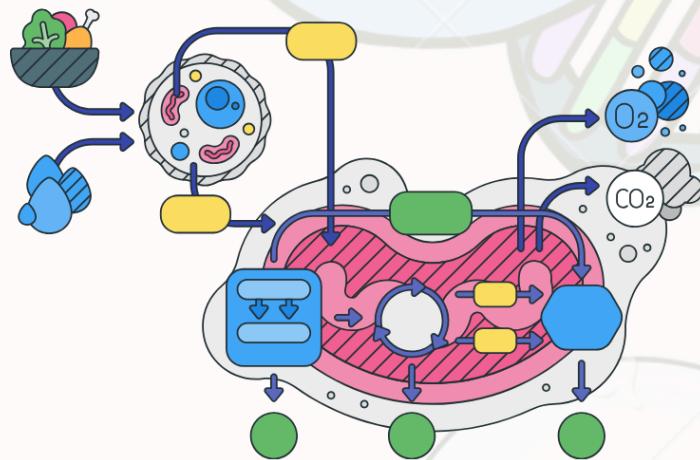


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA  
CARRERA: QUÍMICA CLAVE DE ASIGNATURA: 1718  
PAPIME PE 205615

# MANUAL DE PRÁCTICAS



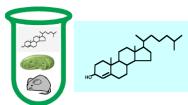
## *Bioquímica Metabólica* Laboratorio



NOMBRE DEL ALUMNO

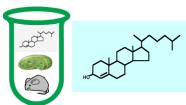


Grupo  
Semestre



## ÍNDICE

	Página
Introducción.....	3
Objetivos generales de la asignatura.....	4
Cronograma.....	5
Reglamento.....	6
Normativa para trabajo en Laboratorios de la Facultad.....	8
	9
Relación de las actividades experimentales con el programa de la asignatura.....	
Criterios de evaluación.....	10
Accidentes más frecuentes en el laboratorio. Primeros auxilios.....	13
Manejo de residuos en el laboratorio de bioquímica .....	16
Equipo de protección y material de uso común.....	21
Práctica 1. Cuantificación de DNA.....	22
Práctica 2. Introducción al metabolismo.....	28
Práctica 3. Fermentación alcohólica.....	40
Práctica 4. Extracción de glucógeno de hígado de ratón.....	49
Práctica 5. Fotosíntesis: Aislamiento de cloroplastos y reacción de Hill.....	55
Práctica 6. Cuantificación de creatinina en suero sanguíneo.....	65
Práctica 7. Cuantificación de colesterol y bilirrubina en suero sanguíneo.....	70
Práctica 8. Cuantificación de urobilinógeno en orina .....	80

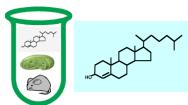


## INTRODUCCIÓN

El curso práctico de la asignatura de *Bioquímica Metabólica* para los alumnos de la carrera de *Química* abarca una serie de prácticas que pretenden proporcionar al estudiante un panorama general de técnicas de uso común para el estudio del metabolismo.

La metodología que se desarrolla en cada práctica es sencilla, sin aparatos sofisticados ni costosos, además con reactivos y soluciones de fácil acceso. Lo anterior pretende que con experiencias simples el estudiante reconozca el valor de algunos compuestos de importancia metabólica a través de extracción de los mismos o la determinación de sus niveles para relacionarlos con alguna alteración o enfermedad, así como, que comprenda la importancia de las enzimas y sus mecanismos de regulación; para que sea capaz de integrar el conocimiento biológico a la práctica profesional del químico, sin importar el área en el que se desarrolle.

Las prácticas que se desarrollan en *Bioquímica Metabólica* son: Cuantificación de DNA, donde se extrae, identifica y determina el material genético de una muestra vegetal. Introducción al metabolismo, en la cual con una técnica colorimétrica estudia una reacción enzimática *in vitro*. Se realiza una fermentación alcohólica con levadura a diferentes sustratos y bajo diferentes temperaturas. Se realiza la extracción del polisacárido de reserva en animales, a partir del hígado de un ratón bajo diferentes condiciones experimentales. Se aborda el tema de fotosíntesis realizando la extracción de cloroplastos para comprobar su capacidad reductora con una técnica colorimétrica. Se determina y cuantifica colesterol, creatinina, calcio y bilirrubina en una muestra sanguínea así como urobilinógeno en una muestra de orina mediante una técnica espectrofotométrica y se compara con los niveles adecuados de cada uno de ellos.

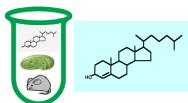


## OBJETIVO GENERAL DE LA ASIGNATURA

Comprender la dinámica del metabolismo general, los mecanismos para su regulación y las bases del rediseño del metabolismo para su aplicación en biotecnología.

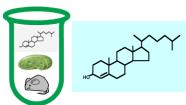
## OBJETIVO DEL CURSO EXPERIMENTAL

Que el estudiante reconozca el valor de algunos compuestos de importancia metabólica a través de extracción de los mismos o la determinación de sus niveles, así como, que comprenda la importancia de las enzimas y sus mecanismos de regulación.



## CRONOGRAMA 2026-I

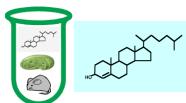
CARRERA	GRUPO	PROFESORES DE LABORATORIO
Química	1701 a/c 1701 a/c	Miriam Álvarez Velasco / Karla Paola Hernández Pérez Jessica G. Filisola Villaseñor / Laura Denise López Barrera
	1702 a/c 1702 a/c	Mariana E. Espinosa Matías / Laura Denise López Barrera Paulina Cortés Acevedo
SEMANA	FECHA	ACTIVIDAD
1	18/08/25 - 22/08/25	-
2	25/08/25 - 29/08/25	Inscripción y Presentación
3	01/09/25 - 05/09/25	Seminario 1 / Práctica 1: Cuantificación de DNA
4	08/09/25 - 12/09/25	Seminario 2: Metabolismo energético.
5	15/09/25 - 19/09/25	Inhábil
6	22/09/25 - 26/09/25	Práctica 2: Introducción al metabolismo
7	29/09/25 - 03/10/25	Práctica 3: Fermentación alcohólica
8	06/10/25 - 10/10/25	Práctica 4: Extracción de glucógeno en hígado de ratón.
9	13/10/25 - 17/10/25	Seminario 3: Metabolismo energético y no energético
10	20/10/25 - 24/10/25	Práctica 5: Fotosíntesis, aislamiento de cloroplastos y reacción de Hill.
11	27/10/25 - 31/10/25	Práctica 6: Cuantificación de Colesterol y Bilirrubina en suero sanguíneo.
12	03/11/25 - 07/11/25	Práctica 7: Cuantificación de Creatinina
13	10/11/25 - 14/10/25	Seminario 4 / Práctica 8: Cuantificación de Urobilinógeno
14	17/11/25	Inhábil
15	20/11/25 - 24/10/25	Examen Final
16	27/11/25 - 01/12/25	Entrega de calificaciones



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS DEL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

