



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA

**DEPARTAMENTO DE FORMACIÓN BÁSICA
DISCIPLINARIA**

**MANUAL DE LABORATORIO
DE BIOQUÍMICA MÉDICA II**

ELABORADO POR:

QFB MARÍA DEL SOCORRO AGUILAR ESPEJEL

IBQ HÉCTOR GUILLERMO GÓMEZ COVARRUBIAS

M. EN C. THELMA GUADALUPE LEMUS FLORES

Junio 2014

ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	3
REGLAMENTO DEL LABORATORIO	4
PRÁCTICA	
1 AZUCARES REDUCTORES DE LA LECHE	6
2 HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	9
3 ALIMENTACIÓN Y GLUCOSA SANGUÍNEA	13
4 IDENTIFICACIÓN DEL GLUCÓGENO	16
5 DESHIDROGENASA LÁCTICA Y NAD	20
6 HIDRÓLISIS ALCALINA DE LOS LÍPIDOS	24
7 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS LÍPIDOS	27
8 TRIGLICÉRIDOS	31
9 COLESTEROL	35
10 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	40
11 UREA	42
12 ÁCIDO ÚRICO	46
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXO 1. RELACIÓN DE REACTIVOS	50
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	52

INTRODUCCIÓN

La vida y sus manifestaciones de reproducción, crecimiento, envejecimiento, muerte y descomposición, es un infinito arreglo y rearreglo espacial de moléculas en el correr del tiempo. El estudiante de medicina debe comprender y familiarizarse con este concepto en su formación académica profesional.

Este Manual de Laboratorio tiene como objetivo principal proporcionar a nuestros estudiantes una guía para ilustrar su conocimiento teórico y para que logre desarrollar algunas habilidades para solicitar e interpretar los exámenes de laboratorio clínico, por otro lado podrá comprender la importancia de estos y su aplicación en el diagnóstico clínico porque la Bioquímica Clínica moderna se basa en la medición de los componentes de los distintos líquidos corporales.

Para el logro de estos objetivos, los alumnos deberán leer cuidadosamente el material que se proporciona, debe seguir el protocolo que se sugiere para el desarrollo de las prácticas. Sin embargo lo más importante para lograr la comprensión del conocimiento teórico es la investigación bibliográfica previa que deberá realizar cada alumno de manera individual para que después pueda discutir con sus compañeros de equipo tanto el desarrollo como los resultados obtenidos en el laboratorio.

En este mismo manual podrán anotar las observaciones del equipo, las gráficas o tablas, así como los cálculos necesarios que sean solicitados por tu profesor, los dibujos o fotos (dependiendo de la práctica), así como las conclusiones del trabajo realizado.

El profesor indicará los criterios de evaluación de la parte práctica del curso de Bioquímica Médica II.

Como todo lugar de trabajo o estudio, para que todo se desarrolle de manera adecuada evitando los errores o los accidentes en lo posible, se deben seguir ciertos lineamientos por cada uno de los participantes; alumnos, profesores y personal de apoyo en el laboratorio. Es por ello que debes leer el siguiente reglamento que debes seguir como parte de tu formación disciplinaria.

REGLAMENTO DE LABORATORIO

1. Solo tienen derecho a realizar prácticas de laboratorio, los alumnos inscritos oficialmente.
2. En cada práctica habrá una tolerancia de 10 minutos para la entrada; **no habrá retardos y se pondrá falta a quien no llegue a la hora.**
3. Para el trabajo del laboratorio es indispensable **traer bata**, una franela, marcador de tinta permanente, así como jabón de tocador para el aseo de sus manos una vez finalizada la práctica.
4. Dentro del laboratorio, el alumno deberá guardar la debida compostura, esto es no sentarse en las mesas de trabajo, ni dirigirse a su profesor (a) o compañeros del grupo en voz alta.
5. Durante el desarrollo de la práctica queda estrictamente prohibido la entrada de personas ajenas al grupo, así como **comer o beber.**
6. El material del laboratorio roto, deteriorado o extraviado por los alumnos deberá reponerse por el responsable directo, o por el equipo de personas que efectuaron la práctica.
7. La información referente a las prácticas que se desarrollarán en el curso, están contenidos en el Manual del Laboratorio de Bioquímica Médica II, por lo que el alumno **deberá traer su manual impreso** en cada sesión de trabajo.
8. El uso de reactivos peligrosos estará restringido únicamente al profesor.
9. Evite el contacto de productos químicos con la piel; si esto ocurre lavar rápidamente con abundante agua.
10. Manipular el material de vidrio con especial atención, para evitar lesiones por cristalería rota.
11. Al término de la sesión, el alumno deberá dejar limpio su área de trabajo y el material de desecho será colocado correctamente en los recipientes específicos destinados para ello. **Desde la primera sesión y en todas ellas, deberá el**

alumno verificar la colocación y existencia de dichos recipientes. De no encontrarlos preguntar al profesor donde se desechará el material.

12. El Informe de las prácticas realizadas, deberá hacerse según instrucciones del profesor (a) y en la fecha señalada por éste(a).

13. El alumno que falte a alguna práctica, tendrá calificación de cero en la misma.

PRÁCTICA 1**AZUCARES REDUCTORES DE LA LECHE**

Objetivo. El alumno determinará la presencia de azúcares reductores como la lactosa en leche entera y glucosa y galactosa en leche deslactosada que son carbohidratos importantes en la alimentación.

INTRODUCCIÓN

La leche está constituida en promedio por 87% de agua y 13% de llamados sólidos lácteos dentro de los que se encuentran:

Proteínas: pueden fluctuar entre 3 y hasta 4% y comprende los diversos tipos de caseína (alfa-1, alfa-2, beta-2 y kappa), lactoalbúminas que pueden representar entre el 15 a 20% de las proteínas. Además contiene una fracción no proteica formada por urea y amoníaco.

Lípidos: Contiene 32 g/l, de los cuales el 99% se encuentra en forma de triglicéridos y el resto como fosfolípidos, glicolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, esteroides y vitaminas liposolubles.

Carbohidratos: Siendo la lactosa el principal componente de este grupo de moléculas, con algunas trazas de glucosa y galactosa.

Componentes inorgánicos: Constituyen el principal aporte mineral de la leche, especialmente calcio, fósforo y magnesio, los cuales se encuentran asociados a las caseínas, por lo que precipitan conjuntamente con ellas. El potasio, sodio y cloro, son fundamentales para la osmolaridad, por lo que están en estrecha relación con la lactosa.

La lactosa es un carbohidrato compuesto de dos unidades de azúcar (disacárido). Consiste en una molécula de β -galactosa unida por un enlace β 1-4 a una molécula de glucosa. La lactosa, azúcar encontrada en la leche crea problemas digestivos a muchas personas de la población mundial. Ciertos individuos tienen en su sistema poco o nada de la enzima lactasa, de este modo la lactosa no se hidroliza y se desplaza hacia el intestino delgado donde es fermentada causando gas y diarrea severa.

Fuera de dejar de consumir leche, aquéllos que sufren de intolerancia a la lactosa, puede tomar leche deslactosada especialmente formulada. Aunque el nombre es poco apropiado. No significa que de alguna manera la lactosa haya sido separada de la leche. Más bien, la enzima lactasa ha sido agregada a ella, para poder

descomponer la lactosa en glucosa y galactosa digeribles. Como resultado, la leche deslactosada puede ser un poco más dulce que la leche normal.

MATERIAL POR EQUIPO

- 2 Probetas de 100 ml
- 1 Probeta de 50 ml
- 2 Vasos de precipitados de 250 ml
- 2 Telas de algodón 30 x 30 cm
- 2 Embudos de 15 cm de diámetro
- 2 Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- 2 Papeles filtro de poro abierto
- 2 Tubos de ensayo de 22 x 175 mm
- 2 Pipetas de 10 ml
- 2 Pipetas de 5 ml

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Vasos de precipitados de 600 ml
- 1 Parrilla de gas con rejillas de asbesto

REACTIVOS

- Solución de ácido acético al 15%
- Reactivo de Fehling **A**
- Reactivo de Fehling **B**
- Agua de la llave
- Leche entera de vaca
- Leche deslactosada de vaca

DESARROLLO:

Separación de azúcares reductores de la leche.

1. Agrega 100 ml de leche **entera** de vaca en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, calentarla por 5 minutos.
2. Agregar a la leche 37 ml de ácido acético al 15%.
3. Filtrar empleando una gasa, colocar el líquido en un vaso de precipitados de 250 ml, el filtrado a obtener se llamará **líquido 1**.
4. Separa el sólido y desecharlo.
5. Repite lo anterior (pasos **1**, **2**, **3** y **4**), pero ahora empleando leche **deslactosada**, el filtrado a obtener se llamará **líquido 2**.

Identificación de azúcares reductores.

1. Colocar en un tubo de ensaye 10 ml del **líquido 1**.
2. Agregar al tubo anterior, 3 ml de reactivo de Fehling **A** y 3 ml de reactivo de Fehling **B**, mezclar el contenido y calentar a baño María de agua hirviendo, durante 8 minutos.
3. Hacer observaciones.
4. Repetir los pasos **1**, **2** y **3** empleando el **líquido 2**.

CUESTIONARIO:

1. ¿Para qué se agrega ácido acético a la leche?
2. ¿Cuáles son las proteínas de la leche?
3. ¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de la lactosa?
4. ¿Para qué se utiliza el reactivo de Fehling en la práctica?
5. ¿Qué es un azúcar reductor?
6. ¿Con qué otro reactivo se puede identificar a la lactosa de la leche?
7. Con respecto a la intolerancia a la lactosa contesta lo siguiente:
 - ¿Por qué se presenta?
 - ¿Cuáles son los síntomas?
 - ¿Cuál es la diferencia entre la intolerancia primaria y la secundaria?
 - ¿En qué tipo de población es más frecuente?

