivos.

Práctica 3: Propiedades de los lípidos:

- Tubos de ensayo
- Estufa.
- Baño serológico.
- Pipetas de 10 ml.
- Pinzas.
- Beakers.
- Gradillas.
- Aceite vegetal.



Práctica 4: Toma de muestra:

- Tubos de ensayo
- Estufa.
- Baño serológico.
- Pipetas de 10 ml.
- Pinzas.
- Centrífuga.
- Gradillas.
- Jeringas de 5 ml
- Torniquete.
- Torundas de algodón.
- Alcohol.

Práctica 5: Cuantificación de glucosa en suero (Glicemia):

- Tubos de ensayo
- Baño serológico.
- Pipetas automáticas de 1000 y 10 ul.
- Espectrofotómetro.
- Centrífuga.
- Gradillas.
- Reactivos de glicemia.

Práctica 6: Cuantificación de Colesterol:

- Tubos de ensayo.
- Baño serológico.
- Pipetas automáticas de 1000 y 10 ul.
- Espectrofotómetro.
- Centrífuga.



- Gradillas.
- Reactivos de colesterol.

Práctica 7: Cuantificación de Triglicéridos:

- Tubos de ensayo.
- Baño serológico.
- Pipetas automáticas de 1000 y 10 ul.
- Espectrofotómetro.
- Centrifuga.
- Gradillas.
- Reactivos de triglicéridos.

Práctica 8: Cuantificación de Hemoglobina:

- Tubos de ensayo.
- Baño serológico.
- Pipetas automáticas de 1000 y 10 ul.
- Espectrofotómetro.
- Microcentrifuga.
- Gradillas.
- Reactivos de hemoglobina.
- Lancetas.
- Capilares.
- Tabla para leer micro hematocritos.



PRÁCTICA N° 1

USO Y MANEJO DE MATERIAL DE LABORATORIO

I. INTRODUCCIÓN:

Es de suma importancia iniciar conociendo cada uno de los materiales y equipos utilizados en el laboratorio de bioquímica.

Los equipos y materiales utilizados en el laboratorio de química, constituyen los elementos con los cuales se realizan experimentos y se investiga. Para trabajar con eficiencia en el laboratorio se hace necesario conocer los nombres de los diferentes utensilios, sus usos y características.

En la realización de esta práctica, además de realizar la revisión del uso y manejo del material del laboratorio de química, se mencionan algunas normas de seguridad que deben tenerse en cuenta.

II. OBJETIVOS:

Objetivo General: Familiarizarse con los equipos y materiales de laboratorio de uso corriente.

Objetivos Específicos:

- Realizar consulta bibliográfica sobre materiales y equipos de laboratorio.
- Describir cada uno de los materiales y equipos consultados y presentados en la práctica.

III. PROCEDIMIENTO:

Se describe el material de laboratorio. El material es el siguiente:



Soporte Universal	Aro metálico
Trípode	Pinzas
Nueces	Estufa o Calentadores
Mecheros	Baños termostáticos
Gradilla	Tubo de ensayo
Pipetas	Balones aforados
Matraz Erlenmeyer	Vaso de precipitado
Probeta	Cápsula de porcelana
Mortero de Porcelana	Balanzas
Baño de María	Centrífuga
pH metro	

IV. TALLER DE PREGUNTAS:

- 1) ¿A qué se le da el nombre de mecanismo en los aparatos volumétricos?
Dibújelos.
- 2) En dónde hay más exactitud en la lectura:
 - a) ¿En un beaker o en una bureta?
 - b) ¿En un Erlenmeyer o en una pipeta? Explique
- 3) Proponga una clasificación para los utensilios del laboratorio.
- 4) ¿Cuál de todos estos aparatos utilizarías con mayor frecuencia dentro del desarrollo de tu carrera y en la vida profesional? Explica.



PRÁCTICA Nº 2

DETERMINACIÓN DE GLÚCIDOS MEDIANTE REACCIONES DE COLORACIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Los glúcidos o Carbohidratos tienen gran importancia biológica, pues desempeñan muy diversas funciones:

Proporcionan energía a animales y plantas para su mantenimiento y desarrollo; forman parte de estructuras de sostén en plantas, del exoesqueleto de algunos invertebrados y de la pared bacteriana; contribuyen a la estructura de algunos prótidos complejos y de algunos lípidos complejos y desempeñan importantes acciones desintoxicantes en numerosos organismos por la formación de complejos químicos de fácil eliminación renal.