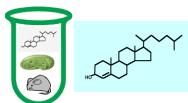
- 1) Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
- 2) Para todo trabajo realizado en el laboratorio, sobre la vestimenta se deberá utilizar bata blanca, con manga larga completamente abotonada, calzado cerrado o la vestimenta adecuada en cada laboratorio, así como traer el equipo de protección personal y el material requerido para la realización de la práctica.
- 3) La persona que use el pelo largo, deberá recogerlo, por seguridad.
- 4) La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir del horario indicado para el inicio de la práctica.
- 5) Por seguridad, las puertas del laboratorio se mantendrán sin llave durante las prácticas y en caso de siniestro se deberán atender obligatoriamente las indicaciones de evacuación del personal de protección civil y/o brigadistas.
- 6) En todo momento se mantendrá una conducta de orden y disciplina en el área de trabajo.
- 7) Es obligación de todos para el buen funcionamiento de las prácticas, mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo.
- 8) Queda prohibido en los laboratorios:
  - a) El ingreso a toda persona que no porte los elementos personales de protección mínimos requeridos.
  - b) Tirar basura fuera del cesto.
  - c) Ingerir alimentos y/o bebidas.
  - d) Fumar.
  - e) Recibir visita.
  - f) Colocar en las puertas de acceso o salida de emergencia cualquier objeto que imposibilite la evacuación.
  - g) La entrada a los inter-laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
  - h) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
  - i) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
  - j) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
  - k) Mover el mobiliario de su lugar.
  - l) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la asignatura.
  - m) Usar gorra ajena a las actividades de laboratorio.
  - n) El uso de audífonos y/o cualquier aparato o dispositivo electrónico ajeno al propósito de las actividades que se realicen.
- 9) Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiendo por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).
- 10) El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente uno de los profesores del grupo.



- 11) El uso del laboratorio para clases teóricas deberá cumplir con los incisos 2, 6 y 7 del presente reglamento y registrarlo en la bitácora.
- 12) El uso del laboratorio para trabajo extraordinario deberá programarse con el profesor responsable en un horario que no interfiera con el destinado para el desarrollo de las prácticas y registrarlo en la bitácora.
- 13) Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno firme el vale de material, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.
- 14) El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibarlo indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió.
- 15) A la persona que, por su negligencia o descuido inexcusable, cause daños al laboratorio, materiales o equipo, deberá cubrir los gastos que se generen con motivo de la reparación y/o reposición.
- 16) Los usuarios de laboratorios que sean sorprendidos haciendo uso indebido de equipos, sustancias, materiales, instalaciones, y demás implementos, serán sancionados conforme a la legislación universitaria que le corresponda, según la gravedad de la falta cometida.
- 17) El incumplimiento a estas disposiciones faculta al responsable para que instruya la salida del infractor y en caso de resistencia, la suspensión de la práctica.

**Atentamente**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
**Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 21 de Junio del 2024**

<b>VoBo Comité de Calidad de Ciencias Biológicas</b>	
<b>Jefe del Comité de Calidad:</b> M.C. Elizabeth Miranda Hernández	
<b>Representante del Jefe de CC:</b> M.C. Ericka Torres Pérez	
<b>Jefes de Sección</b>	<b>Responsables de Calidad</b>
I.A. Miriam Alvarez Velasco	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso
Q.F.B María de Lourdes Galván Ruiz	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales
M.C. Javier Froylán Lazcano Reyes	M.V.Z. Luis Jesús López Morales
M. en M.V.Z. Sonia Torres Patiño	M.C.E. Andrea De Santos López
M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	M.V.Z. Yesica Virginia Torres Durán



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANAS

NORMATIVIDAD PARA TRABAJO EN  
LABORATORIOS DE LA FACULTAD

#### Legislación Universitaria



#### COMPENDIO EN DRIVE



#### Ley Federal de Sanidad Animal



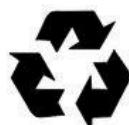
#### NOM-033-SAG/ZOO-2014



#### NOM-062-ZOO-1999



#### Ley de integral de gestión de residuos



#### NOM-018-STPS-2015



#### NOM-052-SEMARNAT-2005



#### NOM-005-STPS-1998

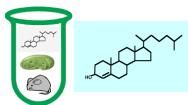


#### NOM-007-SSA3-2011



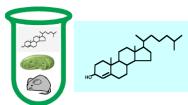
#### NOM-087-ECOL-SSA1-2002





## RELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXPERIMENTALES CON EL PROGRAMA DE LA ASIGNATURA

NÚMERO	TITULO DE PRÁCTICA	UNIDAD TEMÁTICA EN EL PROGRAMA DE LA ASIGNATURA
1	Cuantificación de DNA	UNIDAD 1. Flujo de la información genética
2	Introducción al metabolismo	UNIDAD 3. Panorama del metabolismo
3	Fermentación alcohólica	UNIDAD 5. Metabolismo energético
4	Extracción de glucógeno en hígado de ratón	UNIDAD 5. Metabolismo energético
5	Fotosíntesis: Aislamiento de cloroplastos y reacción de Hill	UNIDAD 5. Metabolismo energético
6	Cuantificación de colesterol en suero sanguíneo	UNIDAD 5. Metabolismo energético
7	Cuantificación de creatinina en suero sanguíneo	UNIDAD 6. Metabolismo no energético
8	Cuantificación de bilirrubina en suero sanguíneo	UNIDAD 6. Metabolismo no energético
9	Cuantificación de urobilinógeno en orina	UNIDAD 6. Metabolismo no energético



## CRITERIOS DE EVALUACIÓN

La evaluación del curso consiste en el 70% de teoría y 30% de laboratorio.

La evaluación del laboratorio se hará con base en:

CONCEPTO	PORCENTAJE
Promedio de prácticas	80
Examen	20

**ASISTENCIA.**- Es requisito indispensable para acreditar el laboratorio, tener el 80% del total de prácticas y demás actividades realizadas y aprobadas.

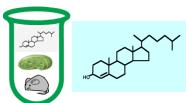
**PUNTUALIDAD.** De acuerdo al reglamento, se dará una tolerancia de 10 minutos para la entrada a la práctica. Es obligación de todos estar desde la hora de inicio de la sesión.

**PROMEDIO DE PRÁCTICAS.** Para obtener el promedio de cada práctica se consideran: el cuestionario previo, el trabajo en el laboratorio y el reporte.

**CUESTIONARIO Y EXAMEN PREVIO A LA PRÁCTICA.** Es un trabajo individual de investigación que se realiza previo a cada práctica. Se presenta al inicio de la sesión, se desarrolla en el manual. Además deben incluir un esquema o diagrama metodológico del trabajo experimental de la sesión, se debe anotar la bibliografía consultada con un mínimo de 3 referencias. Se escribe en manuscrito y con tinta negra. Al inicio de cada práctica se realiza un examen, en el formato que se encuentra en el manual, que incluye preguntas del cuestionario previo y de la práctica correspondiente, haciendo énfasis en la metodología de trabajo. Este se responde en manuscrito con tinta negra o azul cobalto.

**SEMINARIO DE PRÁCTICAS.** De acuerdo a la práctica se realizará previamente, corresponde a una discusión con base en la información de los cuestionarios previos, se revisan los objetivos y se analiza la metodología de tal manera que en el momento en que se lleve a cabo la parte experimental todo esté claro.

**TRABAJO EN EL LABORATORIO.** El trabajo de laboratorio se evalúa en una lista de cotejo con rúbrica, de acuerdo al desarrollo que cada alumno tiene durante la práctica y el conocimiento que tengan del trabajo a realizar. Se consideran las participaciones que el alumno tenga durante la explicación de la práctica y las respuestas que den a las preguntas formuladas por su asesor durante el trabajo práctico. Los puntos específicos a evaluar serán explicados con detalle durante la presentación del curso.