PRÁCTICA 2**HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN**

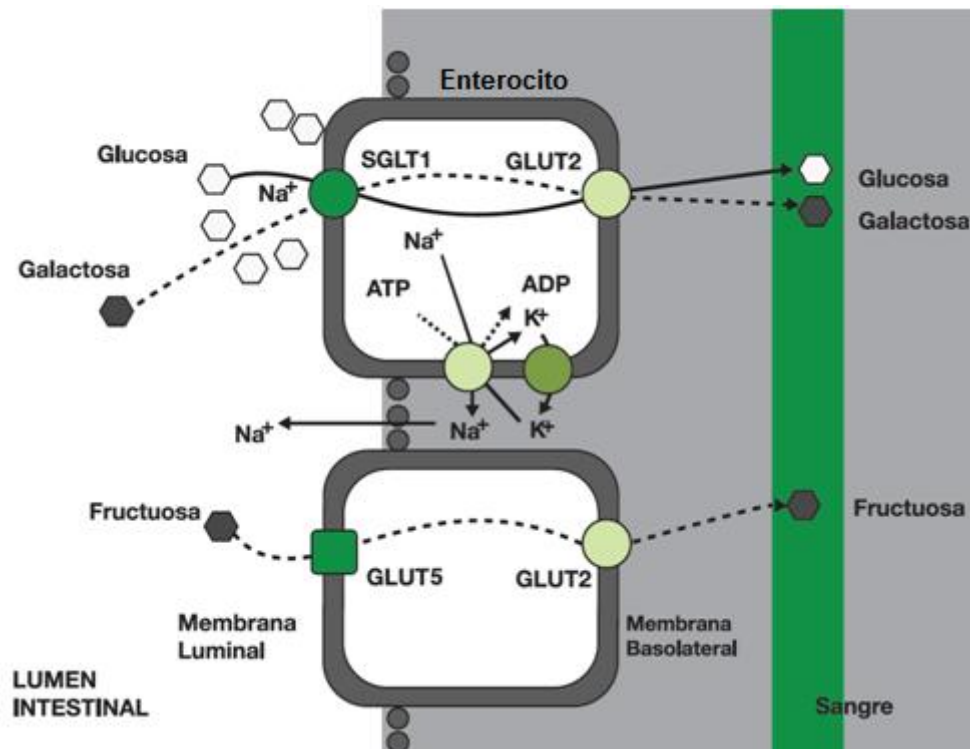
Objetivo. Mediante reacciones específicas, el alumno demostrará que en la saliva está presente la enzima α -amilasa, la cual hidroliza los enlaces glicosídicos del almidón obteniéndose maltosa y glucosa, esto permitirá al estudiante el comprender la importancia de las enzimas en el proceso inicial de la digestión.

INTRODUCCION

La saliva contiene una mezcla de componentes y entre ellos la enzima llamada amilasa salival o ptialina, que hidroliza el enlace α -1,4 tanto del polisacárido almidón como del glucógeno de la dieta, liberando moléculas de maltosa, maltotriosa, una mezcla de oligosacáridos ramificados y glucosa. Como parte de sus propiedades cinéticas esta enzima cataliza la hidrólisis del almidón de manera óptima a pH de 7.0, por lo que a pH por arriba o por debajo de este valor su actividad se minimiza.

La digestión de los polisacáridos continúa al nivel del duodeno con la amilasa pancreática cuya acción es semejante a la amilasa salival, hidroliza almidón y glucógeno hasta maltosa, maltotriosa y una mezcla de oligosacáridos ramificados y algo de glucosa. Junto con la amilasa a nivel del duodeno trabajan las enzimas maltasa, lactasa y sacarasa, que hidrolizan a sus disacáridos correspondientes, dando como resultado un gran número de moléculas de monosacáridos, especialmente hexosas en donde predomina la glucosa, y que son absorbidos principalmente a nivel del yeyuno.

El transporte tanto de la glucosa como de la galactosa a través del borde ciliado de las células de la mucosa intestinal, ocurre mediante un proceso activo que requiere de energía y que involucra a una proteína transportadora específica (SGLT) así como de la presencia de iones sodio. La absorción de glucosa se produce contra un gradiente de concentración, es decir, de una concentración relativamente baja en el lumen intestinal a una mayor concentración intracelular (enterocito). Posteriormente estos monosacáridos pasan del enterocito a la circulación porta por un sistema de transporte facilitado a través de los GLUT 2, como se puede ver en la siguiente figura:



MATERIAL POR EQUIPO

- 7 Tubos de 16 X 150 mm
- 4 Pipetas de 5 ml
- 1 Pipeta de 2 ml
- 3 Pipetas de 1 ml
- 1 Pipeta de 0.1 ml
- 1 Embudo
- 1 Gasa de 10 X 10 cm
- 1 Gradilla
- 1 Matraz Erlenmeyer de 125 ml
- 1 Pinza para tubo de ensaye

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Vasos de 600 ml
- 1 Baño María a 37°C
- 1 Parrilla de gas con rejillas de asbesto

REACTIVOS

- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B

Reactivo de Lugol para almidón (20%)
Solución de almidón al 2%*
Solución reguladora pH = 4
Solución reguladora pH = 7
Equipo de glucosa oxidasa Spinreact 1001192

* Calentar la solución a baño maría para disolver el almidón.

DESARROLLO:

Obtención de la enzima amilasa salival.

- a) Colocar una gasa extendida dentro del embudo y después colocar éste sobre un matraz de 125 ml.
- b) Recolectar 10 ml de saliva filtrada a través de la gasa, la saliva puede ser de una o de varias personas del equipo que previamente se enjuagaron la boca con agua potable.

Experimento 1. Acción de la amilasa salival sobre los almidones.

- a) Marcar tubos con los números 1,2 y 3.
- b) Agregar a los tubos 5 ml de solución de almidón.
- c) Agregar a los tubos uno y dos, 1 ml de saliva, agitar e incubar los dos tubos en el baño maría a 37°C durante 15 minutos, el tubo número tres dejarlo a temperatura ambiente.
- d) Agregar al tubo número uno, 1 ml de reactivo de Fehling **A** y 1 ml de reactivo de Fehling **B**, agitar vigorosamente el contenido del tubo y calentar a baño María de agua hirviendo durante 15 minutos, hacer observaciones.
- e) Agregar a los tubos número dos y tres, 0.1 ml de lugol, mezclar y hacer observaciones.

Experimento 2. Determinación cualitativa de la glucosa.

- a) Marcar dos tubos con los números 4 y 5 respectivamente.
- b) Agregar 5 ml de solución de almidón a cada tubo.
- c) Añadir al tubo número cuatro, 1 ml de saliva y agitar.
- d) Incubar el tubo número cuatro durante 15 minutos a baño maría a 37°C.
- d) Agregar a cada tubo 2 ml de reactivo de glucosa oxidasa, agitar e incubar a 37°C durante 10 minutos, hacer observaciones.

Experimento 3. Efecto del pH en la actividad de la amilasa salival.

- a) Marcar dos tubos con los números 6 y 7 respectivamente.
- b) Agregar a cada tubo 5 ml de solución de almidón.
- c) Añadir al tubo número seis, 3 ml de solución reguladora de pH = 4 y al tubo número siete, 3 ml de solución reguladora de pH = 7, mezclar.

- d) Añadir 1 ml de saliva filtrada a cada tubo, mezclar el contenido de los tubos e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- e) Añadir a cada tubo 0.1 ml de lugol, mezclar y hacer observaciones.

CUESTIONARIO:

1. ¿En qué parte del tubo digestivo ocurre la mayor absorción de los monosacáridos?
2. ¿Cuál es el mecanismo de absorción intestinal de la glucosa?
3. ¿Qué enzima hidroliza las uniones α -1,4, tanto del almidón como del glucógeno?
4. ¿Qué es un azúcar reductor y qué reacción de la práctica lo pone de manifiesto?
5. ¿Cuáles son los azúcares reductores que se identifican en la práctica?
6. ¿Cuál es la enzima que al nivel de duodeno hidroliza el enlace α -1,6 del almidón?
7. ¿Qué compuestos se identifican con el lugol?

PRÁCTICA 3**IDENTIFICACIÓN DEL GLUCÓGENO**

Objetivo. Mediante reacciones específicas para carbohidratos, el alumno identificará la presencia del glucógeno en un tejido animal.

INTRODUCCION

El glucógeno, reserva de glucosa en los animales, se almacena principalmente en hígado y músculo. Aproximadamente 1 o 2% del peso húmedo del músculo en reposo de un adulto bien alimentado nos daría unos 400g de glucógeno; en cambio en el hígado entre el 6 y 8% de su peso húmedo, unos 100g corresponden a este polisacárido.

La misión del glucógeno es la de proveer la fuente para que la célula muscular sintetice el ATP necesario para la contracción muscular y en el hígado el glucógeno degradado sirve para mantener los niveles normales de glucosa en la sangre, en cambio la síntesis de glucógeno tiene lugar durante la fase posprandial de absorción, cuando la concentración de glucosa en la vena porta es superior a 150 mg/100ml.

Las moléculas de glucógeno se encuentran almacenadas en gránulos citoplasmáticos, acompañadas de las enzimas necesarias para su síntesis y para su degradación. Es decir si la célula o el organismo requieren un aporte energético de emergencia como en los casos de estrés o alerta, el glucógeno se degrada para dar glucosa y por degradación de ésta obtener energía.

Gracias a la capacidad de almacenamiento de glucógeno, se reducen al máximo los cambios de presión osmótica que la glucosa libre podría ocasionar tanto en el interior de la célula como en el medio extracelular.

MATERIAL POR EQUIPO

- 2 Tubos de ensaye de 15 X 150 mm.
- 11 Tubos de ensaye de 13 X 100 mm.
- 1 Vidrio de reloj (refrigerado 24 hrs antes).
- 1 Mortero con pistilo (refrigerado 24 hrs antes).
- 1 Pipeta de 1 ml.
- 3 Pipeta de 2 ml.
- 1 Pipeta de 10 ml.
- 2 Probetas de 20 ml.
- 2 Pipetas Pasteur con bulbo.

- 1 Vaso de precipitados de 50 ml.
- 1 Gradilla.
- 2 Trozos de parafilm.

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- Centrifuga clínica para tubos de ensaye de 13 X 100 mm
- 2 Bisturí
- 2 Pinzas de disección
- 1 Charola de disección

REACTIVOS

- Hígados de pollo
- Acido tricloroacético al 10% frío.
- Alcohol al 95% frío.
- Reactivo de Glucosa-oxidasa Spinreact 1001192
- Arena de cuarzo

DESARROLLO:

I. Obtención de glucógeno:

- a) Pesar 20 g de hígado en un vidrio de reloj frío.
- b) Cortar el hígado en trozos pequeños.
- c) Colocar los trozos en un mortero frío con un poco de arena de cuarzo y moler perfectamente, añadir poco a poco, 20 ml de ácido tricloroacético al 10%, mezclar con el pistilo.
- d) Por decantación colocar el contenido del mortero en 4 tubos de 13 X 100 mm y centrifugarlos a 3000 rpm durante 5 min.
- e) Con ayuda de la pipeta Pasteur, recuperar el sobrenadante en una probeta de 10 ml para medir el volumen y traspasarlo a dos tubos de 15 X 150 ml.
- f) Añadir dos volúmenes de alcohol al 95% frío por volumen de sobrenadante a cada tubo.
- g) Tapar cada uno de los tubos con parafilm y agitar los tubos lentamente y de manera constante hasta que el glucógeno flocule.
- h) Pasar el contenido y repartir en 4 tubos de 13 X 100 mm para centrifugar a 3000 rpm durante 5 min.
- i) Con la pipeta Pasteur, desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado de cada tubo en 1.0 ml de agua destilada.
- j) Juntar el contenido de todos los tubos en uno solo.