Químicamente los glúcidos se caracterizan por poseer en su molécula dos o más grupos alcohólicos y un grupo aldehído o cetona, es decir, son polihidroxi aldehídos o polihidroxi cetonas. También se incluyen entre estos compuestos las sustancias que por hidrólisis dan lugar a estos polialcoholes.

Se dividen en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos según el número de moléculas que formen al someterse a hidrólisis.

Para la determinación de los glúcidos generalmente se recurre a reacciones en donde juegan un papel importante, el color, el precipitado, el tiempo de aparición de dicho color; también se identifican por el calentamiento de la sustancia.

La determinación por calentamiento consiste en exponer a calentamiento la sustancia hasta deshidratarla. Mediante este procedimiento la sustancia pierde agua y origina compuestos heterocíclicos de la serie furánica.



Las reacciones de coloración consisten en hacer reaccionar una solución de varias sustancias con determinados reactivos que van a producir una reacción de coloración o un precipitado que, de acuerdo al tiempo de aparición y la intensidad del color y del precipitado, nos van a determinar y diferenciar el glúcido.

Estas coloraciones y precipitado se producen de acuerdo al reactivo que se utiliza y al glúcido que se está determinando; puede formarse bien un compuesto fácilmente oxidable u otro de alto poder reductor.

II. OBJETIVOS:

Objetivo general: Conocer las diferentes reacciones de coloración realizadas en el laboratorio de bioquímica para identificar carbohidratos.

Objetivos específicos:

- Reconocer la importancia y aplicabilidad de las técnicas de coloración en los procesos de identificación de sustancias.
- Discriminar los carbohidratos mediante su reacción con diferentes reactivos.

III. MATERIALES Y REACTIVOS:

Tubos de ensayo	Gradillas
Pipetas	Goteros
Estufas o mecheros	Vasos de precipitado
Mayas de asbesto	Pinzas para tubos
Reactivo de Molisch	Reactivo de Lugol
Reactivo de Seliwanoff	Reactivo de Orcinol
Reactivo de Barfoed	Ácido sulfúrico concentrado



Ácido Clorhídrico diluido

Agua

IV. PROCEDIMIENTO:

1. **Prueba de Molisch:** Mezclando 2 mL de la solución problema con 2 gotas del reactivo de Molisch en un tubo de ensayo, coloque 2 mL de ácido sulfúrico en el fondo del tubo. La aparición de un color violeta indica la presencia de un glúcido.
2. **Prueba de Lugol:** Deposite 2 mL de la solución problema en un tubo de ensayo. Adicione 2 gotas de ácido clorhídrico diluido. Agregue dos gotas de la solución de lugol. La aparición de un color azul intenso indica la presencia de almidón; un color rojo indica la presencia de glucógeno.
3. **Prueba de Fehling:** En un tubo de ensayo colocar 1 mL de la solución problema, agregue 1 mL del reactivo de Fehling A y luego 1 mL de Fehling B. Coloque el tubo en un baño de agua hirviendo. Observe la aparición de un precipitado color rojo ladrillo que indica presencia de azúcares reductores.
4. **Prueba de Orcinol o Bial:** En un tubo de ensayo adicione dos gotas de la solución problema y 2,5 mL de reactivo de orcinol. Caliente al baño de María. La presencia de un color verdoso indica la presencia de una pentosa.
5. **Prueba de Seliwanoff:** Coloque 2 mL del reactivo en un tubo de ensayo. Adicione dos gotas de la solución problema y caliente al baño de María. La prueba será positiva si aparece un color rojo cereza. Este color indica la presencia de cetosas.

V. TALLER DE PREGUNTAS:

1. Establezca una reacción química para la prueba de Fehling
2. Explique por qué la sacarosa es un disacárido no reductor.
3. Escriba la composición química de los reactivos de: Molisch, Bial, Seliwanoff, Fehling, lugol



4. ¿Qué son azúcares reductores?

PRÁCTICA Nº 3

PROPIEDADES DE LOS LÍPIDOS

I. INTRODUCCIÓN

Los lípidos son otro grupo de biomoléculas, estos están integrados por una diversidad muy grande de estructuras, todas ellas compartiendo ciertas propiedades que los identifican y caracterizan como grupo; la principal y más importante es que todos ellos son insolubles en agua y, al mismo tiempo, son solubles en solventes orgánicos como el tetracloruro de carbono, éter, cloroformo y benceno entre otros.