**DESEMPEÑO Y PARTICIPACIÓN.** Se considera de manera individual, se evalúa durante el desarrollo de la práctica.

**REPORTE.** Este es un trabajo de gran importancia, se entrega una semana después de realizada la misma. Se debe realizar en manuscrito, con muy buena presentación, correcta redacción y ortografía. Se debe cumplir con los siguientes puntos:

**CARÁTULA:** VALOR 1.0 LLENAR FORMATO CORRESPONDIENTE

**INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTO:** VALOR 1.0 Breve descripción del tema, con conceptos, importancia y fundamento teórico de la práctica. Citar las referencias utilizadas.

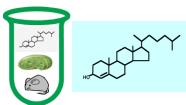
**OBJETIVO:** VALOR 1.0 Se debe plantear su propio objetivo general (¿qué?, ¿cómo? y ¿para qué?). Los objetivos particulares, son opcionales, adicionales de acuerdo a la metodología que se desarrolla; no se toman en cuenta si se copian textuales del manual.

**RESULTADOS:** VALOR 2.0. Esta es una parte muy importante del reporte, no se debe omitir ningún dato. Los resultados se anotarán en cuadros o tablas (con su correspondiente número y descripción), pesos, volúmenes, cambios de color, temperatura y cualquier dato obtenido durante el desarrollo de la práctica. Se debe anotar todo lo que se haya observado, por ejemplo si se hizo reaccionar A con B, se anota si se observó un cambio de color, de apariencia, temperatura, o si no hubo cambio aparente, etc. Todo es importante por lo que se deben tener alerta todos los sentidos. Se pueden realizar dibujos de la experimentación, lo más semejante a la realidad.

En caso de que la práctica lo requiera, se realizarán los cálculos correspondientes, de forma perfectamente clara y completa. Los gráficos deben hacerse en papel milimétrico y/o computadora pero siempre se debe anotar en cada coordenada la propiedad que se está representando con sus unidades respectivas. Se debe cuidar la escala y no olvidar poner al gráfico nombre completo y descripción que permita su identificación.

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS:** VALOR 3.0. Consiste en argumentar los resultados obtenidos y relacionarlos con los conocimientos teóricos. P. ej. ¿Están de acuerdo los resultados con el fundamento? Si / No, ¿Por qué? Se discuten tanto lo que se considera que si salió como lo que se cree que no y se explican las posibles razones. Todos los argumentos utilizados deben tener un soporte teórico que los respalde (citar la bibliografía consultada).

**CONCLUSIÓN VALOR 1.0:** En la conclusión, se hará una deducción de los resultados. Para escribir la conclusión se debe considerar los resultados que se analizaron y fundamentaron en la análisis de la práctica, se enfatiza cada uno de ellos con base en los objetivos del trabajo, además se debe tomar la precaución de no citar ningún autor ya que eso es materia del marco teórico consultado y la introducción redactada. Se debe ser muy claro y breve en cuanto a señalar que las conclusiones están referidas a tal objetivo, además se debe ser preciso, seguro de lo que se afirma y se presenta como sentencia.



Por ejemplo: “se logró identificar.....” o se extrajo \_\_x\_\_ proteína” o “, de forma que con solo leer las conclusiones se pueda estar al tanto de lo que se hizo y los logros obtenidos.

REFERENCIAS VALOR 1.0: Las referencias consultadas para la realización del reporte deben anotarse en esta sección, tomando en cuenta libros (no menos de 3 en cada práctica), páginas de internet, artículos, etc. y deben reportarse de acuerdo a normas internacionales (estilo APA).

## LIBRO

- ❖ Hackett, W. y Robbins, G. (1992). *Manual de Seguridad y Primeros Auxilios*. México, D.F: Alfaomega.

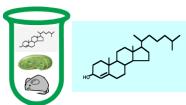
## ARTÍCULO

- ❖ Cintrón, G., Lugo, A. E., Pool, D. J. & Morris, G. (1978). Mangroves of arid environments in Puerto Rico and adjacent islands. *Biotropica*, 10(2), 110-121.

## PÁGINA DE INTERNET

Carroll, L. & Gilroy, P. J. (2002). Transgender issues in counselor preparation. *Counselor Education & Supervision*, 41, 233-242. Recuperado de [https:.....](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1285073/)

**EXAMEN FINAL.** Al término de las actividades programadas para el semestre los alumnos realizan un examen en el que se incluyen preguntas de todas las prácticas.



## ACCIDENTES MÁS FRECUENTES EN EL LABORATORIO

### PRIMEROS AUXILIOS

#### TRATAMIENTO URGENTE DE HERIDAS

Las heridas pequeñas de las que no sale mucha sangre se desinfectan lavándolas con agua oxigenada, alcohol o tintura de yodo, después se tapan colocando la gasa, el algodón y, finalmente, se recubre con una venda.

Cuando existen hemorragias importantes conviene seguir estos pasos: compresión inmediata del vaso sanguíneo, sobre la herida con los dedos perfectamente limpios o con un pañuelo. Elevación de la parte afectada. Si se controla la hemorragia, se aplica un apósito fuertemente aunque no tanto que detenga la circulación del miembro. Cuando la hemorragia continúa posiblemente sea necesario realizar una compresión digital en el trayecto del vaso sanguíneo por encima de la herida o aplicación de un torniquete; el mejor método de aplicación de un torniquete consiste en una venda de goma enrollada varias veces sobre una zona ancha por encima de la herida, pero próxima a ella (5 a 10 cm). Cada quince minutos conviene aflojar el torniquete durante unos segundos y se vuelve a apretar.

En cualquier caso las indicaciones anteriores son para primeros auxilios, después de lo cual es muy importante canalizar al herido a que reciba atención médica.

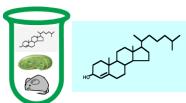
#### TRATAMIENTO URGENTE DE QUEMADURAS

Las quemaduras leves (de primer grado) producidas por fuego u objetos calientes y a quemaduras producidas por agentes químicos. Las quemaduras de segundo grado (formación de ampollas) y las de tercer grado (destrucción de la capa superficial de la piel) requieren la atención inmediata del médico.

Las quemaduras leves producidas por objetos calientes o fuego se tratan con disolución acuosa o alcohólica muy diluida de ácido pícrico, con dermatol o con vaselina y se vendan después. Para tratar quemaduras con sulfamidas se deben tomar precauciones, debido a que hay personas que presentan alta sensibilidad a estos medicamentos.

Las quemaduras con reactivos químicos requieren retirar rápidamente las ropas contaminadas y lavar repetidamente la zona afectada con grandes cantidades de agua. Si la quemadura se produjo por un ácido, posterior al lavado con agua conviene realizar otro con solución de bicarbonato de sodio, para asegurar la neutralización; si la quemadura se produjo por álcalis la neutralización se efectúa con disolución de ácido bórico.

Si la quemadura se produjo por salpicadura en los ojos, éstos deben lavarse inmediatamente con mucha agua y posteriormente debe acudir al oftalmólogo.



## TRATAMIENTO URGENTE DE LA ASFIXIA Y ELECTROCUCIÓN

Los síntomas de asfixia se manifiestan por el tono azulado que adquieren los labios y los lóbulos de las orejas; la pérdida del conocimiento y la interrupción de la respiración. Debe situarse a la víctima al aire libre y practicarse la respiración artificial.

Los síntomas de la electrocución son la pérdida del conocimiento, la interrupción de la respiración y las quemaduras en el punto de contacto con el cable eléctrico. Lo primero es el rescate del herido y su aislamiento eléctrico. Después se le aplica respiración artificial y se tratan las quemaduras.