II. Identificación del glucógeno:

- a) En dos tubos de ensaye de 13 X 100 mm, coloque 2 ml de la suspensión obtenida. Marcar los tubos como A y B.
- b) En otro tubo de ensaye de 13 X 100 mm, coloque 2ml de agua destilada y márkelo como C.
- c) Al tubo A, agregar 2 ml del reactivo de glucosa-oxidasa, incubar a 37°C durante 5 minutos.
- d) A los tubos B y C agregarle 1 ml de lugol a cada uno, agitar y comparar el cambio de coloración.

CUESTIONARIO:

1. Describa la estructura del glucógeno.
2. ¿Dónde y cómo se almacena el glucógeno en nuestro organismo?
3. ¿Qué tipo de carbohidratos identifica el lugol y qué color toma con cada uno?
4. ¿Para qué utilizamos el glucógeno en músculo?
5. ¿Para qué utilizamos el glucógeno en el hígado?

PRACTICA 4**ALIMENTACIÓN Y GLUCOSA SANGUÍNEA**

Objetivo. El alumno identificará los cambios en la concentración de glucosa sanguínea antes y después de ingerir alimentos y bebidas diversos.

INTRODUCCIÓN

Después de un ayuno de 4 horas aproximadamente y en condiciones de reposo la concentración de glucosa en sangre es de 65 a 100 mg por 100 ml. Después de la ingestión de alimentos, sobrevienen alzas hasta de 120 a 140 mg por 100 ml y, unas 2 horas después, regresan a los valores en ayunas. Éste es un ejemplo de ajuste fisiológico constante para conservar la concentración de glucosa en los líquidos sin grandes cambios. De la misma manera, las modificaciones producidas por las emociones violentas, el ejercicio intenso y aún la inanición, son equilibradas para volver a lo normal.

Si la glucosa de la sangre se mantiene dentro de los límites estrechos, es porque la serie de fenómenos que concurren a proporcionar glucosa a la sangre se equilibran con los mecanismos que la sustraen de ella. En ayunas, la única fuente de glucosa sanguínea es el hígado. La velocidad de formación y degradación del glucógeno hepático es uno de los factores más importantes en la regulación de la glicemia. Como la salida de glucosa del hígado depende, en gran parte, de la concentración de glucosa en la sangre, cuando ésta disminuye se activa la glucogenólisis, por el contrario, cuando aumenta, la glucosa ingresa al hígado y al músculo principalmente para almacenarse activándose la glucogénesis. Estas dos vías metabólicas están reguladas por las hormonas glucagón e insulina respectivamente. Es por esto que la insulina tiene gran importancia en la participación de la regulación de glucosa sanguínea y se produce en las células del páncreas en respuesta a la hiperglucemia, la administración de insulina produce hipoglucemia inmediata. La adrenalina y la noradrenalina impiden la liberación de la insulina. Por otro lado, el glucagón en acción contraria a la de la insulina es también secretado por el páncreas y llega al hígado para que éste libere glucosa cuando la glucemia disminuye.

Otras hormonas influyen en la hiperglucemia como la hormona del crecimiento que inhibe la utilización de la glucosa y favorece la de ácidos grasos, los glucocorticoides que aumentan la gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de compuestos que no son carbohidratos), la adrenalina secretada cuando hay estímulos estresantes causa glucogenólisis, así como las hormonas tiroideas.

Estudios realizados en varios países desarrollados demuestran que casi un 15% de la población presenta defectos en la tolerancia a la glucosa y, de ellos, más de una tercera parte desarrollan diabetes mellitus no dependiente de insulina, asociada a diversas complicaciones patológicas que hacen aumentar las cifras de morbilidad y de mortalidad.

La glucemia o concentración de glucosa en sangre, depende de numerosos factores metabólicos y hormonales, pero también, de modo importante, de la naturaleza y composición de los alimentos que ingerimos.

Para cuantificar esta última influencia se ha desarrollado el denominado índice glucémico de los alimentos, que permite clasificar a los mismos de acuerdo a cómo afectan a nuestra glucemia. Un adecuado uso del índice glucémico puede ayudar en el control de la glucemia no solo en pacientes con Diabetes mellitus, sino en todas las personas que presentan desajustes en su tolerancia a la glucosa.

MATERIAL POR EQUIPO

1 Glucómetro
Tiras reactivas según la marca del glucómetro
Lancetas
Torundas de algodón en alcohol

ALIMENTOS

1 Taza de arroz cocido
2 Vasos de leche
1 Plato de sandía
2 Manzanas
2 Plátanos
1 Plato de zanahorias cocidas
1 Tableta de chocolate marca "Abuelita"
2 Bolillos
1 Taza de té con 2 cucharadas de azúcar
1 Taza de té con 2 cucharadas de miel de abeja

DESARROLLO:

- a) El docente indicará a los alumnos el alimento que van a ingerir (será el mismo para cada uno de los integrantes del equipo). **Los alumnos deberán tener un ayuno de cuando menos 4 horas.**
- b) Con ayuda del profesor, cada alumno determinará la concentración de su glucosa sanguínea en ayunas (figura 1) al inicio de la práctica; este dato será

el punto de comparación contra las otras valoraciones que se efectuarán a la media hora y una hora después de haber ingerido alimento.

- c) **¿Cómo se mide la glucosa en la sangre?** Con previo aseo con una torunda con alcohol, debe pincharse el dedo de la mano con una aguja especial llamada lanceta, para extraer una gota de sangre. Si usa la yema del dedo, introduzca la aguja en la zona de la yema del dedo más próxima a la uña para evitar dolores en la parte del dedo que usa con más frecuencia.
- d) **¿Cómo realizar el control con un medidor de la glucosa?** Los medidores de la glucosa en la sangre (o glucómetros) son pequeños aparatos computarizados que “leen” la glucosa en la sangre. En todos los medidores, el nivel de glucemia aparece en forma de números en una pantalla (igual que en una calculadora de bolsillo). Consulte con su maestro para que le enseñe a usar el glucómetro correctamente.

Figura 1



Con los datos de cada uno de los integrantes del equipo se calculará el promedio de los valores obtenidos. Con los resultados de todos los equipos llenar la siguiente tabla.

Alimento o bebida	Glucosa (mg/dl)		
	Tiempo		
	Antes de la ingestión	30 min	60 min

Realice una discusión entre sus compañeros con los resultados de los diferentes alimentos probados.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuáles son los valores normales de la glucosa sanguínea?
2. ¿Qué es y cómo se determina el índice glucémico de los alimentos?
3. ¿Qué factores influyen en la prueba realizada?
4. ¿Qué importancia médica tiene el conocer el índice glucémico de los alimentos?
5. Busca cuales son los valores de índice glucémico de los alimentos utilizados en la práctica.

PRACTICA 5

DESHIDROGENASA LÁCTICA

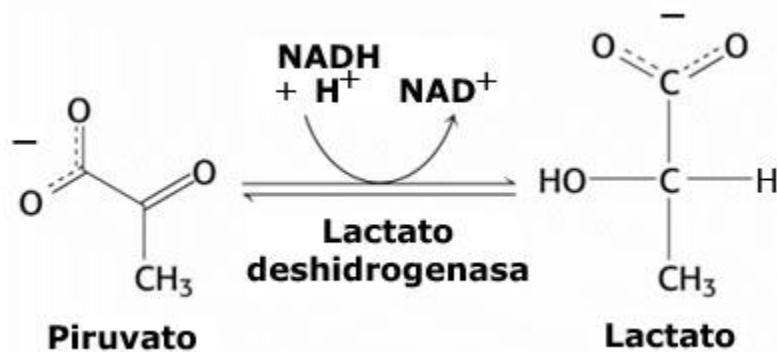
Objetivo. El alumno determinará cualitativamente, mediante la observación de los grados de decoloración, las relaciones existentes entre la actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) y la presencia de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD), en función de los siguientes aspectos:

- Determinar si la actividad de LDH depende de la presencia de NAD.
- Especificar la actividad de indicador redox del azul de metileno

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las manifestaciones metabólicas de un organismo, se relacionan con cambios de energía, la cual se obtiene por la oxidación sistemática de los nutrientes y esto es debido a que en los procesos de oxido-reducción hay transferencias de energía generadas por diferencias en el potencial electroquímico. Un sistema de potencial elevado, oxida al de más bajo potencial con la consiguiente liberación de energía para las necesidades vitales.

Durante periodos de gran actividad física, el músculo esquelético degrada glucógeno para obtener glucosa y a partir de ella producir ATP para la contracción muscular. El catabolismo rápido de la glucosa, bajo estas circunstancias, excede la capacidad de las mitocondrias de reoxidar el NADH resultante, por lo que, a partir del piruvato y en condiciones anaeróbicas, genera lactato como producto final. Esta reacción es catalizada por la deshidrogenasa láctica de músculo, que sólo es activa en estado de anaerobiosis y requiere NAD como intermediario para completar su actividad.



El lactato se envía por medio de la sangre al hígado, donde la deshidrogenasa láctica hepática lo convierte en piruvato, el cual sirve como sustrato para

gluconeogénesis. La glucosa obtenida de esta forma regresa al torrente sanguíneo y llega al musculo, para que este obtenga más ATP para sostener la contracción.

Con este experimento se pretende demostrar que la LDH es una enzima que funciona normalmente, basándose en la concentración de NAD y anaerobiosis promoviendo la reducción del piruvato en presencia de NADH + H⁺; entonces, aumentando la concentración de NAD⁺ podemos revertir la reacción para oxidar al lactato y generar NADH + H⁺.

