



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ

PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO
DE BIOQUÍMICA
II Semestre

Alberto Cuello Sierra
Bacteriólogo – Ingeniero de Alimentos
Esp. Gestión Gerencial

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Odontología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2019

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

Directora programa de Odontología

Patricia Castro Villamizar

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Félix Barrios Ramos

Revisión y corrección de estilo

Raúl Padrón Villafañe

Autor

Alberto Cuello Sierra



CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO...	5
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE.....	6
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES.....	7
PRÁCTICA N° 1 AGUA – PH- Y SISTEMAS DE AMORTIGUAMIENTO...	8
PRÁCTICA N° 2 DETERMINACION DE GLUCIDOS MEDIANTE REACCIONES DE COLORACIÓN.....	10
PRÁCTICA N° 3 PROPIEDADES DE LOS LÍPIDOS.....	12
PRÁCTICA N° 4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA.....	15
PRÁCTICA N° 5 USO Y MANEJO DE ESPECTROFOTÓMETRO (CONSTRUCCIÓN DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN).....	18
PRÁCTICA N° 6 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO (GLICEMIA).....	24
PRÁCTICA N° 7 CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL TOTAL.....	26
PRÁCTICA N° 8 CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.....	29
PRÁCTICA N° 9 CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL HDL (PERFIL LIPÍDICO).....	32
PRÁCTICA N° 10 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA	36
PRÁCTICA N° 11 CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	41



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 solo 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, determinación de datos de metabolitos y 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 y que son 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

- 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 centrifuga 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

1. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
2. Guantes desechables.
3. Mascarilla o tapabocas.
4. Gafas de protección.
5. Toalla pequeña.
6. Muestra solicitada.
7. Papel absorbente.
8. Guías de laboratorio previamente estudiadas.
9. Folder. Tema y # de la práctica a desarrollar, objetivos, materiales, procedimiento, resultados (Dibujos), conclusión personal y desarrollo de talleres.
10. Papel logarítmico, lápiz, borrador, sacapuntas, calculadora.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS



PRÁCTICA N°1 AGUA – pH- Y SISTEMAS DE AMORTIGUAMIENTO

I. INTRODUCCIÓN

El agua es una sustancia extraordinaria cuyas propiedades son de gran importancia biológica; es la de mayor abundancia en los seres vivos: constituye alrededor del 70% del peso de estos. Esta molécula se encuentra tanto en la célula como en el espacio intercelular. Asimismo, es el medio de transporte de nutrientes, hormonas y metabolitos, y participa en la catálisis enzimática y en los procesos relacionados con la transferencia de energía química.

Las estructuras y la función celular de nuestro cuerpo se encuentran perfectamente adaptadas a las propiedades químicas y físicas del agua. De todas las propiedades fisicoquímicas de esta, la tendencia a ionizarse es de crucial importancia en la estructura y función de las biomoléculas, por lo cual es necesario una revisión de este tópico en términos de constante de equilibrio y pH; la molécula de agua y sus productos de ionización (H^+ y OH^-) influyen de manera definitiva en la forma de ensamble y en las propiedades de los componentes celulares, incluyendo enzimas, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos. Sin embargo lo que realmente hace que el agua sea una molécula importante es su gran capacidad como disolvente, lo cual tiene su explicación en las fuerzas de atracción entre las moléculas de este compuesto y la posibilidad de formar puentes de hidrógeno.

Solo por lo anterior se puede evidenciar la importancia del agua para los seres vivos, es por eso que todo curso de bioquímica debe iniciarse en el estudio de esta maravillosa biomolécula a la cual, por su cercanía a nosotros, muchas veces no le damos la importancia que se merece; claro que en el momento en que nos hace falta comenzamos a valorarla como se debe.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Reconocer las características principales de la molécula del agua.

Objetivos específicos

- Comprender las funciones biológicas del agua.
- Manejar el concepto de pH en el contexto fisiológico.
- Comprender qué es un amortiguador fisiológico y cómo funcionan.

III. PROCEDIMIENTO

Para lograr los objetivos propuestos, se debe realizar una amplia y actualizada revisión bibliográfica, así como intercambiar conceptos recogidos por los demás participantes del



grupo. Para el máximo rendimiento del trabajo se debe ampliar la visión de las respuestas, buscando conectar unas con otras y evitando dar soluciones puntuales y desconectadas entre sí.