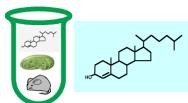
## TRATAMIENTO DE LAS INTOXICACIONES MÁS FRECUENTES

Generalmente lo mejor es intentar que la víctima vomite bebiendo agua tibia o con una solución de sulfato de cobre al 0.2%. También se puede provocar por estimulación de la garganta con un dedo.

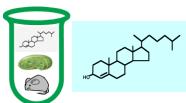
En la siguiente tabla aparecen los venenos más comunes y las precauciones y antídotos que se deben tomar:

### INTOXICACIONES MÁS FRECUENTES

SUSTANCIA	PROPIEDADES Y ACCIÓN	PRECAUCIONES Y ANTÍDOTOS
Ácidos (HCl, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , etc.)	Corrosivos	Los ácidos concentrados se manejan preferentemente con guantes y gafas. Las quemaduras se lavan con agua y con solución de bicarbonato. Si han sido bebidos, se debe tomar agua con bicarbonato o magnesia.
Álcalis	Corrosivos	Las quemaduras se lavan con agua y con solución de ácido bórico o acético al 2%. Si se han respirado vapores de amoníaco concentrado se bebe ácido acético al 1% y se tragan trocitos de hielo en reposo absoluto.
Arsénico, arsenamida, fosfamina	Muy venenosos. Los vapores de fosfamina y arsenamida son mortales.	Usar guantes y mascarilla para su manejo. Tomar aire fresco. Beber agua salada y caliente.



Ácido cianhídrico. Cianuro de potasio	Los vapores de HCN son mortales. También se produce envenenamiento a través de la piel.	Usar mascarilla para su manejo. Beber disolución de permanganato de potasio o sulfato ferroso al 0.2%. Aplicar respiración artificial de ser posible con oxígeno. Tomar café concentrado como vomitivo. Llamar inmediatamente al médico.
Cloro, Bromo y vapores de ácido clorhídrico	Corrosivos	Oler amoníaco diluido, alcohol o éter. Aplicar lavados con solución de tiosulfato de sodio.
Derivados halogenados	Dolores de cabeza. El tetracloro etano ataca al hígado.	Usar mascarilla para su manejo.
Éter	Narcótico	Respiración artificial.  Si ha sido bebido utilice vomitivos. Beber solución de carbonato de sodio
Fenol	Corrosivo. Enfermedades de la piel. Cancerígeno	Usar guantes de plástico para su manejo. Mucho aire. Solución de sulfato de sodio
Ácido fluorhídrico	Corrosivo y venenoso	Lavar la piel con amoníaco al 3%. Para los ojos seguir tratamiento para ácidos. Inhalar amoníaco diluido
Fósforo	Venenoso	Beber grandes cantidades de solución de sulfato de cobre al 0.2%. Evite el uso de aceite.
Fosfogénico	Venenoso	Usar mascarilla para su manejo. Inhalación de oxígeno. Reposo. No aplicar respiración artificial.
Gases nitrosos	Venenosos	Inhalar oxígeno. Respirar amoníaco diluido.
Mercurio y sus compuestos	Vapores perjudiciales	Tomar vomitivos. Leche, solución de tanino.
Monóxido de carbono	Venenoso. Mortal	Aire fresco. Respiración forzada, oxígeno si es necesario.
Sulfato de dimetilo	Venenoso	Usar guantes de plástico para su manejo. Lavar la piel con agua y jabón. En caso de haberlo respirado, inhalar vapores de amoníaco diluido y beber solución de bicarbonato.



Sulfuro de carbono	Venenoso	Aire fresco.
Ácido sulfídrico	Venenoso	Aire fresco. Respiración forzada, inhalación de oxígeno si es necesario.

## MANEJO DE RESIDUOS EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

En el laboratorio de bioquímica igual que en la mayoría de los laboratorios donde se realizan prácticas se manejan una cantidad de productos y se efectúan diversas actividades experimentales que llevan a la generación de residuos que en la mayoría de los casos son peligrosos para la salud y el medio ambiente. Aunque el volumen de residuos que se generan en los laboratorios de docencia, es pequeño en relación al proveniente del sector industrial, no por ello se debe minimizar el problema.

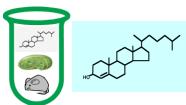
Las condiciones de trabajo adecuadas en un laboratorio, incluyen el control, tratamiento y eliminación de los residuos generados en el mismo, lo cual disminuye los riesgos potenciales en la salud que normalmente se corren al trabajar con agentes químicos; por lo que su gestión es un aspecto imprescindible en la organización de todo laboratorio. La minimización, eliminación y reducción de los residuos generados, almacenados o descargados y el almacenamiento y tratamiento de los residuos químicos peligrosos, es una actividad que cada vez está adquiriendo mayor importancia en todas las instituciones dedicadas a la enseñanza, y cada uno de los laboratorios en los que se imparten prácticas, se está haciendo responsable de promover un manejo adecuado de los residuos que generan para posteriormente canalizarlos a los responsables de su tratamiento.

Algunos factores que deben tenerse en cuenta para solucionar el problema son:

- Aplicar permanentemente las Normas de Bioseguridad establecidas para los desechos en el laboratorio.
- Tener en cuenta las Condiciones de Riesgo de algunos residuos.
- El incremento de los desechos por el uso de material desechable, como elemento esencial de Bioseguridad.
- Información actualizada del manejo adecuado de los desechos.
- Integración de la comunidad educativa, en el Manejo Responsable de los Desechos.

## RECOMENDACIONES

1. Considerar los desechos como potencialmente peligrosos, por ser el producto de todos los procesos biológicos y químicos.
2. En el manejo de los desechos se deben tener en cuenta tres elementos básicos:



El Individuo  
Las acciones Institucionales  
La coordinación interinstitucional.

3. Clasificar los residuos en la fuente, utilizando recipientes debidamente marcados y/o bolsas con los códigos de colores respectivos de acuerdo con el tipo de residuo que se vaya a desechar.

BOLSA ROJA: Desechos Anatomopatológicos Residuos que implican contaminación biológica

BOLSA NEGRA: Desechos ordinarios, comunes, no reciclables

BOLSA BLANCA: Material reciclable.

## DESECHO BIOLÓGICO

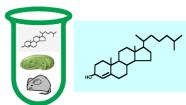
Son aquellos desechos o residuos generados en el diagnóstico, tratamiento, inmunización, producción o pruebas de productos biológicos, que alteran el proceso salud – enfermedad debido a que contienen microorganismos patógenos o que sus características físico – químicas pueden ser tóxicas para las personas que tengan contacto con ellos o alteren al Medio Ambiente.

## DESECHO QUÍMICO

Son todos los residuos derivados del manejo de productos químicos, que por ser corrosivos, reactivos, tóxicos, explosivos, inflamables y radioactivos, generan efectos nocivos para las personas y el Medio Ambiente.

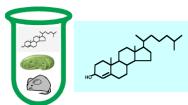
## GENERACIÓN DE LOS DESECHOS

La generación de residuos o desechos, está determinada por la complejidad y la frecuencia de las actividades que se realizan durante el desarrollo de las prácticas en cada uno de los laboratorios, la eficiencia que alcancen en sus tareas los responsables (docentes) de realizar todas las acciones y de la metodología aplicada. Estos factores son útiles para evaluar la generación de residuos en cada práctica, además, son el punto de partida para el dimensionamiento del sistema de manejo.