MATERIAL POR EQUIPO

- 4 Tubos de ensayo de 16 x 150 mm.
- 6 Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.
- 2 Embudos.
- 2 Vasos de precipitado de 100 ml.
- 1 Pipeta de 10 ml
- 5 Pipetas de 5.0 ml
- 3 Pipetas de 2.0 ml.
- 1 Pipeta de 1.0 ml
- 1 Probeta de 50 ml.
- 1 Probeta de 25 ml.
- 1 Matraz Erlenmeyer de 125 ml
- 2 Pipetas Pasteur con bulbo
- 1 Mortero con pistilo. (Guardar en refrigerador desde un día antes).
- 2 Gasas de 20 X 20 cm.
- 1 vidrio de reloj

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Bisturí
- 2 Pinzas de disección
- 1 Charola de disección
- 1 Baño María ajustado a 37°C
- Centrífugas clínica para tubos de 13 X 100 mm
- 1 Parrilla de gas con rejillas de asbesto.

REACTIVOS

- 3 Piernas de pollo (fresco) para todo el grupo
- Arena de cuarzo
- NaCl al 0.9% (refrigerado 24 hrs antes)
- KCN al 0.5%
- Lactado de sodio al 1%
- Azul de metileno 0.002M
- Agua destilada
- Aceite mineral

DESARROLLO:

Efecto de la Nicotinamida Adenin Dinucleótido (NAD) en la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH).

1. Obtención de la enzima LDH.

- a) Con ayuda de un bisturí limpiar de grasa la pierna de pollo, y cortar de 2 a 3 gramos de músculo.
- b) Colocar el tejido en un mortero frío, añadir un poco de arena de cuarzo y triturar perfectamente.
- c) Añadir 10 ml de NaCl al 0.9% por gramo de tejido y dejar reposar la mezcla en el mortero por 15 minutos en el refrigerador.
- d) Filtrar el contenido del mortero en un embudo con la gasa sobre un vaso de precipitados de 100 ml.
- e) Vaciar la solución obtenida en 2 tubos de 13 X 100 mm.
- f) Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos y con ayuda de una pipeta Pasteur recuperar el sobrenadante en un tubo de 13 X 100 mm etiquetándolo como LDH.
- g) Lavar el mortero y dejar escurrir.

2. Obtención de la coenzima NAD.

- a) Obtener otros 3 g de tejido muscular de la pierna.
- b) Cortar el músculo en fragmentos más pequeños y ponerlo con 8 ml de agua destilada por gramo, en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Calentar a ebullición por 5 minutos.
- c) Pasar la preparación a un mortero con un poco de arena de cuarzo y triturar perfectamente.
- d) Filtrar el contenido del matraz en un embudo con la gasa sobre un vaso de precipitado de 100 ml.
- e) Vaciar la solución obtenida en 2 tubos de 13 X 100 mm.
- f) Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos y con ayuda de una pipeta Pasteur recuperar el sobrenadante en un tubo de 13 X 100 mm y etiquetarlo como NAD.

3. Detección de la actividad enzimática de LDH.

- a) Preparar una serie de cuatro tubos de ensaye de 16 X 150 mm como se indica a continuación, agitando después de agregar cada reactivo:

	Tubo			
	1	2	3	4
KCN al 0.5% (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
Lactato de sodio al 1% (ml)	1.0	1.0	-	1.0
Azul de metileno 0.002 M (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3
Agua destilada (ml)	1.0	-	1.0	1.0
Coenzima (NAD) (ml)	-	1.0	1.0	1.0
Enzima (LDH) (ml)	1.0	1.0	1.0	-

- b) Mezclar bien el contenido de cada tubo y agregar 1 ml de aceite mineral (**no agitar**).
- c) Incubar en baño maría a 37°C todos los tubos.
- d) Observar sin mover los tubos, los cambios de color ocurridos cada 5 minutos durante 20 minutos.

PRECAUCIÓN:

LA SOLUCIÓN DE CIANURO ES UN VENENO MUY ACTIVO, SU INGESTIÓN PUEDE CAUSAR LA MUERTE, SEGUIR LAS INSTRUCCIONES DEL DOCENTE.

CUESTIONARIO:

1. Explique cómo funciona el Ciclo de Cori.
2. ¿De dónde obtiene energía el hígado para la síntesis de glucosa a partir del lactato?
3. Explique el fundamento químico de la reacción entre el azul de metileno y el NAD.
4. En que otra parte del organismo, a parte del musculo, se realiza la conversión de piruvato en lactato y cuál es el fin metabólico de la reacción en este tejido.

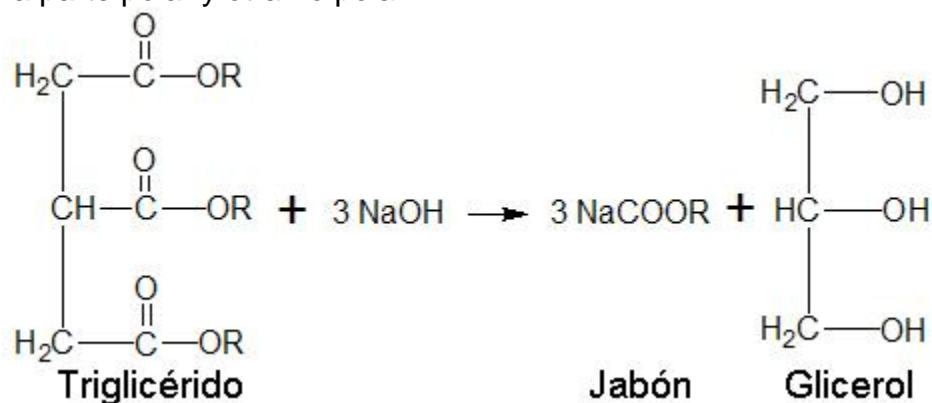
PRÁCTICA 6

HIDRÓLISIS ALCALINA DE LOS LÍPIDOS

Objetivo. El alumno comprenderá que es la saponificación de un aceite vegetal y demostrará la acción detergente de los jabones.

INTRODUCCIÓN

La **saponificación** es una reacción de hidrólisis química entre un éster de ácido graso (o un lípido saponificable, portador de residuos de ácidos grasos) y una base fuerte, en la que se obtiene como principal producto la sal de dicho ácido y glicerina. Estos compuestos tienen la particularidad de ser anfipáticos, es decir tienen una parte polar y otra no polar.



La función fisicoquímica de un jabón es disminuir la tensión superficial del agua, incrementando su poder de penetración por su propiedad de emulsificar los aceites y las grasas, forman micelas que se dispersan en el agua de lavado, permitiendo solubilizar en agua un gran número de sustancias normalmente insolubles en este medio.

MATERIAL POR EQUIPO

- 1 Vaso de precipitados de 100 ml.
- 1 Vaso de precipitados de 250 ml.
- 1 Cristalizador chico.
- 1 Anillo.
- 1 Rejilla de asbesto.
- 1 Mechero Bunsen.
- 1 Soporte Universal.
- 1 Agitador de vidrio.

- 1 Probeta de 50 ml.
- 2 Probetas de 20 ml.
- 2 Tubos de ensaye de 16 x 150 mm.
- 1 Embudo de 75 mm de diámetro.
- 1 Gasa de 15 X 15 cm.
- 1 Gradilla.
- 1 Pinza de crisol.

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Balanzas granatarias.

REACTIVOS

- Solución de Hidróxido de Sodio al 30 %.
- Solución saturada de Cloruro de Sodio.
- Alcohol etílico.
- Hielo en cubos.
- Aceite de coco.

DESARROLLO:

- a) Pesar 15 g de aceite de coco en un vaso de 250 ml.
- b) Añadir al cristalizador agua de la llave, hasta un poco menos de la mitad de su capacidad.
- c) Introducir el vaso de 250 ml en el cristalizador y calentar durante 15 min, agitar constantemente con el agitador de vidrio. Detener el vaso durante el procedimiento con la ayuda de unas pinzas de crisol.
- d) En un vaso de 100 ml, mezclar 20 ml de hidróxido de Sodio al 30%, con 20 ml de Alcohol Etílico.
- e) Agregar lentamente la mezcla anterior al vaso de 250 ml que contiene el aceite sin sacarlo del baño maría, agitar y volver a calentar la mezcla resultante durante 15 minutos más.
- f) Agregar a la mezcla contenida en el vaso de 250 ml, 30 ml de solución saturada de cloruro de sodio y seguir agitando y calentando durante 5 min más.
- g) Suspender el calentamiento y sacar el vaso del baño María, añadir al contenido del vaso dos o tres cubos de hielo y mezclar suavemente con el agitador.
- h) Decantar lo anterior sobre una gasa colocada en la boca del embudo, recibir el filtrado en la probeta y tirarlo posteriormente.
- i) Sobre la gasa quedará el jabón.
- j) Añadir agua de la llave a un tubo hasta la mitad, tomar una **pequeña porción** del jabón obtenido y añadirla al tubo y agitarlo vigorosamente, observar si se forma o no espuma, lo que demostrará la presencia del jabón.
- k) En otro tubo agregar agua hasta la mitad de su capacidad y 1 ml de aceite de coco, agitar y hacer observaciones.

I) Al tubo anterior añadirle un poco del jabón obtenido, agitar y observar nuevamente.

CUESTIONARIO:

1. ¿Qué es un jabón?
2. ¿Cuál es la función de los jabones?
3. ¿Cuáles son los jabones naturales de nuestro organismo y en qué procesos intervienen?
4. ¿Qué es emulsificar?
5. ¿Qué diferencia hay entre la saponificación y la hidrólisis enzimática de un triacilglicerol?

PRÁCTICA 7

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS LÍPIDOS

Objetivo. El alumno analizará el papel de la enzima lipasa pancreática así como de las sales biliares, durante la digestión de los lípidos.

INTRODUCCIÓN

La función del estómago en la digestión de lípidos es batir y mezclar los lípidos de la dieta. Una de las contribuciones más importantes del estómago en la digestión y absorción total de lípidos es la lentitud del vaciamiento del quimo hacia el intestino delgado, que confiere el tiempo adecuado para que las enzimas pancreáticas digieran lípidos y se absorban los productos digeridos.

Casi toda la digestión de lípidos tiene lugar en el intestino delgado, donde las condiciones son más favorables respecto del estómago. Los ácidos biliares son secretados en la luz del intestino delgado. Dichos ácidos biliares, junto con lisolecitina rodean y emulsifican los lípidos de la dieta. La emulsificación crea pequeñas gotas de lípidos dispersas en la solución acuosa de la luz intestinal. Las gotas de lípidos están cubiertas por cargas negativas de los ácidos biliares que impiden su agregación: las gotas se repelen entre sí y permanecen diseminadas. El propósito de la emulsificación es suministrar una gran área de superficie para la acción de enzimas pancreáticas. Las enzimas pancreáticas (lipasa pancreática, hidrolasa éster de colesterol y fosfolipasa A) y una proteína especial (colipasa) se liberan en el intestino delgado para efectuar el trabajo digestivo.