Los lípidos en nuestro cuerpo cumplen múltiples funciones entre ellas se pueden contar que son componentes importantes de la membrana citoplasmática y membranas de organelas celulares; son importante reservorio de energía para nuestro cuerpo; brindan protección térmica y mecánica y algunos funcionan como hormonas.

PROPIEDADES DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos cumplen funciones específicas en el organismo. Las más destacadas son:

- Los lípidos constituyen el material de reserva: las grasas o lípidos simples que pueden acumularse en cantidades prácticamente ilimitadas y en condiciones anhidras (sin agua). Además, el exceso de energía procedente de los carbohidratos, y otros alimentos tomados en la dieta, se almacena en forma de lípidos llamados grasas, que constituyen una reserva de energía y de carbono.
- La acumulación de lípidos debajo de la piel sirve de protección frente al frío, ya que la piel descansa sobre una capa grasa que suaviza la superficie áspera de los huesos y se constituye en una barrera que evita la pérdida excesiva de calor; además, los tejidos adiposos situados entre determinadas vísceras órganos vitales- Son amortiguadores de los golpes que pueden recibir.



- Los lípidos complejos pueden constituir membranas biológicas y lipoproteínas con activas funciones en la bioquímica celular.
- Algunos lípidos en cantidades mínimas tienen función enzimática.
- Existen vitaminas y hormonas que son de naturaleza lipídica.

II. OBJETIVOS:

Objetivo general: Identificar cuáles son las propiedades de los lípidos

Objetivos específicos:

- Desarrollar algunas pruebas que permitan hacer la identificación de los lípidos.
- Conocer las funciones de los lípidos en el organismo humano.

III. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

- Baño María. Mechero.
- Gradillas con tubos de ensayo.
- Vaso de precipitado con agua.
- Aceite vegetal.
- Solución de Sudán III en frasco cuentagotas.
- Tinta roja en frasco cuentagotas.
- Solución de Hidróxido sódico al 20%.
- Éter o cloroformo.

IV. PROCEDIMIENTO:

SAPONIFICACIÓN



Las grasas reaccionan en caliente con el hidróxido sódico o potásico, descomponiéndose en los dos elementos que la forman: glicerina y los ácidos grasos. Estos se combinan con los iones sodio o potasio del hidróxido para dar jabones, que son en definitiva las sales sódicas o potásicas de los ácidos grasos.

TÉCNICA:

Proceder de la siguiente forma:

1. Colocar en un tubo de ensayo 2cc de aceite vegetal y 2cc de una solución de hidróxido sódico al 20%.
2. Agitar enérgicamente y colocar el tubo al baño María de 20 a 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se puede observar tres capas en el tubo: la inferior clara, que contiene la solución de sosa sobrante junto con la glicerina formada; la superior amarilla, de aceite no utilizado y, la intermedia, de aspecto grumoso, que es el jabón formado.

Nota: Cuando ya se ha visto como se forma el jabón, se puede ir echando en un vaso de precipitado el contenido de los tubos de ensayo, se remueve bien y se deja calentar hasta que se haga un buen trozo de jabón.

TINCIÓN:

Las grasas se colorean en rojo anaranjado por el colorante denominado Sudan III.

TÉCNICA:

Proceder así:

1. Disponer en una gradilla dos tubos de ensayo, colocando en ambos 2cc de aceite.
2. Añadir a uno, 4 o 5 gotas de solución alcohólica de Sudán III. Al otro tubo añadir 4-5 gotas de tinta roja. Agitar ambos tubos y dejar reposar.
3. Se observará en el tubo al que se le añadió Sudán, que todo el aceite aparece teñido. En cambio en el frasco al que se añadió tinta roja, la tinta se habrá ido al fondo y el aceite aparecerá sin teñir.

SOLUBILIDAD:

Las grasas son insolubles en agua. Cuando se agitan fuertemente en ella, se dividen en pequeñísimas gotitas formando una "emulsión" de aspecto lechoso, que es transitoria, pues desaparece en reposo por reagrupación de las gotitas de



grasa en una capa que por su menor densidad se sitúa sobre la de agua. Por el contrario, las grasas son solubles en los llamados disolventes orgánicos como el éter, benceno, xilol, cloroformo, etc.