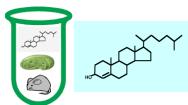


SÍMBOLO DE PELIGROSIDAD	REACTIVOS	PRECAUCIÓN	MANEJO FINAL REALIZADO CON DIRECCIÓN DE UN PROFESIONAL EXPERTO
 EXPLOSIVO	<b>AGENTES OXIDANTES</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• CROMATOS</li><li>• PERCLORADOS</li><li>• NITRATOS</li><li>• CLORATOS</li><li>• PERÓXIDOS</li><li>• ACIDO NÍTRICO</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Manipular en cantidades pequeñas</li><li>• En caso de derrame, usar <i>Chemizorb</i> o sustancia análoga.</li><li>• Preparar mezclas para uso inmediato.</li></ul>	Inactivar con <i>Peroxikit</i> o sustancia análoga.
 COMBURENTE	<ul style="list-style-type: none"><li>• ETILAMINA</li><li>• PERMANGANATO DE POTASIO</li><li>• PEROXIDO DE SODIO</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Evitar todo contacto</li><li>• Considerar la posibilidad de incendio.</li><li>• Disponibilidad de extintores.</li></ul>	Tratamiento especial.
 INFLAMABLE	<ul style="list-style-type: none"><li>• BUTANO</li><li>• PROPANO</li><li>• CARBUROS</li><li>• HIDRUROS</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Adecuada ventilación.</li><li>• No usar luz eléctrica sin protección.</li><li>• Mantener lejos del fuego y las fuentes de calor.</li><li>• Uso de embase plástico.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Evitar eliminarlos en desagüe o vertedero.</li><li>• Eliminar en recipientes recolectores especiales, cerrados.</li></ul>

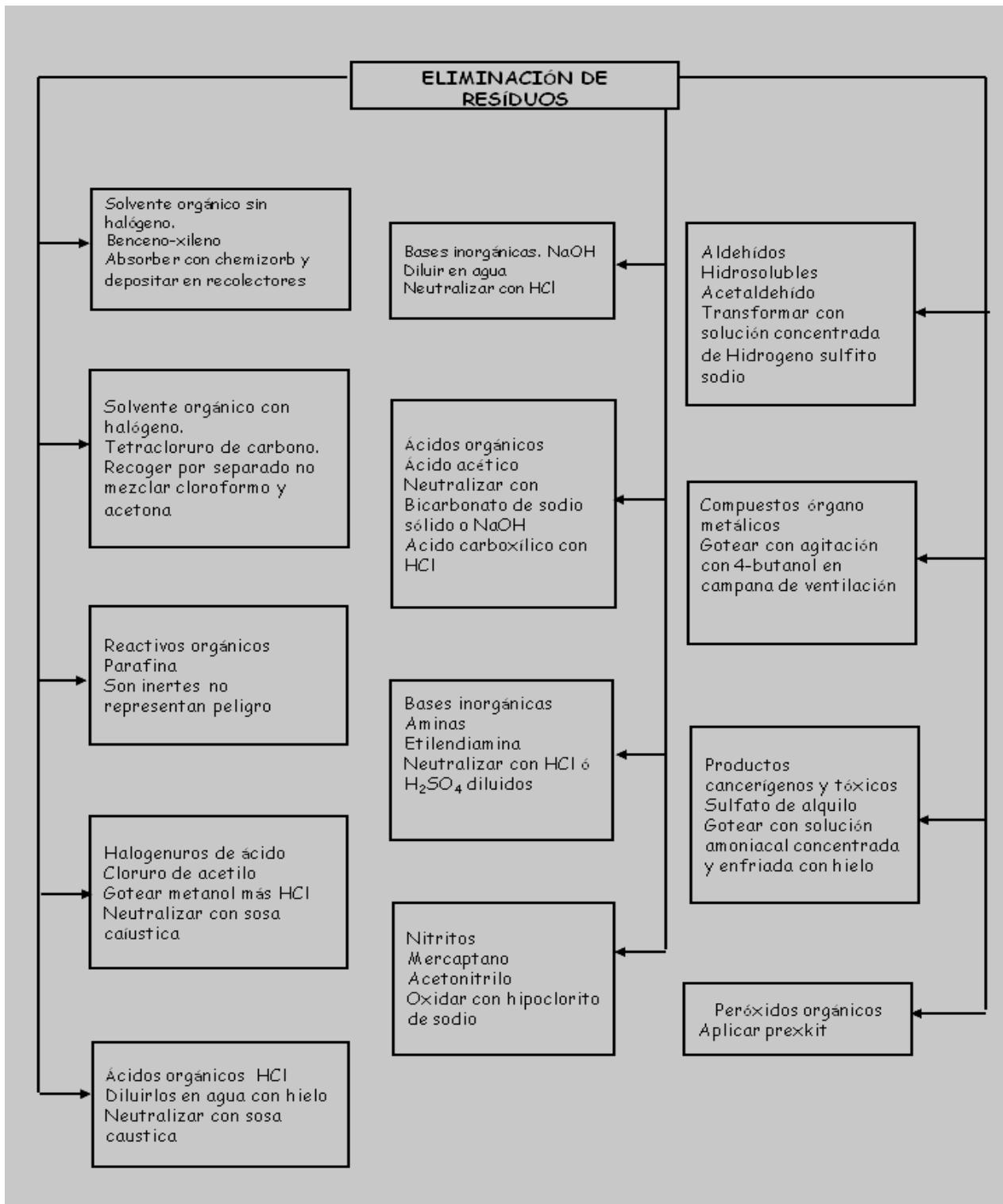
SÍMBOLO DE PELIGROSIDAD	REACTIVOS	PRECAUCIÓN	MANEJO FINAL REALIZADO CON DIRECCIÓN DE UN PROFESIONAL EXPERTO
 TOXICO	MERCURIO DE ORO	Evitar contacto con el cuerpo humano.	Tratamiento especial.
 CORROSIVO	<b>ACIDOS INORGÁNICOS</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• HCl</li><li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li></ul> <b>ALCALIS HIDRÓXIDOS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Adecuada ventilación.</li><li>• Evitar contacto con ojos, piel y ropa.</li><li>• No inhalar vapores</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Diluir con grandes cantidades de agua.</li><li>• Acidos, neutralizarlos con solución de NaOH</li><li>• Bases, neutralizarlas con solución de HCl.</li></ul>
 NOCIVO	<ul style="list-style-type: none"><li>• TRICLOROETILENO</li><li>• XILENO</li><li>• SOLUCIÓN DE AMONIACO</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Evitar contacto con el cuerpo humano.</li><li>• No inhalar vapores.</li></ul>	Diluir con grandes cantidades de agua.
 IRRITANTES	<ul style="list-style-type: none"><li>• SOLUCIÓN DE AMONIACO.</li><li>• CLORURO DE BENCILLO</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Evitar contacto con el cuerpo humano.</li><li>• No inhalar vapores.</li></ul>	Diluir con grandes cantidades de agua.