Los productos finales de la digestión de lípidos son monoacilglicéridos, ácidos grasos, colesterol y lisolecitina. Cada producto final es hidrófobo. Los productos hidrófobos de la digestión deben solubilizarse en micelas y transportarse a la membrana apical de las células intestinales para su absorción. Las micelas se difunden hacia la membrana apical (borde en cepillo) de las células epiteliales intestinales. En la membrana apical los lípidos se liberan de la micela y se difunden siguiendo sus gradientes de concentración hacia el interior de la célula.

MATERIAL POR EQUIPO

- 2 Tubos de 22 X 175 mm.
- 2 Vasos de precipitados de 50 ml
- 1 Agitador de vidrio.
- 5 Pipetas de 5 ml.
- 1 Pipeta de 10 ml.

- 1 Gradilla.
- 1 Probeta de 10 ml.
- 1 Bureta de 25 ml.
- 1 Soporte universal.
- 1 Pinza para bureta.
- 2 Matraces Erlenmeyer de 125 ml.

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Agitadores magnéticos de tubos (Vortex).
- 1 Baño maría a 37°C.
- 1 Estufa bacteriológica a 37 °C.
- 1 Parrilla de gas.
- Rejillas de asbesto.
- Guantes de asbesto.
- Pinzas para crisol.

REACTIVOS

- Crema de vaca.
- Manteca de cerdo derretida.
- Tira reactiva para medir pH marca Merck.
- Rojo de fenol en polvo.
- Solución de bicarbonato de sodio al 5%.
- Solución de pancreatina al 10% (fresca).
- Solución de pancreatina al 10% (hervida).
- Solución de taurocolato de sodio al 5%.
- Solución de hidróxido de sodio al 0.1 N.
- Fenolftaleína al 1%.

DESARROLLO:

Experimento 1. ACCIÓN DE LA LIPASA SOBRE GRASA EMULSIFICADA

- a) En un vaso de precipitados de 50 ml poner aproximadamente 20 ml de crema de vaca y medir el pH con tira reactiva.
- b) Añadir una pizca de rojo de fenol en polvo (ver el vire del indicador, según la tabla 1) y mezclar perfectamente con el agitador de vidrio.
- c) Ajustar el pH de la mezcla anterior a 8, con la solución de bicarbonato de sodio al 5% (se requieren aproximadamente 5 ml).
- d) Repartir la mezcla de la crema en dos tubos de ensaye de 22 X 175 mm marcados con las letras **A** y **B** respectivamente.
- e) Agregar al tubo "**A**" 3 ml de solución de pancreatina al 10% fresca y, al tubo "**B**" 3ml de solución de pancreatina al 10% hervida, mezclar con el agitador magnético (vortex) cada uno de los tubos.

- f) Incubar los tubos en baño maría a 37 °C durante 30 min, (agitar los tubos cada 10 min).
- g) Sacar los tubos del baño maría y observar la coloración.
- h) Interpretar los resultados.

Tabla 1

Indicador	Color según el pH:	
	Ácido	Base
Rojo de fenol	Amarillo	Rojo

Experimento 2. EFECTO DE LA BILIS COMO AGENTE EMULSIFICANTE

- a) En 2 matraces Erlenmeyer de 125 ml preparar las siguientes mezclas:

Nota. MEDIR LA MANTECA EMPLEANDO LA PROBETA DE 10 ML.

Matraz	Manteca de cerdo (ml)	Agua (ml)	Pancreatina fresca al 10% (ml)	Taurocolato de sodio al 5% (ml)
1	10	5	10	—
2	10	—	10	5

- b) Agitar los matraces e incubarlos en la estufa bacteriológica a 37 °C durante 30 minutos.
- c) Sacar los matraces de la estufa, hervirlos durante unos segundos y enfriarlos al chorro de agua.
- d) Agregar a cada matraz 2 gotas de fenolftaleína y mezclar.
- e) Titular cada matraz con solución de hidróxido de sodio al 0.1 N (tener cuidado con el vire del indicador).
- f) Interpretar el gasto de hidróxido de sodio utilizado en cada matraz.

CUESTIONARIO:

1. ¿En qué parte del tubo digestivo se inicia la digestión de los lípidos?
2. ¿Cuál es el papel de las sales biliares durante la digestión?
3. ¿Qué son los quilomicrones?
4. ¿Cuántos tipos de lipoproteínas existen en la sangre?
5. ¿Cuál es la función de la lipasa lipoproteica?
6. ¿Qué enzimas participan en la digestión de los lípidos?
7. ¿Cuál es la función de la pancreatina en la práctica?

PRÁCTICA 8**TRIGLICÉRIDOS**

Objetivo. El alumno conocerá uno de los métodos para la determinación de triglicéridos en suero e interpretará el resultado obtenido en base al metabolismo de los lípidos.

INTRODUCCIÓN

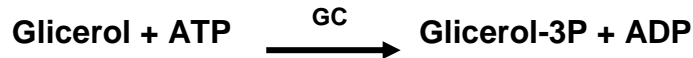
Aproximadamente el 90% de los lípidos de la dieta son triacilglicéridos. La mayoría de ellos contienen ácidos grasos de cadena larga, saturados o insaturados. Los triglicéridos son emulsificados por las sales biliares en el intestino, y posteriormente hidrolizados por la lipasa pancreática en ácidos grasos y monoacilglicerol, para de esta forma ser absorbidos por las células de la mucosa intestinal, en donde son reformados en triglicéridos. Entonces, estos triglicéridos se incorporan en los quilomicrones, y de esta forma son transportados a la mayoría de los tejidos, donde se utilizan como energía o se almacenan en el tejido adiposo.

Las dietas ricas en grasas, y las compuestas fundamentalmente de ácidos grasos saturados, conllevan a un aumento de la concentración plasmática de triacilglicéridos y de colesterol. Por el contrario, el consumo de ácidos grasos insaturados tiende a bajar la colesterolemia.

Es conocida la correlación existente entre altos niveles de triacilglicéridos y colesterol en sangre y el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades coronarias. La trascendencia de dicha relación ha hecho prudente la recomendación de que se reduzca la ingesta de grasas al 30 – 35% de los requerimientos energéticos totales y que se reemplacen en cierto grado los ácidos grasos saturados por los insaturados.

El aumento de triglicéridos en el suero (hipertrigliceridemia) puede ser de origen primario o secundario. La hipertrigliceridemia primaria se presenta en las hiperlipidemias familiares tipo **I**, **II**, **III**, **IV** y **V**. La secundaria, principalmente en obesidad, diabetes, síndrome nefrótico, alcoholismo y, pancreatitis aguda y crónica. Existen, algunas otras enfermedades en las que se elevan los triglicéridos, incluso, se considera que el estrés emocional puede aumentarlos. La determinación de los triglicéridos resulta de sumo interés para identificar problemas en el metabolismo de los lípidos.

Fundamento: Los triglicéridos se determinan en el suero después de ser hidrolizados enzimáticamente con lipasas. En la reacción se produce H_2O_2 que, en presencia de peroxidasa (POD), reacciona con la 4-aminoantipirina y el 4-clorofenol para formar la quinonimina. La cantidad de esta quinona de color rosa formada es proporcional a la concentración de triglicéridos:



GC = Glicerolcinasa GPO = Glicerol 3-P oxidasa POD = Peroxidasa

Método: Triglicéridos-Test enzimático-colorimétrico (GPO-PAP) Spin react cod. 1001311.

MATERIAL POR EQUIPO

- 3 tubos de 13 X 100 mm
- 1 pipeta de 2 ml
- 1 pipeta de 0.1 ml
- 1 pipeta Pasteur con bulbo
- 1 Vacutainer tapón rojo, con aguja y adaptador para tomar muestra de sangre.
- 1 ligadura
- 1 gradilla

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Tubos de 13 X 100 ml
- 1 Pipeta de 0.1 ml
- 2 Pipetas de 2 ml
- Torundas con alcohol
- Centrífuga
- Baño María a 37°C
- Espectrofotómetro con celdillas.

REACTIVOS

Reactivos para la determinación de triglicéridos, Triglicéridos-test enzimático-colorimétrico (GPO-PAP) Spin react cod. 1001311.

DESARROLLO:

I. Obtención de la muestra problema.

- a) Obtener 3 ml de sangre venosa de alguno de los integrantes del equipo.
- b) Una vez coagulada la sangre. centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 10 minutos.
- c) Separar el suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en otro tubo de 13 X 100 mm.

II. Procedimiento:

- b) Marcar un tubo como problema.
- c) Preparar el tubo como se indica en la tabla:

	Blanco * (ml)	Estándar * (ml)	Problema (ml)
Estándar	-	0.02	-
Suero	-	-	0.02
Reactivo	2.0	2.0	2.0

* Se prepara sólo un blanco y un estándar por grupo.

- d) Mezclar el contenido de cada tubo e incubarlos en el baño María a 37°C, durante 5 minutos.
- e) Medir la absorbancia a 505 nm, frente al blanco de reactivos.
- f) El color es estable durante 30 min.

III. Cálculo de la concentración de triglicéridos.

Con las lecturas obtenidas del problema y el patrón se realizan los siguientes cálculos para conocer la concentración de triglicéridos en la muestra problema.

$$\text{Concentración de triglicéridos} = \frac{\text{Absorbancia problema} \times \text{concentración estandar}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

IV. Valores de referencia:

Sospechosos a partir de: **150 mg/dl (1.7 mmol / l)**
Elevados a partir de: **200 mg/dl (2.26 mmol / l)**

CUESTIONARIO:

1. ¿Desde el punto de vista químico-estructural, cómo están formados los triacilglicéridos?
2. ¿Cuáles son los valores normales de triacilglicéridos en sangre?
3. ¿En qué lugar de la célula se hidrolizan los triacilglicéridos y cuáles son los productos de esta hidrólisis?
4. ¿Cómo circulan en la sangre los triacilglicéridos si son lípidos insolubles en agua?
5. ¿Qué son las dislipidemias?
6. Menciona 3 padecimientos en los cuales se encuentren elevados los niveles de triglicéridos en sangre.
7. Explique qué relación tiene la ingestión de una dieta rica en carbohidratos con una concentración elevada de triglicéridos en sangre.

PRÁCTICA 9**COLESTEROL**

Objetivo. El alumno conocerá un método para determinar el colesterol en muestras de suero problema e interpretará los resultados obtenidos.