TÉCNICA:

Proceder de la siguiente manera:

1. Tomar dos tubos de ensayo y poner en cada uno de ellos 2-3 cc de agua y en el otro 2-3cc de éter u otro disolvente orgánico.
2. Añadir a cada tubo 1cc de aceite y agitar fuertemente. Observar la formación de gotitas o micelas y dejar en reposo. Se verá como el aceite se ha disuelto en el éter y, en cambio, no lo hace en el agua, y el aceite subirá debido a su menor densidad.

III. TALLER DE PREGUNTAS:

1. Construya una ecuación química que represente la reacción de saponificación
2. Explique por qué las grasas y en general los lípidos son insolubles en agua
3. Cómo está conformado el reactivo Sudan III. Explique por qué las grasas se dejan colorear de este.
4. ¿Qué tipo de lípidos son perjudiciales para la salud? Anote ejemplos.
5. ¿Qué clase de lípidos son benéficos?
6. Realice un mapa conceptual de la clasificación de los lípidos.



PRÁCTICA Nº 4

TOMA DE MUESTRA DE SANGRE

I. INTRODUCCIÓN:

La sangre es un tejido que circula dentro del sistema virtualmente cerrado de los vasos sanguíneos. Está compuesta por elementos (eritrocitos, leucocitos, plaquetas) y por el plasma, el líquido que mantiene las células en suspensión. Si se centrifuga sangre a la cual se ha agregado un anticoagulante apropiado, las células se depositan en el fondo del tubo mientras que el plasma, de color amarillo pajizo, queda por encima de estas.

Cuando no se agregan anticoagulante a la sangre y, por lo tanto, se permite su coagulación, después de cierto tiempo se separa del coagulo un líquido transparente que es el suero.

La sangre se coagula al transformarse una proteína soluble del plasma llamada fibrinógeno en una proteína insoluble compuesta por fibras que forman redes y que es la fibrina. Esta fibrina se destruye en los organismos por una enzima llamada plasmina. En el laboratorio se puede destruir y remover por agitación con superficie de vidrio (Varilla o perlas) y a este proceso se llama desfibrinización de la sangre.

Para los exámenes de sangre, se emplea generalmente sangre venosa. Estas muestras deben tomarse en condiciones uniformes.

II. OBJETIVOS:

Objetivo general:



- Conocer la importancia de la sangre como fluido vital a través del cual se determinan los niveles de diversas sustancias de importancia biológica.

Objetivos específicos:

- Familiarizarse con este tipo de procedimientos y las precauciones a tener en cuenta.
- Conocer el tratamiento que se debe dar a la muestra de sangre después de la toma.

III. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

Jeringa desechable de calibre 20 o 21	Ligadura (Tubo de caucho)
Algodón	Alcohol antiséptico
Tubos de ensayo	Capilares de vidrio
Centrifuga	Pipetas pasteur

IV. PROCEDIMIENTO:

Las jeringas y agujas deben estar esterilizadas y también deben estar secas para evitar la hemólisis. La aguja más apropiada es la calibre 20 a 21. Se coloca una ligadura o torniquete (Tubo de caucho débil) alrededor del brazo, a unos 5 o 7 cms por encima del codo.

Haga que su compañero cierre y abra la mano varias veces y luego cierre el puño. Este procedimiento tiene por objeto el que la vena aumente de volumen.

Elija una vena prominente sobre la superficie de flexión del antebrazo. Esterilice la piel con algodón humedecido en alcohol.



Inmovilice la vena con el pulgar e introduzca la aguja en la vena, manteniendo hacia arriba el borde biselado.

Afloje el torniquete mientras la aguja se halle aun en la vena, así evita los cambios químicos que produce el estasis de la sangre.

Obtenga 5mL de sangre, colóquelos inmediatamente en un tubo de centrifuga seco. Deje en reposo durante 5 minutos para que se produzca la coagulación, corte el coagulo adherido a las paredes del tubo utilizando las capilares de vidrio y centrifugue por 5 minutos a 2500 rpm.

Tome el suero, deposítelo en tubos de ensayo y guárdelos en congelador para las próximas prácticas donde determinaremos glucosa, triglicéridos, closterol.

DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE UNA SOLUCIÓN

COLOREADA

El espectro de absorción de luz de una solución puede representarse mediante una gráfica de transmitancia o de absorbancia frente a diferentes longitudes de onda. Algunas sustancias, dependiendo de su naturaleza química, presentan una mayor o menor absorbancia en una región espectral amplia, otras presentan una absorción específica a una longitud de onda característica.

Las curvas espectrales determinan la longitud de onda en la cual la solución presenta la máxima absorción de luz. Por lo tanto, el trazado de una curva espectral de una solución nos da informaciones sobre su color y su naturaleza química.

En el laboratorio se utiliza el ESPECTROFOTOMETRO para determinar el color de las soluciones coloreadas producidas por la reacción de ciertas sustancias (cromóforos) con metabolitos (Glucosa, Colesterol, Triglicéridos, etc.).



En el análisis fotométrico en ausencia de una curva de calibración se puede utilizar un solo dato de absorbancia de una solución de concentración conocida (patrón) para averiguar la concentración de una solución problema; estableciendo la siguiente relación:

La absorbancia del patrón (A_p) es proporcional a la concentración del patrón (C_p) como la absorbancia de la muestra (A_m) es proporcional a la concentración de la muestra (C_m).

Así tenemos:

$$C_m = \frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

V. TALLER DE PREGUNTAS:

1. Para qué tipo de pruebas se utilizan los tubos tapa roja, tapa azul, verde, lila y gris.
2. Dibujar el sistema venoso del brazo, identificando las venas utilizadas para la extracción sanguínea.
3. Describir paso a paso el procedimiento de toma de muestra de sangre.
4. Por qué se recomienda realizar la cuantificación de biomoléculas (glucosa, colesterol y triglicéridos) en ayuna.

PRÁCTICA N° 5

CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO (GLICEMIA)



I. INTRODUCCIÓN:

La cuantificación de glucosa en sangre se refiere a la determinación de la concentración de ésta en dicho fluido; a esta prueba se le puede llamar también simplemente determinación de glicemia. Este análisis se usa como principal punto de referencia al momento de hacer diagnóstico de **diabetes**.

La diabetes no tratada se reconoce por presentar una elevación crónica de la glicemia, llamada hiperglicemia. Este aumento en los niveles de la glucosa en sangre se debe a un déficit total o parcial de insulina, que implica una disminución de la metabolización de la glucosa en la célula y, en consecuencia, un aumento de esta en la sangre; y, según sea el déficit de insulina, un incremento en la acidez corporal que puede llegar a ser incompatible con la vida.

II. OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Explicar el fundamento de la técnica de cuantificación de glucosa en el suero sanguíneo.

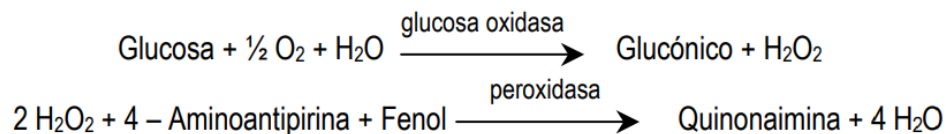
Objetivos específicos:

- Reconocer el valor normal (valor de referencia) para la prueba y utilidad de este.
- Interpretar correctamente el resultado de la determinación.

III. MÉTODO:

Método enzimático colorimétrico (Glucosa Oxidasa / Peroxidasa)

IV. FUNDAMENTO:



La intensidad del color se determina con el espectrofotómetro o colorímetro, a una longitud de onda (λ) de 500 nm.



V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

Tubos de ensayo.

Pipetas automáticas.

Muestras.

Colorímetro.

Reactivo para Glucosa.

Papel absorbente.

VI. MUESTRA

Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

	TUBO		
	M	P	B
Suero Muestra	10 μ L		
Suero Patrón		10 μ L	
Reactivo de Coloración	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

Mezclar e incubar durante 10 min. a 25°C (temperatura ambiente), luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco.

Cm = Concentración de la Muestra

Cp = Concentración del patrón



CÁLCULOS

$$C_m = \frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

Con la fórmula anterior se realizan los cálculos de la concentración de la glucosa en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.