IV. TALLER

TALLER 1. AGUA: ESTRUCTURA Y CAPACIDAD DISOLVENTE

1. Explique por qué la molécula de agua es polar.
2. ¿Qué tipos de compuestos puede disolver el agua?
3. ¿Por qué el benceno no puede ser disuelto por el agua?
4. ¿Qué son los puentes de hidrógeno?
5. ¿Qué relación existe entre los puentes de hidrogeno y el alto punto de ebullición o el bajo punto de fusión del agua?
6. Anote qué otros tipos de enlaces no covalentes se conocen. Explíquelos.
7. Indique a qué razón obedece la variación en el contenido acuoso de los diferentes tejidos del cuerpo (Qué tipo de tejidos del cuerpo tienen mayor composición acuosa y cuales tienen menor y por qué)

TALLER 2. PH Y BUFFER

1. Defina ácidos y bases (fuertes y débiles).
2. ¿Qué es la constante de equilibrio en las reacciones reversibles?
3. ¿Qué es y qué indica pH? ¿Cuál es su definición matemática?
4. ¿En qué intervalo de pH se mantiene la sangre?
5. ¿Cómo pueden los organismos vivos mantener el pH adecuado en cada sección de su cuerpo?
6. Describa cómo está conformado un sistema de amortiguamiento o solución amortiguadora. ¿Qué otros nombres recibe?



PRÁCTICA Nº 2 DETERMINACIÓN DE GLUCIDOS 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 importante acción desintoxicante 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 y también se identifica 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 va a determinar y diferenciar el glúcido.

Estas coloraciones y precipitado se producen de acuerdo al reactivo que se utiliza y del 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.
- Pipetas.
- Estufas o mecheros.
- Pinzas para tubos.
- Reactivo de Seliwanoff.
- Reactivo de Orcinol.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Ácido Clorhídrico diluido.
- Gradillas.
- Mallas de asbesto.
- Vasos de precipitado.
- Goteros.
- Reactivo de Molisch.
- Reactivo de Lugol.
- Reactivo de Barfoed.
- 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, agregar 1 mL del reactivo de Fehling A y luego 1 mL de Fehling B. Colocar 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 comparten 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 organelos celulares; son importantes reservorios 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 u 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 de 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 en el tubo tres capas: 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 cómo 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.

TINCION

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 o 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.

V. 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 Nº4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA

I. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente tres cuartas partes de los sólidos del organismo son proteínas. Estas comprenden las proteínas estructurales, las enzimas, las nucleoproteínas, las proteínas de transporte de oxígeno, las proteínas contráctiles del músculo, las proteínas plasmáticas y muchas otras que realizan el cuerpo funciones específicas, tanto extracelular como intracelularmente. Además de ser los constituyentes estructurales fundamentales de las células, las proteínas participan prácticamente en todos los procesos del ser vivo: transporte, catálisis enzimática, control homeostático, regulación hormonal, coagulación de la sangre, inmunidad, crecimiento, cicatrización de heridas y herencia.

El grupo de proteínas plasmáticas mencionado antes está constituido por cerca de 100 proteínas cuya función se realiza en el plasma sanguíneo. Aunque todos los fluidos corporales contienen proteínas, son las proteínas plasmáticas las más frecuentemente utilizadas para establecer diagnósticos clínicos, ya que la concentración de muchas de ellas cambia de manera característica en determinadas condiciones fisiológicas. La proteína plasmática más abundante es la albúmina, y la mayor parte de las restantes se conocen colectivamente con el nombre de globulinas. Algunas proteínas plasmáticas son enzimas, como por ejemplo los factores de coagulación. Algunas proteínas plasmáticas y sus funciones se relación a continuación:

- **Transporte:** apolipoproteínas, albúmina, transferrina.
- **Inmunidad:** inmunoglobulinas.
- **Mantenimiento de presión osmótica:** todas, particularmente la albúmina.
- **Enzimas:** renina, factores de coagulación.
- **Inhibidores de proteasas:** antitripsina $\alpha 1$.
- **Regulación del pH (tampón):** todas.

Por lo general, la variación de la concentración de proteínas plasmáticas totales depende de:

- a) La variación de la velocidad de síntesis proteica.
- b) La variación de su velocidad de degradación.
- c) Cambios en el volumen de distribución.

En los dos primeros casos, los cambios ocurren en un periodo de tiempo largo, ya que están asociados a procesos altamente regulados. Sin embargo, la variación del volumen de distribución puede ocurrir de forma rápida, y por lo general está asociada al estado de hidratación del paciente.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprender los fundamentos químicos que permiten la cuantificación de proteínas totales, y albúmina en suero y aplicar las técnicas de laboratorio actuales para el desarrollo de destrezas procedimentales requeridas para el óptimo desempeño profesional en el laboratorio clínico.

Objetivos específicos

Al finalizar la práctica el estudiante estará en capacidad de:

- Cuantificar proteínas totales en suero humano.
- Cuantificar albúmina en suero humano.
- Aplicar la fórmula del proteinograma y su importancia clínica.
- Explicar los fundamentos químicos del método utilizado.
- Describir la utilidad clínica de la cuantificación de proteínas y albúmina en suero humano.

III. MÉTODO

Biuret- BCG.