INTRODUCCIÓN

El colesterol es el principal esteroide del cuerpo humano. Es un componente estructural de las membranas celulares y de las lipoproteínas plasmáticas y es también el material a partir del cual son sintetizados los ácidos biliares y las hormonas esteroideas.

La dieta promedio (carne y yema de huevo especialmente) contribuye en una mínima proporción (fuente exógena) a la tasa total del colesterol corporal (endógeno más exógeno). En contraste con la síntesis endógena de alrededor de 1 g /día, la dieta corriente produce unos 0.3 g /día.

La síntesis del colesterol ocurre sobre todo al nivel hepático, pero también se realiza en muchos otros tejidos, incluyendo la corteza suprarrenal, intestino, piel, testículos y ovarios.

Su conversión en ácidos biliares y la excreción de esteroides neutros a través de la bilis y heces, constituye la principal vía (90%) de excreción del colesterol. También el colesterol es de gran importancia en la síntesis de las hormonas esteroideas, cuyos productos de degradación que son eliminados en la orina constituyen una vía menor de excreción de colesterol.

La medición de solamente el colesterol total tiene un valor diagnóstico limitado. Sin embargo cuando se mide en conjunto con las diferentes lipoproteínas sobre todo el colesterol LDL y el colesterol HDL ofrece un panorama más amplio sobre la probabilidad de producción de aterosclerosis y por lo tanto de riesgo de enfermedades de las arterias coronarias.

El volumen de colesterol circulante depende de su absorción intestinal, la síntesis endógena, la captación tisular, el estado del metabolismo lipoproteico y la excreción biliar. Los niveles recomendables en sangre de colesterol son menores de 200 mg/dl. El principal trastorno que provoca el colesterol en el organismo cuando se encuentra en exceso lo constituye la producción de depósitos de grasas en arterias vitales, causando aterosclerosis, accidente cerebro vascular y

enfermedad vascular periférica. El colesterol es también un importante constituyente de los cálculos biliares.

Los depósitos de colesterol en las arterias son la principal causa de formación de ateroma (lesión característica de la arteriosclerosis que consiste en el depósito de grasas en la superficie interna de las arterias) y de enfermedades vasculares, entre ellas el infarto al miocardio. Por esto la importancia de determinar en forma precoz los niveles elevados de colesterol en los pacientes.

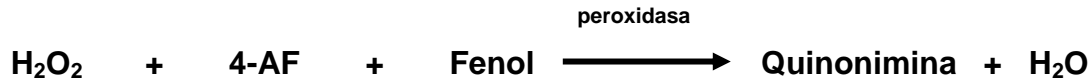
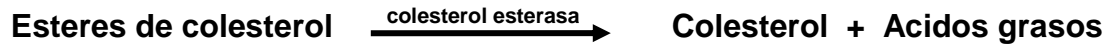
La hipercolesterolemia consiste en la presencia de colesterol en sangre por encima de los niveles considerados normales. Este aumento, que se asocia a problemas coronarios, depende de la dieta, el sexo, el estilo de vida y la síntesis endógena. De esta manera, en la concentración de colesterol en sangre intervienen factores hereditarios y dietéticos, junto a otros relacionados con la actividad física. Existen dos tipos de hipercolesterolemia:

Primaria: derivada de problemas en los sistemas transportadores del colesterol y factores genéticos. En este tipo de hipercolesterolemia se enmarcan las dislipidemias.

Secundaria: el aumento de colesterol se asocia a ciertas enfermedades hepáticas (hepatitis, colostasis y cirrosis), endocrinas (diabetes mellitus, hipotiroidismo y anorexia nerviosa) y renales (síndrome nefrótico o insuficiencia renal crónica). Además, existen algunas sustancias que pueden aumentar los niveles de colesterol LDL (colesterol de baja densidad conocido como 'colesterol malo') favoreciendo el desarrollo de hipercolesterolemia, como los esteroides anabolizantes, los progestágenos, los betabloqueantes y algunas sustancias hipertensivas.

Se encuentran valores disminuidos de colesterol sérico (hipocolesterolemia) en la desnutrición, la insuficiencia hepática, el hipertiroidismo, algunas enfermedades hemáticas, en insuficiencia cortico suprarrenal (enfermedad de Addison) y en el tratamiento con la insulina y ACTH.

Fundamento: La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa forma H_2O_2 y colesterona. El H_2O_2 se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina, en presencia de peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración roja es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.



Método: Colesterol enzimático CHOD-PAP marca Spin-React catálogo 1001091

MATERIAL POR EQUIPO

- 3 tubos de 13 X 100 mm.
- 1 pipetas de 2 ml
- 1 pipetas de 0.1 ml
- 1 pipeta Pasteur con bulbo
- 1 tubo Vacutainer con tapón rojo y una aguja con su adaptador para toma de muestra de sangre.
- 1 ligadura
- 1 gradilla

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Tubos de 13 X 100 ml
- 1 Pipeta de 0.1 ml
- 2 Pipetas de 2 ml
- Torundas con alcohol
- Centrifuga
- Baño maría a 37°C
- Espectrofotómetro con celdillas

REACTIVOS

Reactivos para la determinación de colesterol, Colesterol enzimático (CHOD-PAP), Spin react Cod. 1001091.

DESARROLLO:

I. Obtención de la muestra problema.

- a) Obtener 5 ml de sangre venosa de alguno de los integrantes del equipo.
- b) Dejar la muestra a temperatura ambiente hasta que coagule (aproximadamente 20 minutos).

- c) Una vez coagulada la sangre centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 10 minutos.
 d) Separar el suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en otro tubo de 13 X 100 mm.

II. Procedimiento:

- a) Marcar un tubo como problema.
 b) Preparar el tubo como se indica en la tabla:

	Blanco *	Estándar *	Problema
	(ml)	(ml)	(ml)
Estándar	-	0.02	-
Suero	-	-	0.02
Reactivo	2.0	2.0	2.0

* Se prepara sólo un blanco y un estándar por grupo.

- d) Mezclar el contenido de cada tubo e incubarlos en el baño María a 37°C, durante 5 minutos.
 e) Medir la absorbancia a 505 nm frente al blanco de reactivos.
 f) El color es estable durante 30 min.

III. Cálculo de la concentración del colesterol.

Con las lecturas obtenidas del problema y el patrón se realizan los siguientes cálculos para conocer la concentración del colesterol en la muestra problema.

$$\text{Concentración del colesterol} = \frac{\text{Absorbancia problema} \times \text{Concentración estándar}}{\text{Absorbancia estándar}}$$

IV. Valores de referencia:

150 – 200 mg / dl

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la importancia clínica de la cuantificación del colesterol?
2. ¿Diga que es la aterosclerosis?
3. ¿A qué se llama colesterol bueno?
4. ¿Qué es la hipercolesterolemia familiar?
5. ¿Cómo se regula la síntesis de colesterol en la célula?
6. ¿Cuáles son los valores normales de colesterol, HDL y LDL?

PRÁCTICA 10**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS**

Objetivo. El alumno explicará el papel de la tripsina en la digestión de las proteínas.

INTRODUCCION

Como las proteínas presentan pesos moleculares muy elevados, su digestión incluye una serie de enzimas y cambios de pH que finalmente dan como resultado aminoácidos libres; las enzimas proteolíticas del tubo digestivo se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas, las primeras hidrolizan uniones peptídicas del interior de la cadena polipeptídica y las segundas hidrolizan los enlaces peptídicos de los aminoácidos que se encuentran expuestos en los extremos de la cadena. Dentro de las endopeptidasas se encuentran la pepsina, la tripsina, la quimotripsina y la elastasa (que se sintetizan como zimógenos); dentro de las exopeptidasas hay carboxipeptidasas que actúan en el extremo carboxilo terminal, y aminopeptidasas que actúan en el extremo amino terminal.

La digestión de proteínas comienza en el estómago con la acción de la pepsina. Esta es secretada en las células gástricas al igual que su precursor inactivo: el pepsinógeno. A un pH ácido el pepsinógeno se activa dando origen a la pepsina. Existen tres isoenzimas de la pepsina, cada una de las cuales posee un pH óptimo que varía entre 1 y 3: a un pH mayor de 5 la pepsina se desnaturaliza e inactiva. Por tanto, la pepsina sólo es activa al pH bajo del estómago y su acción termina cuando el quimo entra al duodeno.

La digestión de proteínas continúa en el intestino delgado por acción combinada de las proteasas pancreáticas y del borde en cepillo intestinal. El primer paso es la activación del tripsinógeno hacia su forma activa, tripsina, por la enzima enterocinasa del borde en cepillo. Al principio se produce una pequeña cantidad de tripsina que cataliza la conversión de todos los otros precursores inactivos en sus enzimas activas. Estos pasos crean las enzimas activas para la digestión de las proteínas: tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa. A continuación, estas proteasas pancreáticas hidrolizan las proteínas de la dieta hasta aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos. Sólo son absorbibles aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos.

MATERIAL POR EQUIPO

- 1 Soporte universal.
- 1 Bureta de 25 ml
- 1 Pinza para bureta.
- 1 Vaso de precipitados de 100 ml
- 1 Probeta de 100 ml
- 4 Pipetas de 10 ml
- 5 Matraces Erlenmeyer de 250 ml

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 1 Estufa bacteriológica a 37°C.
- 1 Parrilla de gas

REACTIVOS

- Solución de hidróxido de sodio al 0.01 N.
- Fenolftaleína al 1%.
- Solución de grenetina al 5% (disuelta a baño María).
- Solución de pancreatina al 10%

DESARROLLO:

- a) Agregar a un matraz de 250 ml, 75 ml de solución de grenetina al 5% y 15 ml de pancreatina al 10%, agitar.
- b) Tomar inmediatamente 20 ml de la mezcla anterior y hervir, tómesese este momento como tiempo cero de la reacción.
- c) El resto de la mezcla se incubaba a 37°C, se tomarán muestras de 20 ml cada 15 minutos, las cuales se recibirán cada una en un matraz y se hervirán inmediatamente.
- d) Cuando las muestras estén frías, se les adiciona 4 gotas de fenolftaleína, mezclar.
- e) Titular cada uno de los matraces con solución de hidróxido de sodio al 0.01 N.
- f) Interpretar el gasto de hidróxido de sodio empleado en cada uno de los matraces.

CUESTIONARIO:

1. ¿En qué parte del tubo digestivo se inicia la digestión de las proteínas?
2. ¿Qué es la grenetina y diga si tiene valor biológico?
3. ¿Qué es un zimógeno y como se activa?
4. ¿Cuál es el órgano que regula la concentración de aminoácidos en la sangre?
5. ¿Cuáles son las endopeptidasas más importantes para el cuerpo humano?
6. ¿De qué manera se convierte el pepsinógeno en pepsina?
7. ¿Cuáles son los zimógenos que se secretan en el intestino y como se activan?
8. ¿Cómo se absorben los aminoácidos en el intestino?