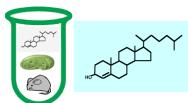


DESECHOS	MANEJO INICIAL	MANEJO FINAL
<b>BIOTERIO</b>  ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN MUERTOS  MATERIA FECAL  PRODUCTO RESIDUAL DEL LECHO	<ul style="list-style-type: none"><li>Colocar en bolsa roja.</li><li>Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.</li><li>Colocar en bolsa roja.</li></ul>	Enterrar  Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.
<b>LAVADO DE MATERIAL</b>  <b>CEPAS Y CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS Y MICOLOGICOS</b>	Eliminación de residuos sólidos previamente esterilizados en bolsa roja.	<b>Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.</b>
TUBOS Y FRASCOS CON RESTOS DE REACTIVOS QUÍMICOS.	<ul style="list-style-type: none"><li>Eliminar cuidadosamente en el vertedero.</li><li>Dejar correr abundante agua.</li></ul>	<b>MATERIAL REUTILIZABLE</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Colocar en Hipoclorito de Na. al 1% (Sanitización).</li><li>Lavar con agua jabonosa.</li><li>Enjuagar.</li></ul> <ul style="list-style-type: none"><li>Colocar en Hipoclorito de Na. al 1% (Sanitización).</li><li>Lavar con agua jabonosa.</li><li>Enjuagar.</li></ul>
RESTOS ANATOMO – PATOLÓGICOS	Colocar en bolsa roja.	Llevar al sitio de almacenamiento intermedio.



## FLUJOGRAMA DEL MANEJO DE RESIDUOS QUÍMICOS





## EQUIPO DE PROTECCIÓN Y MATERIAL DE USO COMÚN

### EQUIPO DE PROTECCIÓN

En cada práctica es requisito indispensable el uso de:

- Bata blanca hasta la rodilla de manga larga, en buenas condiciones, limpia y planchada
- Cubrebocas nivel 3
- Guantes de nitrilo para cirujano (se recomienda mínimo 2 pares por práctica)
- Lentes de seguridad aun cuando se usen anteojos

### MATERIAL DE USO COMÚN

Cada alumno debe contar con:

Manual de prácticas, impreso, con nombre completo y engargolado

Marcador indeleble de punto fino

Lápices de colores

Propipeta

1 Regla

1 Tijeras

Cada equipo de trabajo debe contar con:

1 L de alcohol 96° 10 gasas de 10 x10 cm

1 L de cloro 10 abatelenguas

Detergente líquido para trastes 5 lancetas

Escobillón para tubos de ensaye Papel aluminio

Escobillón para vasos y matraces 1 espátula de cromo-níquel

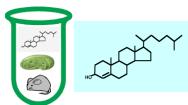
1 Rollo de servitoallas 1 paquete de algodón de 50g

1 Pinzas de disección Cerillos o encendedor

1 Navaja de un solo filo 10 Bolsas de plástico para basura

Una franela para el área de trabajo de 50 x 60 cm

2 jergas o franelas (una para secar material y otra para derrames)



# PRÁCTICA 1

## CUANTIFICACIÓN DE DNA

### OBJETIVO

Cuantificar DNA mediante la reacción colorimétrica con Difenilamina para determinar la cantidad de material genético aislado en una muestra biológica.

### CUESTIONARIO PREVIO

1. Explique los métodos de extracción de ácidos nucleicos en muestras biológicas
2. ¿Cuáles son las reacciones químicas de identificación de ácidos nucleicos?
3. ¿Cuál es el fundamento de la reacción colorimétrica que se realizará en la práctica?
4. Investigar la longitud de onda a la cual se puede cuantificar el DNA espectrofotométricamente.

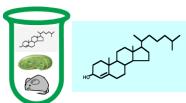
### GENERALIDADES

En los organismos eucariontes el DNA se encuentra formando parte de la núcleo–proteína de los cromosomas del núcleo. La cantidad de DNA en las células de una especie determinada es constante. La función es almacenar información genética.

Hay diferentes técnicas que permiten obtener ácidos nucleicos con alto grado de pureza. Las más utilizadas suelen incluir una etapa de ultracentrifugación en gradientes de CsCl o una cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, muchas aplicaciones de laboratorio no necesitan un grado de pureza tal que justifique incluir estas técnicas en los protocolos de purificación. Por ello se lleva a cabo procedimientos como la desintegración del tejido, solubilización y homogeneización de los componentes celulares, precipitación de los ácidos nucleicos y disolución en un buffer adecuado.

En la mayoría de los casos cuando se trabaja con DNA es importante realizar una cuantificación de la cantidad con la que se dispone. La cuantificación del DNA se puede llevar a cabo por estimación de la intensidad de una banda en geles de agarosa en el que el DNA es teñido por algún colorante como Bromuro de Etidio o bien mediante técnicas de espectrofotometría de luz ultravioleta.

Debido a las características de los nucleótidos se han podido obtener métodos químicos de identificación, por ejemplo mediante la reacción colorimétrica del monosacárido con los reactivos de Bial y Difenilamina. En solución ácida, la cadena lineal de una desoxipentosa



se convierte a la forma  $\beta$ -hidroxilevulinoaldehído altamente reactiva y que reacciona con difenilamina para dar un complejo azul con una absorción máxima a 595 nm.

NOTA: En el DNA únicamente reacciona la desoxirribosa de los nucleótidos de purina, así que el valor obtenido representa la mitad del total de desoxirribosa presente.

## MATERIAL Y REACTIVOS

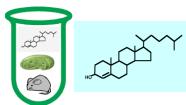
### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

Levadura liofilizada	1 botella Etanol
----------------------	------------------

### MATERIAL POR EQUIPO

### MATERIAL POR GRUPO

5 Tubos de ensaye 16 X 100mm	1 Varilla de vidrio
1 Mechero Bunsen	3 Espectrofotómetros
1 Tripie	1 Balanza electrónica
1 Tela de asbesto	6 Celdas de cuarzo y/o vidrio
1 Vaso de precipitados 600mL	1 Vasos de precipitado 250mL
1 Termómetro	1 Probeta 100mL
1 Pipeta graduada 10mL	5 Vasos de precipitado 10mL
1 Pipeta graduada 5mL	1 Pipeta graduada 5mL
2 Propipetas	3 Pipeta graduada 1mL
1 Piseta	4 Vasos de precipitado 50mL
1 Gradilla	3 Centrifugas grandes
	3 Balanzas de dos platos
	6 Vasos de precipitados de plástico 250mL
	2 Pipeta graduada 2mL
	2 Micropipeta de 100-1000 $\mu$ L
	2 Micropipeta de 10-100 $\mu$ L
	2 Micropipeta de 20-200 $\mu$ L
	1 Galón de agua destilada
	5 Propipetas
	2 Tubos de ensaye 16 x 100mm
	1 Gradilla



1 Vortex

## REACTIVOS

Difenilamina (en frasco ámbar) (0.45g de difenilamina en 30 mL de ác. acético glacial y agregar 0.45 mL de ácido sulfúrico concentrado), debe prepararse el mismo día de la práctica.	15mL Ácido perclórico 10% (PCA) (en gotero)
15mL Solución de lisis: 1. Preparar una solución de NaCl, agregando 1 g de sal y 25 mL de agua. 2. Preparar una segunda solución de Buffer de fosfatos 0.15 M a pH 8.0 en 15 mL de agua. 3. Preparar una tercera solución de EDTA, agregando 1.117g en 25 mL de agua ajustar el pH a 8.0, en cuanto esté totalmente disuelto adicional el volumen faltante hasta 30 mL. 4. Preparar una cuarta solución de dodecilsulfato de sodio agregando 1 g con 10 mL de agua. 5. Para los 15 mL de solución de lisis agregar 1.5 mL de la solución 1 (NaCl), agregar 1 mL de la solución 2 (buffer de fosfatos), agregar 150 $\mu$ L de la solución 3 (EDTA), agregar 4.5 mL de la solución 4, posterior a esto adicionar el agua faltante hasta completar 15 mL.	10mL HCl concentrado (en gotero)
15mL Cloroformo	10mL Acetaldehído frío 0.8%
10mL Bial (en frasco ámbar con gotero)	100mL Etanol absoluto
50mL Etanol 70%	

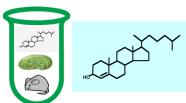
## METODOLOGÍA

### I. Preparación de una suspensión de levadura al 1% para todo el grupo

1. En un vaso de precipitados de 250mL, vierta 1g de levadura liofilizada.
2. Agregue 100 mL de agua destilada.
3. Agite con varilla de vidrio hasta que se disuelva la levadura.