IV. FUNDAMENTO

La cuantificación de proteínas totales se basa en el reconocimiento de proteínas con el reactivo de Biuret (método colorimétrico). Este método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ion Cu^{++} del reactivo y los nitrógenos amídicos del enlace peptídico. Por lo tanto, este reactivo reconoce específicamente la presencia de enlaces peptídicos. Se utiliza como blanco el reactivo de Biuret y el color generado por la muestra se compara con un estándar.

V. MÉTODO

Albúmina - BCG.

VI. FUNDAMENTO

La cuantificación de albúmina presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol en medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

VII. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Reactivo de Biuret.
- Estándar de proteínas.
- Reactivo de albúmina.
- Estándar de albúmina.
- Espectrofotómetro UV- Visible.



- Micro pipetas de 5 a 25 µl, de 50 a 200 µl y de 200 a 1000 µl.
- Cubetas plásticas.
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.
- Puntas amarillas y azules.

VIII. MUESTRA

- Suero o plasma.

IX. PROCEDIMIENTO

El estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos durante el laboratorio (**ver insertos**).

FORMULA DE PROTEINOGRAMA:

$$\text{PROTEINAS TOTALES (g/dl)} = \text{ALBÚMINA (g/dl)} + \text{GLOBULINAS(g/dl)}.$$

X. TALLER

- Exprese la concentración de proteínas totales y albúmina obtenida en g/dL.
- Escriba con sus propias palabras lo que entiende por proteínas séricas, proteínas plasmáticas, las diferentes fracciones que las componen y dé ejemplos de proteínas incluidas en cada fracción junto con sus principales funciones.
- Investigue la utilidad diagnóstica de la cuantificación de proteínas totales y albúmina.
- Describa otros métodos de utilidad para el análisis de proteínas.
- Explique el concepto de **electroforesis de proteínas** y diagrame un proteinograma característico de un paciente sano. Argumente qué tipo de características estructurales de las proteínas hacen posible la migración electroforética.



PRÁCTICA N°5
USO Y MANEJO DE ESPECTROFOTÓMETRO
(CONSTRUCCIÓN DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN)
Determinación de la curva espectral y la curva de calibración
de una solución coloreada

I. INTRODUCCIÓN

El espectro de absorción de luz de una solución puede representarse mediante una gráfica de transmitancia o de absorbancia frente a diferentes longitudes de ondas; dicha gráfica permite determinar la longitud de onda específica a la cual una solución presenta la máxima absorción de energía.

La curva de calibración para una solución determinada se refiere a la gráfica de absorbancia o transmitancia contra concentración, esto es, la gráfica que muestra la cantidad de energía absorbida o transmitida por una solución a diferentes concentraciones

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aprender a usar el espectrofotómetro

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento del espectrofotómetro
- Realizar la curva de calibración del espectrofotómetro.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Algunas sustancias en solución, dependiendo de su naturaleza química, pueden absorber energía en un rango de longitudes de onda característico (visible, UV, IR etc); la máxima cantidad de energía absorbida por una solución de este tipo depende en principio de dos factores: el primero es la concentración de la sustancias en la solución y el segundo es la longitud de onda de la radiación a la cual se somete la solución. Para aplicar la colorimetría es necesario determinar la longitud de onda que permite la máxima absorción de energía por la solución, puesto que esa longitud onda es con la que se debe trabajar en el colorímetro cuando se desea determinar la concentración de una muestra problema. (espectro de absorción)

Para todas las biomoléculas, que pueden ser cuantificadas por colorimetría, ya está determinada la longitud de onda específica a la cual cada una de ellas presenta su mayor absorción de energía.

En los análisis fotométricos se necesita siempre de uno o varios puntos de referencia con quien hacer comparaciones, a través de las cuales es posible el cálculo numérico de la



concentración de la solución problema. En la construcción de una curva de calibración se usan varios patrones o soluciones de referencia, (son soluciones que contienen una concentración determinada y estandarizada de la molécula que se está cuantificando en el proceso); estas gráficas constituyen una de las herramientas para realizar el cálculo que conlleva a la determinación de la concentración de la solución problema, por interpolación en dicha gráfica de la absorbancia o de la transmitancia obtenida del instrumento, cuando se ha expuesto la solución problema a la longitud de onda característica para ella.

No obstante lo anterior, en un análisis fotométrico cualquiera, incluida la colorimetría, 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 es proporcional a la concentración de la solución del patrón así como la absorbancia de la muestra es proporcional a la concentración de la solución de la muestra”; esta expresión sugiere una relación directa entre la concentración de una solución coloreada y la cantidad de energía absorbida por dicha solución. Para el cálculo matemático se aplica la siguiente ecuación:

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

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

IV. PROCEDIMIENTO

CURVA ESPECTRAL

Haga una serie de diluciones, a partir de una solución de azul de metileno de 100mg/L; a una longitud de onda apropiada determine cuál de las disoluciones presenta una transmitancia de 30 o 40%. Para leer estas soluciones, fije el instrumento en 100% de transmitancia usando agua destilada como blanco.