VIII. TALLER DE PREGUNTAS:

- 1) Con la fórmula anterior se realizan los cálculos de la concentración de la glucosa en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
- 2) Establezca la secuencia ordenada de reacciones, indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
- 3) Investigar en que consiste el test o'sullivan y en qué tipo de pacientes está indicado.
- 4) Explique cuáles son los criterios clínicos actuales para diagnosticar diabetes.
- 5) Explique para qué se utiliza la prueba de hemoglobina glucosilada y fructosamina, cuáles son sus valores de referencia?

PRÁCTICA Nº 6

CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL

I. INTRODUCCIÓN:



El colesterol es un compuesto fundamental en los tejidos, pues forma parte de las membranas celulares y es el precursor inmediato de varias biomoléculas esenciales para la vida, como las hormonas, esteroides y los ácidos biliares.

El colesterol presente en el organismo procede de la dieta y de la biosíntesis que las células realizan a partir de acetyl-CoA. El exceso de esta biomolécula se excreta como tal en las descamaciones celulares de la piel e intestino, lo mismo que por las secreciones gástricas, pancreáticas o intestinales; también tras la conversión del colesterol en hormonas esteroides y ácidos biliares y posterior degradación de estos, apareciendo en el tracto gastrointestinal y en la orina.

Los niveles óptimos de colesterol dependen de un perfecto equilibrio entre la ingesta y la síntesis por un lado, y de la excreción de esta biomolécula por otro lado. Si el equilibrio se rompe puede producirse un aumento de ese nivel óptimo y, en consecuencia, la aparición a mediano plazo de graves problemas tales como, aterosclerosis, que finalmente genera accidentes cardiocirculatorios (infarto del miocardio, angina de pecho o hemorragias cerebrales).

El colesterol presente en la sangre puede existir de dos maneras. Una es esterificado con ácidos grasos y la otra es libre, es decir, sin esterificar; la suma de estas dos fracciones diferentes se denomina colesterol total.

II. OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Conocer la importancia de medir los niveles de colesterol.

Objetivos específicos:

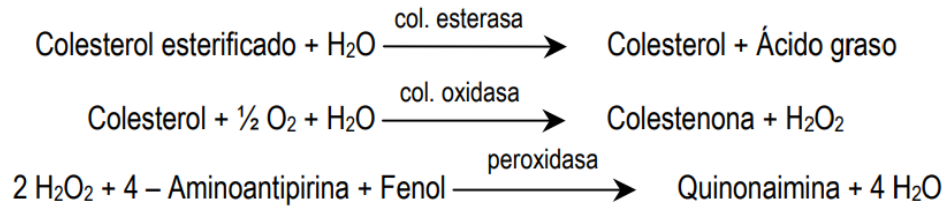
- Correlacionar los niveles de colesterol con las posibles patologías.
- Aplicar el método enzimático de cuantificación de colesterol para comprender su fundamento.

III. MÉTODO:

Método enzimático colorimétrico (Colesterol Oxidasa / Peroxidasa)

IV. FUNDAMENTO:

Tanto el colesterol libre como el esterificado presente en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

Tubos de ensayo.

Pipetas automáticas.

Colorímetro.

Reactivo para colesterol.

Papel absorbente.

VI. MUESTRA

Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO			
Reactivo	M	P	B
Suero Muestra	10 μ L		
Suero Patrón		10 μ L	
Reactivo de Coloración	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

Mezclar e incubar durante 10 min. a 25°C (temperatura ambiente), luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco.



CÁLCULOS

$$C_m = \frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

C_m = Concentración de la Muestra

C_p = Concentración del patrón

Con la fórmula anterior se realizan los cálculos de la concentración del colesterol en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.

La absorbancia del compuesto coloreado obtenido a partir de la muestra se mide en un colorímetro a 550 nm y se compara con la absorbancia de otro obtenido de una solución estándar de colesterol.

VIII. TALLER DE PREGUNTAS:

- 1) Con la fórmula anterior se realizan los cálculos de la concentración de colesterol total en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
- 2) Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
- 3) Que variación le haría a este **método de laboratorio**, para poder obtener el dato de concentración del colesterol en su forma esterificada. Recuerde que:

Colesterol total = colesterol libre + colesterol esterificado

PRÁCTICA N° 7

CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICERIDOS

I. INTRODUCCIÓN



Las grasas y los aceites que existen en animales y plantas son mezclas de triacilgliceroles (triglicéridos). Estos compuestos no polares insolubles en agua son triésteres de colesterol y ácidos grasos.