### II. Extracción del DNA

1. En un tubo de ensaye 16 x 100mm, coloque 5 mL de suspensión de levadura.
2. Centrifugar a 3,500 rpm durante 4 min.
3. Resuspender la pastilla con 1 mL de solución de lisis.



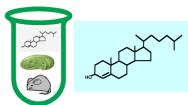
4. La suspensión de células se incubará en hielo durante 15 min.
5. Incubar en un baño de agua a 95 °C durante 2 min, posterior a la incubación mezclar durante 1 min vigorosamente.
6. Repetir el paso 4 y 5.
7. Añadir 1 mL de cloroformo y mezclar por 3 min.
8. Centrifugar a 3,500 rpm durante 4 min.
9. Tomar la fase acuosa y transferirla a otro tubo de ensaye 16 x 100mm, añadir al tubo con la fase acuosa 2 mL de etanol 96° previamente frío, mezclar.
10. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente, centrifugar nuevamente a 3,500 rpm durante 10 min.
11. Retirar sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, previamente frío.
12. Dejar secar el tubo invertido sobre una servitoalla durante 3 min.
13. Resuspender la pastilla de ADN en 700  $\mu$ L de agua destilada.

### III. Determinación colorimétrica de la presencia de ácidos nucleicos

1. En un tubo Eppendorf coloque una alícuota de 10  $\mu$ L de la muestra de DNA obtenido.
2. Añada 2 gotas del reactivo de Bial y 15  $\mu$ L de HCl concentrado.
3. Caliente en baño maría por 10min.
4. Observe el color producido. Anote su observación en el cuadro A e indique para qué molécula es una prueba positiva.
5. Adicional, en un tubo de ensayo coloque una alícuota de 250  $\mu$ L de muestra de DNA obtenido y 250  $\mu$ L de ácido perclórico (PCA) al 10%.
6. Añadir 2 mL del reactivo de Difenilamina y agitar. Proteger el tubo de la luz con papel aluminio.
7. Añadir 100  $\mu$ L de la solución de acetaldehído y agitar.
8. Caliente en baño maría a ebullición por 10min. Esperar a que enfríe un poco.
9. Observe el color producido. Anotar observación en el cuadro A e indicar para qué molécula es una prueba positiva.
10. Prepare una solución blanco (pasos del 5 al 8, sustituir DNA por agua) que contenga los mismos reactivos, con las mismas cantidades, exceptuando el analito de interés, para calibrar y ajustar a cero de absorbancia el espectrofotómetro.
11. Realice la lectura en el espectrofotómetro a 595nm.

### IV. Cuantificación de DNA

1. Reporte la lectura de absorbancia registrada en el paso 11 del apartado III y con ayuda de la curva patrón (Tabla 1) determinar la concentración de DNA de la muestra de interés..

**Tabla 1. Curva patrón de DNA**

[ ] $\mu\text{g/mL}$ DNA	20	25	50	75	100
Abs	0.026	0.037	0.080	0.117	0.157

2. Grafique en papel milimétrico e interpole.

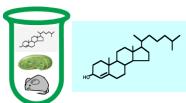
## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

### Cuadro A. DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE LA PRESENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Eppendorf	Tubo de ensayo
Bial	Difenilamina
Prueba positiva	Prueba positiva

### Cuadro B. CUANTIFICACIÓN DE DNA

Absorbancia	[ ] $\mu\text{g/mL}$ DNA



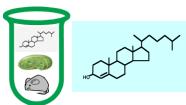
## Cálculos

## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento qué tipo de residuos son, quién los generó y en qué práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos* (6a.). McGraw Hill México.
2. Sambrook, J. y Russell, D. (2001). “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”. (3a) Cold Spring Harbor Laboratories Nueva York, USA.
3. Flores, G., Domínguez, M. y González, N. (2013). “*Manual de Prácticas de Genética Molecular*”. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM CDMX México.
4. Horton, R. (2008). “*Principios de Bioquímica*”. (4a) . Pearson Educación México.
5. Alberts, B., Dennis, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. (2000). “*Biología Molecular de la Célula*”. (4a.) Omega Barcelona, España.



## PRÁCTICA 2

# INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO

### OBJETIVOS

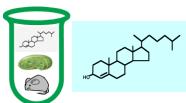
1. Comprender que el metabolismo es un proceso integrado por una serie de reacciones para determinar la función vital de las enzimas.
2. Reconocer la importancia de las enzimas dentro del metabolismo global, utilizando como ejemplo la degradación del almidón *in vitro*.
3. Conocer la función y actividad de la enzima alfa-amilasa.

### CUESTIONARIO PREVIO

1. ¿Qué es el metabolismo? Explique
2. Explique cada una de las fases del metabolismo.
3. ¿Cuál es la importancia de las enzimas dentro del metabolismo global?
4. ¿Qué significa *IN VIVO* e *IN VITRO*? Dé un ejemplo.
5. ¿Cuál es la composición de la saliva?
6. ¿Cuáles son las funciones de la saliva?
7. ¿Qué es la diálisis y cómo se realiza?
8. ¿Qué le ocurre a una muestra de saliva al dializarla?
9. ¿Cuál es la estructura del almidón y cuáles son sus productos de hidrólisis?
10. Explique la reacción del yodo con el almidón y sus productos de hidrólisis.

### CONTENIDO

En esta práctica el alumno realiza la hidrólisis enzimática del almidón, por medio de la amilasa salival y para detectar la desaparición de este polisacárido utiliza la reacción con lugol. Lleva a cabo la diálisis de la saliva y compara la actividad de una muestra de saliva dializada y una no dializada. A través del método espectrofotométrico determina cuantitativamente la actividad de la amilasa salival.



## GENERALIDADES

### METABOLISMO

El **metabolismo** se define como la suma total de reacciones enzimáticas complejas que se llevan a cabo en un organismo. Implica el estudio de miles de reacciones que suceden dentro de la célula, pero también, la coordinación, regulación y sus requerimientos energéticos.

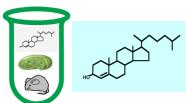
Finalidades del metabolismo:

- Obtener energía química del entorno, ya sea de elementos orgánicos nutritivos o de la luz solar.
- Convertir los elementos nutritivos exógenos en precursores de macromoléculas.
- Formar macromoléculas.
- Formar y degradar biomoléculas necesarias para las funciones celulares especializadas.

Se le llama ruta metabólica a la secuencia de reacciones que permite degradar, sintetizar o transformar un sustrato en particular, por ejemplo, la degradación de glucosa en piruvato (glucólisis). Una ruta metabólica en especial puede ser lineal (como la glucólisis), ramificada (síntesis de aminoácidos), cíclica (el ciclo del ácido cítrico), o en espiral (la degradación de ácidos grasos).

Las vías metabólicas se pueden agrupar dentro de dos fases principales:

1. **Catabolismo.** Es la degradación enzimática de moléculas nutritivas complejas como: grasas, carbohidratos y proteínas a moléculas más simples como: lactato, piruvato, etanol,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_3$ .
2. **Anabolismo.** Biosíntesis enzimática de grandes biomoléculas complejas a partir de moléculas precursoras más pequeñas.