Escoja la solución que presentó la transmitancia de 30 o 40% y lea su absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 660, 680, 700 nm.

Con los datos obtenidos, trace en papel milimetrado la curva espectral correspondiente, graficando las longitudes de onda (abscisa) contra las absorbancias (ordenadas).



CURVA DE CALIBRACIÓN

De la solución de azul de metileno de 100mg/L prepare 100 ml de una solución que dé una lectura de 10% de transmitancia a la longitud de onda determinada en el procedimiento anterior. Use agua destilada como blanco para hacer la determinación pedida.

A partir de la solución antes preparada haga una serie de diluciones a un volumen final de 10ml con agua destilada que contenga 2, 4, 5, 8, 10 ml de dicha solución. Lea la absorbancia de cada una de las soluciones antes preparadas. Utilice la misma longitud de onda del paso anterior.

Con los datos obtenidos trace en un papel milimetrado la curva de calibración correspondiente, graficando las concentraciones en mg/ml (abscisas) y la absorbancia (ordenadas).

ESPECTROFOTOMETRÍA (COLORIMETRÍA)

La espectrofotometría es un método de **análisis cuantitativo**, de amplia aplicación en la sección bioquímica de los laboratorios clínicos.

La espectrofotometría de absorción en la **región visible** también llamada colorimetría, es un método que permite determinar la concentración de una molécula en solución, basada, por un lado, en la capacidad que tienen ciertas sustancias de absorber la energía radiante de esta parte del **espectro electromagnético** y por otro lado, en la relación que existe entre cantidad de energía absorbida y concentración de la molécula en solución.

Para que puedas entender mejor la anterior definición es necesario hacer un estudio sobre las generalidades y aspectos básicos referente a radiación electromagnética.

La **radiación electromagnética (REM)** es la forma de movilización a grandes velocidades de la **energía radiante** a través del espacio. La energía radiante se propaga en el espacio en forma de un tren de ondas que se moviliza a la vez dentro de un campo eléctrico y un campo magnético, de allí el término radiación electromagnética. Puesto que la REM tiene características de onda es costumbre describir la radiación dando su longitud de onda expresada en manómetros (nm) o su frecuencia en centímetros a las menos uno (cm^{-1}).

Dependiendo de la longitud de onda o la frecuencia de las ondas, la REM se encuentra dividida en 7 zonas: rayos gamma, rayos X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), microondas, ondas de radio; esta clasificación se encuentra en orden creciente de longitud de onda y en orden decreciente de frecuencia. La cantidad de energía asociada a la radiación es directamente proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda. El conjunto de todas ellas es denominado Espectro Electro-Magnético (EEM)

Para el laboratorio clínico, los tipos de REM de mayor utilidad son la radiación UV, la visible y la IR. La primera comprende las ondas que van desde 185 a 380 nm; la segunda las que



van desde 380 a 700 nm y la tercera la comprende el grupo de ondas con longitudes entre 750 a 15.000 mn.

La región denominada visible comprende los fotones que por su cantidad de energía y su longitud de onda pueden ser captados por los ojos humanos, de allí su nombre; los fotones de esta región del EEM son reconocidos con el nombre general de colores y se organizan de mayor a menos cantidad de energía así:

LONGITUD DE ONDA	MATIZ
400- 450 nm	violeta
450- 500 nm	azul
500- 570 nm	verde
570- 590 nm	amarillo
590- 620 nm	anaranjado
620- 700 nm	rojo

Los intervalos indicados en la tabla para cada color son aproximados, pues no existe un límite definido entre dos colores del espectro, sino una variación gradual del matiz a lo largo de todo el, en otras palabras no hay exactitud de dónde termina uno y dónde empieza el otro.

Fuente: Tomado de: Omicrono Ciencia Química;

<https://omicrono.espanol.com/2015/10/por-que-tu-gin-tonic-cambia-de-color-en-la-discooteca/>

Después de lo anterior se puede entender con más claridad que existen moléculas que estando en solución tienen la capacidad de absorber en su estructura fotones de la región visible del EEM y que la cantidad de energía absorbida por la solución es directamente proporcional a la concentración de dicha solución (**Ley de Lamber-Beer**); además, en virtud de esto último, la concentración de una solución se puede establecer por comparación de la cantidad de energía absorbida por la solución problema y la cantidad de energía absorbida por una solución patrón o referencia, que es aquella de la cual se tiene información precisa y exacta de su concentración así:

La cantidad de energía absorbida por la muestra problema (A_m) es proporcional a la concentración de la solución de dicha muestra (C_m); así como la cantidad de energía absorbida por la solución de referencia (A_p) es proporcional a la concentración de la solución de referencia (C_p); en otras palabras se establece una regla de tres simple directa:

$$A_p \longrightarrow C_p$$

$$A_m \longrightarrow C_m$$

Si C_m es la incógnita

Entonces:

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

Donde:

C_m = concentración de la muestra

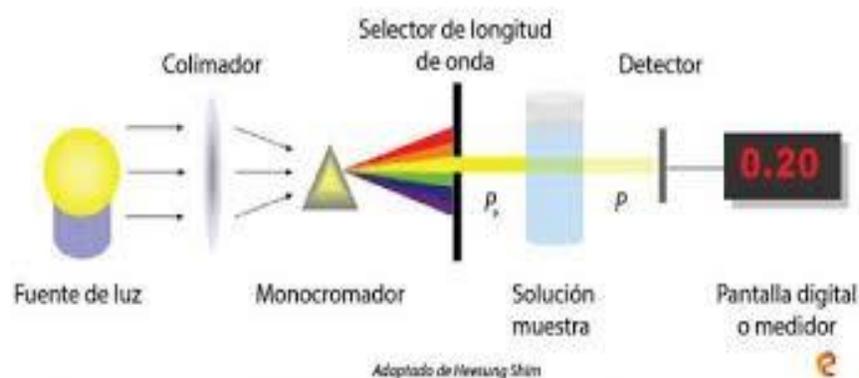
C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

El espectrofotómetro es el instrumento diseñado para emitir y medir la cantidad de energía que puede ser absorbida por moléculas apropiadas en solución; consta de las siguientes partes generales:

- 1) Foco: es la fuente de radiación continua.
- 2) Monocromador o elemento difractor: es un artefacto que permite en primera medida difractar la luz y en segunda seleccionar la radiación de longitud de onda requerida.
- 3) Cubetas, celdas o portamuestras: son los recipientes que contienen la solución que se van a exponer a la radiación.
- 4) Detector, este artefacto tiene como función determinar la cantidad energía absorbida por la solución que se expone y convertir la energía luminosa en corriente eléctrica.
- 5) Medidor, tablero o pantalla, que es dónde se hace la lectura de la medición.



Fuente: tomado de Espectrofotómetro: <https://elespectrofotometro.com/partes/>



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°6 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.

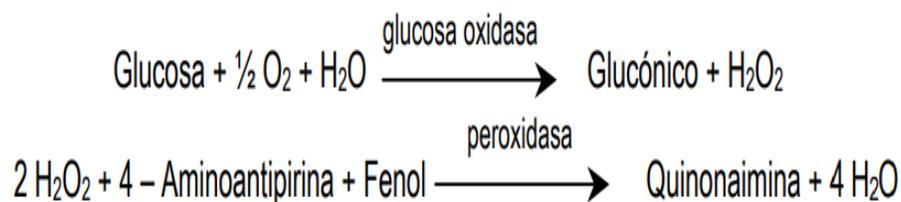
Objetivos específicos

- 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. 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

A_m = Absorbancia de la muestra

A_p = Absorbancia del patrón

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

VI. TALLER DE PREGUNTAS

- 1) Con la formula anterior se realizan los cálculos de la concentración de 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 7 CUANTIFICACION DE COLESTEROL TOTAL

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 acetil-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

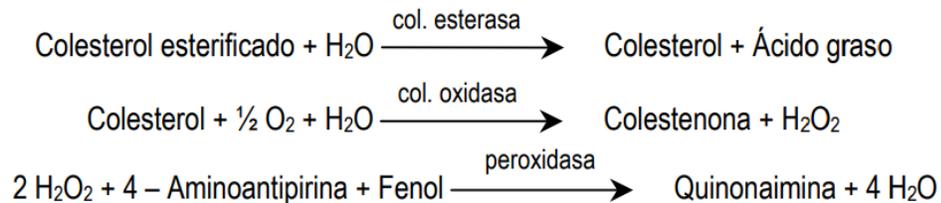
III. MÉTODO

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
- Muestras
- Colorímetro
- Reactivo para colesterol
- Papel absorbente

VI. 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

A_m = Absorbancia de la muestra

A_p = Absorbancia del patrón

Con la formula anterior se realizan los cálculos de la concentración de 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.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

- 1) Con la formula 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) ¿Qué 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°8 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:

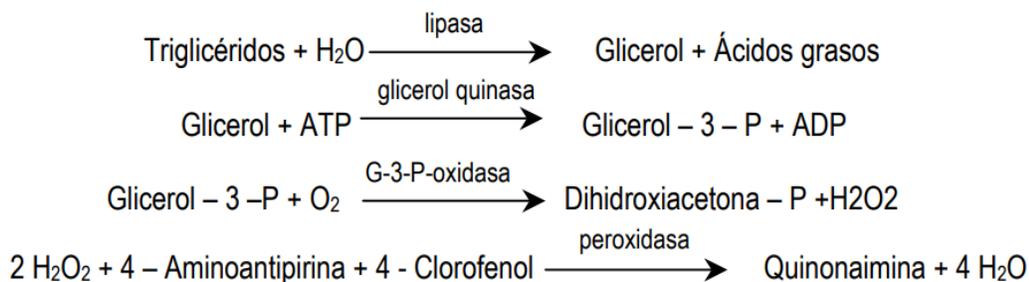
- Correlacionar los niveles de triglicéridos encontrados en la muestra, con posibles patologías.
- Explicar el fundamento de la técnica de cuantificación de triglicéridos en el suero sanguíneo.