La función principal de los triglicéridos en los animales y el hombre es servir de reservorios de energía, por lo que constituyen la más abundante clase de lípidos, si se tiene en cuenta que no son componentes de las membranas.

Un grupo de enzimas denominadas Lipasas, se necesitan para hidrolizar enzimáticamente a los triglicéridos de reserva, liberando ácidos grasos que pueden exportarse a otros tejidos, donde los requieren como combustibles.

II. OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Conocer la importancia de medir los niveles de triglicéridos.

Objetivos específicos:

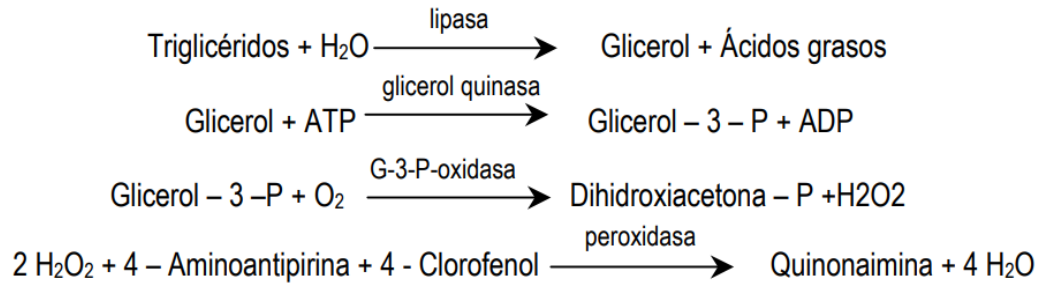
- Correlacionar los niveles de triglicéridos encontrados en la muestra con posibles patologías.
- Explicar el fundamento de la técnica de cuantificación de triglicéridos en el suero sanguíneo.

III. MÉTODO:

El Método utilizado es el GLICEROL FOSFATO OXIDASA/PEROXIDASA

IX. FUNDAMENTO:

En el laboratorio, los triglicéridos son determinados después de la hidrólisis con lipasas. El indicador es Quinoneimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4 – aminoantipirina y 4 – clorofenol bajo la influencia catalítica de peroxidasa.



IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

Tubos de ensayo.

Pipetas automáticas.

Muestras.

Colorímetro.

Reactivo para triglicérido.

Papel absorbente.

V. MUESTRA

Suero

VI. PROCEDIMIENTO:

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

	TUBO



	M	P	B
Suero Muestra	10 μ L		
Suero Patrón		10 μ L	
Reactivo de Coloración	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

Mezclar e incubar durante 10 min. a 25°C (temperatura ambiente), luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco.

CÁLCULOS

$$C_m = \frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

C_m = Concentración de la Muestra

C_p = Concentración del patrón

Con la formula anterior se realizan los cálculos de la concentración de triglicéridos en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.

La absorbancia del compuesto coloreado, obtenido a partir de la muestra, se mide en un colorímetro a 550 nm y se compara con la absorbancia de otro obtenido de una solución estándar de triglicéridos.

VII. TALLER DE PREGUNTAS:

- 1) Con la fórmula anterior se realizan los cálculos de la concentración de triglicéridos en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
- 2) Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
- 3) Explique por medio de un esquema, cómo está constituido un triglicérido.





PRÁCTICA Nº 8

CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA

I. INTRODUCCIÓN:

La hemoglobina es el componente principal de los glóbulos rojos, químicamente es una proteína conjugada propia del conjunto de las hemoproteínas; tiene como función principal transportar oxígeno de los pulmones hacia los tejidos.

Una molécula de hemoglobina consta de dos pares de cadenas de polipéptidos, denominados en conjunto globina; cuatro grupos prostéticos denominados hem o hemo, los cuales contienen cada uno un átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}). Cada grupo hem está unido a una cadena polipeptídica en un sitio determinado de ella.

Una molécula de hemoglobina tiene la capacidad de combinarse con cuatro moléculas de oxígeno, por medio del hierro ferroso de cada grupo hem presente en las cadenas (cada hierro une a una molécula de oxígeno).