PRÁCTICA 11**UREA**

Objetivo. El alumno conocerá como cuantificar a la urea sérica en muestras problemas, mediante un método colorimétrico.

INTRODUCCION

La urea, el principal producto final del metabolismo de las proteínas en el hombre, se deriva fundamentalmente a partir de los grupos amino de los aminoácidos. Una persona de 70 kg tiene un total de 7 g de urea en su organismo. La cantidad de urea eliminada cada 24 horas es muy variable y depende de la masa corporal, la dieta, el anabolismo o el catabolismo proteínico, etc. Una persona con dieta baja en proteínas, elimina 5 g de urea en 24 horas; una dieta rica en proteínas puede elevar esta cifra hasta 60 g en 24 horas.

El hígado es el órgano donde se realiza la síntesis de urea. Tras haberse formado la urea en el hígado, pasa a la sangre y es excretada en la orina. La urea es el principal soluto excretado en la orina, por lo que los riñones juegan un papel muy importante en la regulación sistémica de sus niveles, en los que también influye la dieta y el metabolismo de proteínas.

La elevación de la concentración de urea en sangre se conoce como hiperuremia y se puede deber a:

1. Exceso de síntesis de urea por aumento del catabolismo proteínico, con diuresis normal; hace que se eleve la cantidad de urea eliminada en 24 horas, en tanto que la concentración sanguínea no sufre incremento.
2. Falta de eliminación que cause retención en sangre de otros productos nitrogenados como creatinina, ácido úrico, etc.

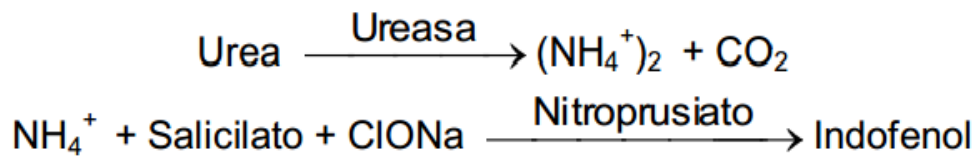
La determinación de la urea sanguínea, es el análisis que más frecuentemente se usa para evaluar la función renal. Los valores de urea en sangre pueden aumentar por factores extra renales o renales. Dentro de los primeros los más frecuentes son: deshidratación, choque, anuria de origen nervioso, insuficiencia circulatoria, bloqueo mecánico de vías urinarias, secuela de procesos infecciosos, etc.

Los problemas renales más importantes que elevan la urea en sangre son: nefritis o nefrosis en todos sus estadios, traumatismo renal, bloqueo renal medicamentoso o postransfucional, problemas vasculares, etc.

La disminución de los niveles de urea en sangre se debe generalmente a sobrehidratación o a ingestión de dietas bajas en proteínas aunque debe considerarse siempre la posibilidad de síntesis disminuida debido a daño agudo y extenso del hígado.

Fundamento:

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco (NH_4^+) y anhídrido carbónico (CO_2). Los iones amonio reaccionan con salicilato e hipoclorito (ClO^-), en presencia del catalizador nitroprusiato, para formar un indofenol verde:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada.

MATERIAL POR EQUIPO

- 3 Tubos de 13 X 100 mm.
- 1 Pipetas de 0.1 ml
- 2 Pipetas de 2.0 ml
- 1 Pipeta Pasteur con bulbo.
- 1 Tubo de Vacutainer con tapón rojo y aguja con adaptador
- 1 Ligadura.
- 1 Gradilla.

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

- 2 Tubos de 13 X 100 ml
- 1 Pipeta de 0.1 ml
- 2 Pipetas de 2 ml
- Torundas con alcohol.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro con celdillas.
- Baño maría a 37°C .

REACTIVOS

Reactivos para la determinación de urea marca Spinreact, con número de catálogo 1001329.

DESARROLLO:

I. Obtención de la muestra problema.

- Obtener 3 ml de sangre venosa de alguno de los integrantes del equipo.
- Dejar la muestra a temperatura ambiente hasta que coagule (aproximadamente 20 minutos).
- Una vez coagulada la sangre centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Separar el suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en un tubo de 13 X 100 mm.

II. Determinación de urea.

- Marcar un tubo como problema.
- Preparar el tubo como se indica en la tabla:

	Blanco	Problema	Patrón
Reactivo 1	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Patrón	—	—	0.05 ml
Suero problema	—	0.05 ml	—

* Se prepara sólo un blanco y un estándar por grupo.

- Mezclar y añadir a cada uno de los tubos 2 ml del reactivo 2.
- Mezclar e incubar 15 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia a 510 nm contra blanco de reactivos.

III. Cálculo de la concentración de urea.

Con las lecturas obtenidas del problema y el patrón, se realizan los siguientes cálculos para conocer la concentración de la urea en la muestra problema.

$$\text{Concentración de urea} = \frac{\text{Absorbancia del problema} \times \text{Concentración del patrón}}{\text{Absorbancia del patrón}}$$

IV. Valores de referencia:

Suero: **20 - 50** mg de urea/100 ml

CUESTIONARIO:

1. ¿En qué parte de la célula se realiza el ciclo de la urea?
2. ¿Cuál es el fin metabólico de la producción de urea?
3. ¿A qué se pueden deber los aumentos en la concentración de urea en suero?
4. ¿A qué se puede deber la disminución de los niveles normales de urea?
5. ¿Para evaluar la función de cuál órgano se utiliza la determinación de urea?
6. ¿Qué es el balance nitrogenado?
7. ¿Qué es el recambio proteico?

PRÁCTICA 12**ÁCIDO ÚRICO**

Objetivo. El alumno conocerá como cuantificar el ácido úrico sérico en muestras problema, y correlacionará el resultado con su posible causa.

INTRODUCCIÓN

En el hombre el producto final del catabolismo de las bases púricas es el ácido úrico. Las bases que originan al ácido úrico son la adenina y la guanina, las cuales forman parte de los ácidos nucleicos. La oxidación de las bases púricas a ácido úrico se produce sobre todo en el hígado.

El ácido úrico es una sustancia blanca, insoluble en alcohol y éter, muy poco soluble en agua. En el suero a pH de 7.4 alrededor del 99% del ácido úrico se encuentra en forma de urato de sodio. Existen dos fuentes de ácido úrico: la endógena, originada por destrucción de tejidos del propio organismo y la exógena, proveniente de la alimentación. La cantidad diaria eliminada oscila entre 600 y 900 mg. La alimentación modifica la excreción y con una dieta rica en nucleoproteínas, la excreción puede llegar hasta 1500 ó 2000 mg diarios. El incremento de su concentración normal en sangre (hiperuricemia) puede deberse al aumento de su formación como consecuencia de la elevación de su síntesis; a un mayor aporte de purinas en la dieta o a la disminución de su excreción a través de la orina.

La cuantificación del ácido úrico sanguíneo se realiza frecuentemente con la finalidad de diagnosticar la enfermedad denominada gota sin embargo, las concentraciones normales pueden elevarse también como resultado de otros padecimientos por ejemplo, aquellos que involucran marcada destrucción celular: leucemia, neumonía, anemia perniciosa, etc., también se eleva en el daño renal severo debido principalmente a la disminución de su excreción. La disminución de su concentración sanguínea normal es de menor valor clínico pudiendo deberse a hemodilución, producción disminuida o a eliminación renal aumentada.

La gota se caracteriza por niveles elevados de ácido úrico en sangre, ataques agudos de artritis, cambios degenerativos y destructivos en las articulaciones y tendencia con los años a la formación de depósitos calcáreos de monourato de sodio en cartílagos y tejidos periarticulares difusos o nodulares, especialmente en dedos y el pabellón auditivo.

Método: Test enzimático-colorimétrico. Uricasa-PAP. Spin react Cod. 1001010.

Fundamento: El ácido úrico se transforma, en presencia de oxígeno y uricasa, en alantoína y agua oxigenada. El peróxido de hidrógeno que se forma reacciona simultáneamente con el ácido 3, 5-dicloro-2-hidroxibenceno sulfónico y 4-aminofenazona formando una quinonimina roja. La absorbancia de la quinonimina es proporcional a la concentración del ácido úrico.



MATERIAL POR EQUIPO

3 tubos de 13 X 100 mm.
1 pipetas de 2 ml
1 pipetas de 0.1 ml
1 pipeta Pasteur con bulbo
1 jeringa de 3ml
1 ligadura
1 gradilla

MATERIAL Y EQUIPO POR GRUPO

2 Tubos de 13 X 100 ml
1 Pipeta de 0.1 ml
2 Pipetas de 2 ml
Torundas con alcohol
1 Centrifuga
1 Baño maría a 37°C
1 Espectrofotómetro con cubetas

REACTIVOS

Reactivos para la determinación de ácido úrico, Test enzimático colorimétrico (Uricasa-PAP). Spin react Cod. 1001010.

DESARROLLO:

I. Obtención de la muestra problema.

- a) Obtener 3 ml de sangre venosa de alguno de los integrantes del equipo.
- b) Dejar la muestra a temperatura ambiente hasta que coagule (aproximadamente 20 minutos).

- c) Una vez coagulada la sangre centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 5 minutos.
 d) Separar el suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en un tubo de 13 X 100 mm.

II. Preparación de los tubos.

- a) Marcar un tubo como problema.
 b) Preparar el tubo como se indica en la tabla:

	Blanco*	Estandar*	Problema
Estándar	—	0.05 ml	—
Muestra	—	—	0.05 ml
Reactivo	2 ml	2 ml	2 ml

* Se prepara sólo un blanco y un estándar por grupo.

- c) Mezclar e incubar 5 min a 37°C en baño maría.
 d) Leer la absorbancia a 505 nm contra blanco de reactivos.

III. Cálculo de la concentración de ácido úrico.

Con las lecturas obtenidas del problema y el patrón, se realizan los siguientes cálculos para conocer la concentración del **ácido úrico** en la muestra problema.

$$\text{Concentración de ácido úrico} = \frac{\text{Abs. del problema} \times \text{Concentración estándar}}{\text{Abs. del estándar}}$$

IV. Valores de referencia:

Mujeres: **2.5 a 6.0** mg/dl
 Hombres: **3.4 a 7.0** mg/dl

CUESTIONARIO:

1. ¿Del catabolismo de qué moléculas se obtiene el ácido úrico?
2. ¿Cuáles son las enzimas deficientes en el padecimiento llamado gota?
3. ¿En qué enfermedades a parte de la gota se elevan los niveles sanguíneos de ácido úrico?
4. ¿A que se les llama tofos o piedras de yeso?
5. ¿Por qué es causado el Síndrome de Lesch-Nyhan y cuáles son los síntomas?