III. MÉTODO

El método utilizado es el Glicerol Fosfato Oxidasa/Peroxidasa

IV. FUNDAMENTO

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



V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Tubos de ensayo
- Pipetas automáticas
- Muestras
- Colorímetro
- Reactivo para triglicérido
- Papel absorbente

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

A_m = Absorbancia de la muestra

A_p = Absorbancia del patrón

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.

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 9

CUANTIFICACION DE COLESTEROL HDL (PERFIL LIPIDICO)

I. INTRODUCCIÓN

Para que una sustancia sea considerada como un lípido, según la definición clásica, debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ser insoluble en agua y soluble en solventas orgánicos
- Ser actual o potencialmente un éster de ácido graso
- Ser utilizada por los organismos vivos

Los lípidos séricos incluyen triglicéridos, colesterol, fosfolípidos, ésteres de colesterol, ácidos grasos no esterificados, alcoholes de elevado peso molecular, carotenoides, hormonas esteroideas y las vitaminas A, D, y E.

El colesterol, aunque en su molécula no contiene ácidos grasos, su núcleo esterol se sintetiza a partir de los productos de degradación de los ácidos grasos en nuestro organismo. El colesterol cumple importantes funciones, entre las cuales podemos señalar las siguientes:

- Hace parte integral de las membranas celulares
- Se conjuga con otras sustancias para formar sales biliares, lo que favorece la digestión y absorción de grasas.
- Es el precursor de las hormonas de naturaleza esteroideas.

Por otra parte, los triglicéridos son triacilgliceroles, es decir están formados por una molécula de glicerol esterificada con tres ácidos grasos. Los triglicéridos representan la reserva energética ubicada en el tejido adiposo, la cual en condiciones de ejercicio o ayuno prolongado es movilizada y metabolizada en el organismo para obtener energía para los procesos celulares endergónicos. El hecho de que los carbohidratos se pueden convertir en triglicéridos explica por qué ante un exceso de estos, existe aumento de tejido adiposo y por ende de peso corporal.

Hoy en día la cuantificación de estos marcadores del metabolismo lipídico ha tomado gran interés debido a la alta frecuencia de pacientes con hiperlipidemias en el mundo, los cuales están expuestos al desarrollo de problemas cardiovasculares. Estas enfermedades, dentro del grupo de las enfermedades crónicas, muestran altos valores de mortalidad en diversos tipos de poblaciones, cuando ante un exceso de lípidos en la sangre se genera un proceso aterogénico e inflamatorio que ocasiona la obstrucción de la irrigación sanguínea en zonas específicas de diversos tejidos tan importantes como el coronario.



A partir de este preámbulo el estudio de los lípidos y lipoproteínas séricas se constituye en una herramienta clínica importante para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del paciente. Los lípidos en el suero están asociados a proteínas (apoproteínas) formando las partículas lipoproteínas cuya función es el transporte de los lípidos a lo largo de todo el torrente sanguíneo. Existen diferentes tipos de partículas lipoproteínas de acuerdo con la naturaleza proteica y la composición lipídica, entre las cuales las LDL, y las partículas remanentes del metabolismo de los Quilomicrones y las VLDL juegan un papel crucial en el inicio del depósito que, en el endotelio vascular, origina la presencia de ateromas.

La concentración de colesterol **LDL (LDLc)** indica de forma más precisa (que la determinación de colesterol total) el riesgo aterogénico de un paciente; y la de colesterol **HDL (HDLc)**, la inversa de dicho riesgo.

Valores por encima de 100 mg/dl de **(LDLc)**, o valores por debajo de 35 mg/dL de **(HDLc)**, se consideran de riesgo. Así, los aumentos de **(LDLc)**, se consideran como el principal factor de riesgo cardiovascular de tipo lipídico, mientras que el aumento de HDL-Colesterol es considerado como un factor protector de enfermedad cardiovascular debido a su función en el transporte inverso de colesterol, sus propiedades antioxidantes, antitrombóticas y su acción antiinflamatoria.

El cuantificar los lípidos séricos como los triglicéridos y colesterol contenido en las lipoproteínas ofrece un dato certero sobre la cantidad de partículas lipoproteínas en sangre, de forma que se convierten indiscutiblemente en marcadores del metabolismo lipoproteico y factores de riesgo cardiovascular en el paciente.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprender el valor diagnóstico de las pruebas de triglicéridos, colesterol total, LDLc y HDLc, así como los fundamentos bioquímicos que permiten su cuantificación en suero, mediante el análisis y la aplicación de los protocolos de uso actual, para desarrollar así destrezas procedimentales que contribuyan a un óptimo desempeño profesional en el laboratorio clínico.