La hemoglobina no asociada al oxígeno se denomina hemoglobina reducida (Hb); cuando cada grupo hem se asocia a una molécula de oxígeno, se forma la oxihemoglobina (HbO_2); tanto en la Hb como en la HbO_2 el hierro del grupo hem permanece como ion ferroso; cuando el hierro se oxida a hierro ferrico (Fe^{3+}) se forma la metahemoglobina o hemoglobina (Hi) y la molécula pierde la capacidad de combinarse con el oxígeno.

La anemia es la alteración más corriente relacionada con la hemoglobina; consiste en una disminución de su concentración por debajo de lo normal, se presenta como una complicación de otras enfermedades. La hemoglobina también puede verse aumentada en ciertos trastornos por superproducción de glóbulos rojos, caso que recibe el nombre de policitemia. Junto con otros parámetros hematológicos. La determinación de hemoglobina se utiliza para evaluar estados anémicos, pérdidas de sangre, hemólisis, y policitemia; además, que ayuda al diagnóstico de enfermedades relacionadas con los casos mencionados.



II. OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Conocer el método para cuantificar hemoglobina en sangre humana.

Objetivos específicos:

- Comparar los resultados con los niveles normales y determinar posibles anomalías.
- Permitir aplicar el método de la cianometahemoglobina para aprender a cuantificar hemoglobina en sangre humana.

III. MÉTODO:

Método de Drabkin

IV. FUNDAMENTO:

La hemoglobina reacciona con el reactivo de Drabkin, el cual contiene ferrocianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), cianuro de potasio (KCN) y bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$).

La mayoría de las formas de hemoglobina que se encuentran en la sangre son convertidas en metahemoglobina (hemiglobina, Hi) por acción del $K_3Fe(CN)_6$; posteriormente la Hi reacciona con KCN, que proporciona los iones cianuro (CN) para formar cianometahemoglobina (HiCN), el cual es un compuesto coloreado que tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 540nm.

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

Tubo de ensayo grande y pequeño.	Vaso de precipitado de 500 mL.
Pipeta graduada de 5 mL.	Pipeta automática de 5 – 50 mL.
Jeringa.	Algodón y alcohol antiséptico.
Agitador.	Colorímetro.
S.R. de Drabkin	Anticoagulante (EDTA)



Patrón de hemoglobina.

Papel absorbente

IV. MUESTRA

Sangre

V. PROCEDIMIENTO:

Extraer 3 mL de sangre; tratar con anticoagulante (1mL de EDTA al 1%) agite para homogenizar.

- Coloque 5 mL de reactivo de Drabkin en un tubo de ensayo.
- Con una pipeta de hemoglobina, vierta en el tubo que contiene Drabkin, 0,02 mL de sangre bien homogenizada, para asegurar la completa adición de la sangre, limpie la parte exterior de la pipeta con papel absorbente, luego enjuáguela por dentro con la mezcla recién formada, por lo menos 3 veces.
- Agite y deje reposar por 10 minutos.
- Prepare un blanco y patrón y lea en el espectrofotómetro la absorbancia a 540 nm.
- Realice los cálculos para hallar la concentración de hemoglobina.



BIBLIOGRAFÍA

ALVEAR SEDAN, Ciro C. Bioquímica humana de las bases a la ciencia. Universidad de Cartagena: 2007

DEVLIN, Tomas M., Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté, S.A.: Madrid. 2000

HERRERA, Emilio. Elementos de bioquímica. Interamericana Mc. GraW Hill S.A. de C.V: México. 2007

HICKS G. Juan José. Bioquímica 2ª edición. Mc GraW Hill Interamericana: México. 2007

HOLUM, John R. Fundamentos de Química General, Orgánica y Bioquímica para ciencias de la salud. Limusa Wiley: México. 2007

LOZANO T, J.A. Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. Interamericana Mc. GraW Hill S.A. de C.V: México. 2010

MATHEWS, Christopher; HOLDE, K. E.; AHERN, Kevin. Bioquímica, 6º edición. Person Addison Wesley: Madrid. 2012.

MAYES, Peter A. Bioquímica de Harper. El Manual moderno, S.A. De C.V.: México. 2015

VOET, Donald; VOET, Judith. Bioquímica, 5º edición. Editorial médica panamericana: Buens aires. 2014

PAGINAS WED

<http://www.acienciasgalilei.com/qui/libros-electronicos-qui.htm>

http://www.natureduca.com/quim_indice.php

<http://www.quimicaweb.net/>





CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

Campus Cartagena

Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla

Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 110

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