BIBLIOGRAFÍA

- Devlin T.M. Bioquímica, Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas. 4ª. Ed. Barcelona, Editorial Reverté, 2004.
- Flores A. L. J., Sánchez E. S. y Uribe L. S. Bioquímica, manual de prácticas. Editorial McGraw-Hill, 2005.
- Ganong. *Fisiología Médica*. 23ª Edición. Edit. McGraw-Hill Lange. 2010.
- Hicks J.J., Bioquímica. 2ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. 2007.
- Lehninger L.A., Principios de Bioquímica, 5ª Edición. Ediciones Omega. 2007.
- McKee Trudy. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 5ª Edición. Editorial McGraw-Hill Education. 2013.
- Mathews Christopher. Bioquímica. 4ª Edición. Editorial Pearson. 2013.
- Montgomery R Bioquímica, Casos y Texto. 6ª. Edición. Editorial Harcourt-Brace. 1999.
- Murray, R. K. y Col.: Harper Bioquímica ilustrada. 29ª Edición. Editorial McGraw-Hill Lange. 2013.
- Pacheco L.D., Bioquímica Médica. Editorial Limusa.2013.
- Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W.: Fundamentos de Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2006.

ANEXO 1

RELACIÓN DE REACTIVOS

REACTIVO	MARCA	No. CATÁLOGO
Aceite de coco puro. Frasco de 1 L	Farmacia París	
Aceite mineral USP. Frasco de 500 ml	J. T. Baker	PI270501
Ácido tricloroacético al 10%. Frasco de 1 L	Hycel	HY31021001000
Almidón (starch soluble). Frasco de 500 g	Hycel	HY5600500
Arena de cuarzo (arena de sílice) 3 Kg		
Azul de metileno cloruro indicador. Frasco de 25 g	Hycel	HY103300025
Bicarbonato de sodio polvo. Frasco de 500 g	J.T. Baker	PI350601
Buffer de referencia pH de 4.0. Frasco de 1 L	Hycel	HY22061000
Buffer de referencia pH de 7.0. Frasco de 1 L	Hycel	HY2123101000
Cianuro de potasio 98%. Frasco de 25 g	Sigma-Aldrich	SA6017825
Cloruro de sodio granular. Frasco con 2.5 Kg	J. T. Baker	PIM754406
Equipo para determinación de ácido úrico enzimático colorimétrico. Caja de 10 x 20 ml	Spin-React	1001010
Equipo para determinación de colesterol CHOD-PAP. Enzimático colorimétrico. Caja de 10 x 20 ml	Spin-React	1001091
Equipo para determinación de Triglicéridos GPO-PAP. Enzimático-colorimétrico. Caja de 10 x 20 ml.	Spin-React	1001311
Equipo para determinación de Urea B colorimétrico. Caja 2 x 50 ml	Spin-React	1001329
Etanol (alcohol etílico) absoluto PA ACS ISO. Frasco de 2.5 L	Merck	MM1009832500
Fenolftaleína al 1%. Frasco de 500 ml	Hycel	HY117000500
Grenetina en polvo (grado farmacéutico)	Hycel	136
Hidróxido de potasio A.C.S. Frasco de 500 g	Fermont	36842
Hidróxido de sodio en lentejas. Frasco de 1 Kg	Merck	MM 1064621000
Lactato de sodio 60%. Frasco con 500 ml	Sigma-Aldrich	SAL4263500
Manteca de cerdo		
Pancreatina en polvo. Frasco de 1 Kg	Merck	MM 1072131000
Papel indicador de pH de 0-14 cj/100	Merck	MM 1095350001
Reactivo para determinación de glucosa. Caja de 2 x 50 ml (incluye estándar)	Spin-React	41010
Rojo de fenol indicador (en polvo). Frasco de 5 g	Hycel	HY105800005

Sulfato de cúprico anhidro. Frasco de 500g	J. T. Baker	P1185050
Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. Frasco de 500 g	Sigma-Aldrich	SAS6170500
Taurocolato de sodio. Frasco de 100 g	Sigma-Aldrich	SA86340
Yodo Lugol concentrado. Frasco de 500 ml	Hycel	HY268800500

<http://www.reactivosyequipos.com.mx/buscador>

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos se deben preparar con agua destilada a pH de 7.0, si no es posible conseguirla se pueden preparar con agua Bonafont.

Las cantidades de reactivos que se proponen a continuación pueden variar, si aumenta (multiplicar) o si disminuyen (dividir) según lo solicitado; algunos de ellos pueden almacenarse durante un tiempo razonable (3 o 4 meses), a temperatura ambiente o en refrigeración.

- Es muy importante pesar o medir las cantidades de reactivos de manera exacta y siempre disolver en un recipiente de mayor volumen para tener la libertad de agitar el reactivo. Posteriormente se debe llevar a un matraz aforado adecuado para que las soluciones queden bien preparadas.

Solución de Fehling A:

Disolver 34.65 g de sulfato de cobre en 300 ml de agua destilada a pH de 7. Completar a 500 ml y **conservar a temperatura ambiente en frasco ámbar con tapón de hule.**

Solución de Fehling B:

Disolver 125 g de Hidróxido de potasio (**este reactivo es muy agresivo no se debe tocar porque puede sufrir quemaduras**) más 173 g de tartrato de sodio y potasio en 300 ml de agua destilada pH de 7. Completar a 500 ml con agua. **Conservar a temperatura ambiente en frasco revestido de parafina y con tapón de hule.**

Solución de Lugol para almidón (20%):

A partir de la solución concentrada de yodo lugol se pueden preparar poniendo 20 ml de lugol y agregar 80 ml de agua destilada pH de 7. **Conservar en frasco ámbar y con tapón de hule.**

Solución de Almidón al 2%:

Pesar 2 g de almidón y disolverlo en 100 ml de agua destilada pH de 7.0 en un matraz de 250 ml. **Si no se utiliza el mismo día, guardar en refrigerador a 4°C, solamente por tres días.**

Solución de NaCl al 0.9%:

Pesar 0.9 g de Cloruro de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada a pH de 7.0 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. **Puede guardarse en refrigeración por 30 días.**

Solución de KCN al 0.5%:

Pesar 0.5 g de cianuro de potasio y disolver en 100 ml de agua destilada a pH de 7.0 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

Puede durar a temperatura ambiente una semana y en refrigeración hasta por 4 meses. Recuerde que este reactivo es un veneno.

Solución de Lactado de sodio al 1%:

A partir de la solución comercial al 60%, tomar 1.7 ml y disolver en 100 ml de agua a pH de 7. **Puede conservarse en refrigeración por una semana.**

Solución de Azul de metileno 0.002 M:

Pesar 0.063 g del colorante azul de metileno y disolver en 100 ml de agua destilada a pH de 7. **Se puede guardar en frasco ámbar con tapón de hule a temperatura ambiente. Si se forma una natilla en la superficie se debe desechar.**

Solución de Hidróxido de Sodio al 30%:

Disolver 30 g de NaOH en un vaso de precipitados de 250 ml con 80 ml de agua, agitar suavemente y con **cuidado ya que es un reactivo que puede quemar la piel**. Se deja enfriar y se pasa el contenido a un matraz aforado de 100 ml y se completa hasta la marca con el agua destilada pH de 7. **Se puede conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente indefinidamente.**

Solución saturada de Cloruro de Sodio:

En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml, se colocan 1000 ml de agua destilada a pH de 7. Se va agregando el cloruro de sodio poco a poco agitando cada vez para disolver. Si ya no se disuelve se satura y ya no se agrega más NaCl. **Se puede guardar en refrigeración por 90 días.**

Solución de bicarbonato de sodio al 5%:

Disolver 5 g de bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) en 100 ml de agua destilada a pH de 7 **Solo puede guardarse por 1 semana en refrigeración a 4°C.**

Solución de pancreatina al 10% (fresca):

Pesar la cantidad de pancreatina solicitada y depositar en un matraz Erlenmeyer adecuado a esa cantidad, tapar el matraz con papel parafilm y dejar en una probeta el agua solicitada para hidratarla. (Por ejemplo 100 ml para 10 g de pancreatina). **No se puede guardar una vez hidratada.**

Solución de pancreatina al 10% (hervida):

Pesar 10 g (o lo solicitado) de pancreatina y disolver con 100 ml de agua destilada a pH de 7 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (o más grande si es necesario). Una vez disuelto calentar al mechero o en la parrilla de gas hasta que empiece a hervir, retirar de la flama y dejar enfriar. **Tapar con papel parafilm y guardar en refrigeración solamente para usarse al siguiente día.**

Solución de taurocolato de sodio al 5%:

Pesar 4 g de taurocolato de sodio y colocar en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. **Tapar el matraz con papel parafilm y con papel de aluminio en 100 ml de agua destilada a pH de 7, dejar el agua destilada que se necesite, en estecaso serán 80 ml.**

Solución de hidróxido de sodio al 0.1 N:

Pesar 4 g de Hidróxido de sodio en un vaso de precipitados de 250 ml y disolver lo más rápidamente posible con 80 ml de agua destilada a pH de 7. Dejar enfriar y pasar el contenido a un matraz aforado de 100 ml y completar con el agua hasta la marca. **Guardar en frasco tapado perfectamente con papel parafilm en el refrigerador donde se puede conservar durante 4 meses.**

Solución de hidróxido de sodio al 0.01 N:

Esta solución se puede preparar de dos formas según con lo que se cuente en el laboratorio o lo que se pueda utilizar.

- a) De la solución preparada anteriormente se pueden tomar 10 ml colocar en un matraz aforado de 100 ml y se completa hasta la marca con agua destilada a pH de 7.
- b) Se pesan 0.4 g de Hidróxido de sodio y se sigue el mismo procedimiento que para la solución anterior.

Solución de grenetina al 5% (disuelta a baño maria):

Para preparar 100 ml de esta grenetina, se pesan 5 g de grenetina y en un matraz Erlenmeyer de 250 ml se disuelve con 100 ml de agua destilada, para que se disuelva bien se calienta brevemente el matraz a baño maría hirviendo. **No debe subir mucho la temperatura en la grenetina. Se guarda solo por un día en la estufa bacteriológica a 37°C.**