Objetivos específicos

- Cuantificar los niveles de Triglicéridos y colesterol total en suero humano.
- Cuantificar los niveles de **HDLc** en el suero de un paciente.
- Calcular los niveles de **LDLc** mediante la aplicación de la fórmula de Friedewald.
- Calcular el valor de las **VLDLc**.
- Explicar los fundamentos químicos de los métodos utilizados.
- Describir la utilidad clínica del perfil lipídico, los valores normales y las patologías implicadas con el metabolismo de las lipoproteínas.



III. MÉTODO

Prueba enzimática colorimétrica para colesterol.

IV. FUNDAMENTO

El colesterol se determina después de la hidrólisis enzimática y la oxidación. El indicador es la quinoneimina formada por el peróxido de hidrógeno y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peroxidasa.

V. MÉTODO

Prueba enzimática colorimétrica para triglicéridos.

VI. FUNDAMENTO

La enzima lipoproteinlipasa hidroliza triglicéridos a glicerol y ácidos grasos, este glicerol tras la acción de glicerol quinasa se convierte en glicerol-3-fosfato que se oxida a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno oxida al cromógeno a un compuesto de color que es leído espectrofotométricamente.

VII. MÉTODO

Método colorimétrico enzimático para HDL colesterol.

VIII. FUNDAMENTO

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante contiene las lipoproteínas de elevada densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente.

IX. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Reactivo de Colesterol
- Estándar de Colesterol.
- Reactivo de Triglicéridos.
- Estándar de Triglicéridos.
- Reactivo de HDL c.
- Estándar de HDL c.
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Micropipetas de 5 a 25 µl, de 50 a 200 µl y de 200 a 1000 µl
- Cubetas plásticas
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas
- Puntas amarillas y azules.

X. MUESTRA

- Suero o plasma.



XI. PROCEDIMIENTO

El estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos durante el laboratorio (**ver insertos**).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LDLC

La fórmula de Friedewald nos permite averiguar la fracción LDL colesterol (LDLc) si conocemos el colesterol total (CT), la fracción HDL colesterol (HDLc) y los triglicéridos (TG), usando la siguiente expresión matemática:

$$\text{LDL-Colesterol} = \text{Colesterol Total} - [\text{HDL Colesterol} + (\text{Triglicéridos}/5)]$$

En la fórmula de Friedewald, el cociente TG/5 indica el contenido de colesterol en las **VLDL**, siempre que éstas sean normales.

XII. TALLER

- Describa las funciones biológicas del colesterol y triglicéridos en el organismo humano.
- Investigue las condiciones que debe cumplir el paciente antes de la toma de la muestra para la cuantificación de lípidos.
- Realice una revisión bibliográfica para plantear un mapa conceptual de las dislipidemias y su clasificación.
- Investigue los valores de referencia para estas biomoléculas.
- Investigue sobre los procesos patológicos de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.
- Investiga el mecanismo mediante el cual se produce la aterogénesis.



PRÁCTICA N° 10 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA

I. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente tres cuartas partes de los sólidos del organismo son proteínas. Estas comprenden las proteínas estructurales, las enzimas, las nucleoproteínas, las proteínas de transporte de oxígeno, las proteínas contráctiles del músculo, las proteínas plasmáticas y muchas otras que realizan el cuerpo funciones específicas, tanto extracelular como intracelularmente. Además de ser los constituyentes estructurales fundamentales de las células, las proteínas participan prácticamente en todos los procesos del ser vivo: transporte, catálisis enzimática, control homeostático, regulación hormonal, coagulación de la sangre, inmunidad, crecimiento, cicatrización de heridas y herencia.

El grupo de proteínas plasmáticas mencionado antes está constituido por cerca de 100 proteínas cuya función se realiza en el plasma sanguíneo. Aunque todos los fluidos corporales contienen proteínas, son las proteínas plasmáticas las más frecuentemente utilizadas para establecer diagnósticos clínicos, ya que la concentración de muchas de ellas cambia de manera característica en determinadas condiciones fisiológicas. La proteína plasmática más abundante es la albúmina, y la mayor parte de las restantes se conocen colectivamente con el nombre de globulinas. Algunas proteínas plasmáticas son enzimas, como por ejemplo los factores de coagulación. Algunas proteínas plasmáticas y sus funciones se relación a continuación:

- **Transporte:** Apolipoproteínas, Albúmina, Transferrina
- **Inmunidad:** Inmunoglobulinas
- **Mantenimiento de presión osmótica:** Todas, particularmente la Albúmina
- **Enzimas:** Renina, Factores de coagulación
- **Inhibidores de proteasas:** Antitripsina $\alpha 1$
- **Regulación del pH (tampón):** Todas.

Por lo general, la variación de la concentración de proteínas plasmáticas totales depende de:

- a) La variación de la velocidad de síntesis proteica.
- b) La variación de su velocidad de degradación.
- c) Cambios en el volumen de distribución.

En los dos primeros casos, los cambios ocurren en un periodo de tiempo largo, ya que están asociados a procesos altamente regulados. Sin embargo, la variación del volumen de distribución puede ocurrir de forma rápida, y por lo general está asociada al estado de hidratación del paciente.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprender los fundamentos químicos que permiten la cuantificación de proteínas totales, y albúmina en suero y aplicar las técnicas de laboratorio actuales para el desarrollo de



destrezas procedimentales requeridas para el óptimo desempeño profesional en el laboratorio clínico.

Objetivos específicos

Al finalizar la práctica el estudiante estará en capacidad de:

- Cuantificar proteínas totales en suero humano.
- Cuantificar albúmina en suero humano.
- Aplicar la fórmula del proteinograma y su importancia clínica.
- Explicar los fundamentos químicos del método utilizado.
- Describir la utilidad clínica de la cuantificación de proteínas y albúmina en suero humano.

III. MÉTODO

Biuret- BCG.

IV. FUNDAMENTO

La cuantificación de proteínas totales se basa en el reconocimiento de proteínas con el reactivo de Biuret (método colorimétrico). Este método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ión Cu^{++} del reactivo y los nitrógenos amídicos del enlace peptídico. Por lo tanto, este reactivo reconoce específicamente la presencia de enlaces peptídicos. Se utiliza como blanco el reactivo de Biuret y el color generado por la muestra se compara con un estándar.

V. MÉTODO

Albúmina - BCG.

VI. FUNDAMENTO

La cuantificación de albúmina presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol en medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

VII. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Reactivo de Biuret.
- Estándar de proteínas.
- Reactivo de albúmina.
- Estándar de albúmina.
- Espectrofotómetro UV- Visible.
- Micro pipetas de 5 a 25 μl , de 50 a 200 μl y de 200 a 1000 μl .
- Cubetas plásticas.
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.



- Puntas amarillas y azules.

VIII. MUESTRA

- Suero o plasma.

IX. PROCEDIMIENTO

El estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos durante el laboratorio (**ver insertos**).

FORMULA DE PROTEINOGRAMA:

$$\text{PROTEINAS TOTALES (g/dl)} = \text{ALBÚMINA (g/dl)} + \text{GLOBULINAS(g/dl)}.$$

X. TALLER

- Exprese la concentración de proteínas totales y albúmina obtenida en g/dL.
- Escriba con sus propias palabras lo que entiende por proteínas séricas, proteínas plasmáticas, las diferentes fracciones que las componen y dé ejemplos de proteínas incluidas en cada fracción junto con sus principales funciones.
- Investigue la utilidad diagnóstica de la cuantificación de proteínas totales y albúmina.
- Describa otros métodos de utilidad para el análisis de proteínas.
- Explique el concepto de **electroforesis de proteínas** y diagrame un proteinograma característico de un paciente sano. Argumente qué tipo de características estructurales de las proteínas hacen posible la migración electroforética.



PRÁCTICA N°11 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 férrico (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 disfunción de su concentración por debajo de lo normal, se presenta como 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 ferricianuro 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.

VI. 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

1. Alvear Sedan CC. Bioquímica humana de las bases a la ciencia. Universidad de Cartagena: 2007
2. Devlin TM., Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté, S.A.: Madrid. 2000
3. Herrera, E. Elementos de bioquímica. Interamericana Mc. GraW Hill S.A. de C.V: México. 2007
4. Hicks JJ. Bioquímica. 2ª ed. Mc GraW Hill Interamericana: México. 2007
5. Hollum, JR. Fundamentos de Química General, Orgánica y Bioquímica para ciencias de la salud. Limusa Wiley: México. 2007
6. Lozano JA. Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. Interamericana Mc. Graw Hill S.A. de C.V: México. 2010
7. Mathews C; Holde KE, Ahern K. Bioquímica, 6º ed. Pearson Addison Wesley: Madrid. 2012.
8. Mayes, PA. Bioquímica de Harper. El Manual moderno, S.A. De C.V.: México. 2015
9. Voet D, Voet J. Bioquímica, 5º ed. Editorial médica Panamericana: Buenos aires. 2014
10. Centro de Estudio Galilei. Libros electrónicos de química [Internet]. Consultado el 23 de marzo de 2019. Disponible en: <http://www.acienciasgalilei.com/qui/libros-electronicos-qui.htm>
11. Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación. Química: índice de artículos [Internet]. Naturaleza Educativa. Consultado el 23 de Marzo de 2019. Disponible en: http://www.natureduca.com/quim_indice.php
12. Recio Miñarro J. Química Web [internet]. Consultado el 23 de marzo de 2019. Disponible en: <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.