## Características distintivas entre el catabolismo y el anabolismo:

### Catabolismo

- Degradación de biomoléculas
- Proceso global de oxidación química y producción de cofactores reducidos NADH, NADPH y FADH<sub>2</sub>
- Liberación de energía química (reacciones exotérmicas) y producción de ATP a partir de ADP
- Convergencia de vías

### Anabolismo

- Síntesis de biomoléculas
- Abarca todo el proceso de reducción química y producción de cofactores oxidados NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD
- Requiere de energía química (reacciones endotérmicas) y utiliza ATP
- Divergencia de vías

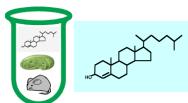
La comprensión del metabolismo requiere del conocimiento de la química de las biomoléculas, de las reacciones en las cuales participan y los mecanismos reguladores de la velocidad de las reacciones.

## DIGESTIÓN

Los seres vivos requieren de un suministro continuo de energía para subsistir. Esta energía la obtienen de la oxidación de los alimentos, que son compuestos químicos procedentes de otros animales o de vegetales, tales como; carbohidratos, lípidos y proteínas. Estos compuestos químicos se caracterizan por ser de elevado peso molecular y de estructura muy compleja; por lo que la mayor parte de ellos no pueden ser asimilados directamente. Para que puedan ser absorbidos por el organismo deben ser degradados a sus componentes más sencillos, es decir: las proteínas a aminoácidos, los oligo y polisacáridos a monosacáridos y los lípidos a alcoholes y ácidos grasos.

El conjunto de procesos mecánicos e hidrolíticos que sufren los alimentos para ser asimilados se denomina **digestión**, ésta puede ser intra o extracelular. En la mayor parte de los organismos inferiores la digestión es intracelular y en los organismos superiores extracelular y se realiza en el tubo digestivo.

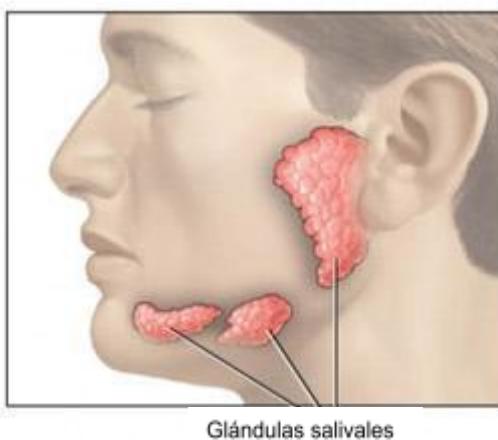
Los cambios químicos que ocurren durante la digestión se llevan a cabo con la ayuda de las enzimas, que se encuentran distribuidas en diferentes zonas del aparato digestivo. Los factores que afectan la actividad de las enzimas son entre otros el pH y la temperatura y para que cada enzima presente su máxima actividad debe encontrarse en condiciones óptimas, de lo contrario se disminuye considerablemente su actividad. Además, es



importante recordar que se deben encontrar presentes en el medio de reacción los cofactores o coenzimas respectivos.

## SALIVA

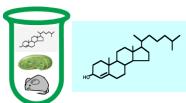
En los organismos superiores, como el hombre, la digestión se inicia en la boca con la masticación de los alimentos que fragmenta las partículas grandes de alimento, que se mezclan con la saliva y se transforman en una papilla denominada *bole alimenticio*. En ausencia de saliva, las partículas pequeñas tienden a dispersarse y hacen difícil la deglución porque no forman bolo. La cantidad de masticaciones depende del alimento pero, por lo general varía entre 20 y 25.



La **saliva** es un fluido biológico viscoso producido por las glándulas salivales, que contiene 99.5 % de agua, sales minerales ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) y varias enzimas digestivas; la lipasa lingual una enzima importante para la digestión de la leche, y la  $\alpha$ -amilasa. También contiene mucinas, glucoproteína lubricante del alimento y protectora de la mucosa oral; es la responsable de la viscosidad de la saliva.

Otras proteínas presentes son la muramidasa o lisozima que ataca el ácido murámico de algunas bacterias, la lactoferrina, una proteína que liga al hierro, el factor de crecimiento epidérmico que estimula el crecimiento de las células de la mucosa gástrica, inmunoglobulinas (IgA) y sustancias del sistema sanguíneo.

La saliva desempeña varias funciones importantes: facilita la deglución, conserva la boca húmeda, sirve como solvente para las moléculas estimulantes de las papilas gustativas, ayuda al habla al facilitar los movimientos de los labios y de la lengua, además de que conserva la boca y los dientes limpios. El agua y las mucinas que contiene ablandan y lubrican el *bole* y las enzimas digestivas que contiene inician el proceso digestivo.

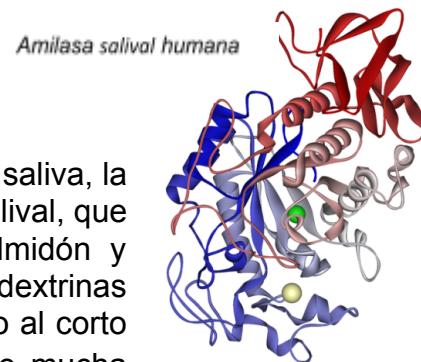


La saliva puede servir de vehículo para la excreción de algunas sustancias, (como el alcohol y la morfina), de iones inorgánicos (como el  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$ , yodo, tiocianato) y de inmunoglobulinas.

El pH de la saliva por lo general es de 6.8, pero puede variar a ambos lados de la neutralidad y debido a su contenido de  $HCO_3^-$  tiene propiedades neutralizantes de los ácidos, de manera que juega un importante papel en la higiene bucal.

## alfa-AMILASA

Para los carbohidratos la digestión se inicia en la boca, por la saliva, la cual contiene a la enzima ptialina, **alfa-amilasa** o amilasa salival, que es una enzima que hidroliza enlaces glucosídicos del almidón y glucógeno, dando como productos maltosa, maltotriosa, dextrinas límites y algo de glucosa (*in vitro*); en el organismo, debido al corto tiempo que actúan sobre los alimentos su acción, no es de mucha importancia. Además es fácilmente inactivada a pH de 4 o más ácidos, por eso su acción cesa en el medio ácido del estómago. En ciertas personas la saliva presenta una actividad de amilasa muy débil o nula.

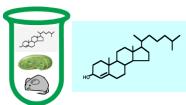


## DIÁLISIS

Enzima	Fuente y estímulo de secreción	Activadores y condiciones óptimas para su actividad	Sustrato	Productos finales
alfa-amilasa o amilasa salival	Glándulas salivales, secretan saliva como respuesta refleja a la presencia de alimentos	Requiere $Cl^-$ pH de 6.6 a 6.8	Almidón Glucógeno	Maltosa, Oligosacáridos Maltotriosa Dextrinas límite Glucosa

Los líquidos presentes en los organismos son dispersiones de diversas sustancias en el seno del agua. Según el tamaño de las partículas se formarán dispersiones moleculares o disoluciones verdaderas como ocurre con las que se forman con las sales minerales o por sustancias orgánicas de moléculas pequeñas, como los azúcares o aminoácidos.

La **diálisis** es un método de separación y purificación de biomoléculas que consiste en el paso de moléculas de bajo peso molecular a través de una membrana dializadora. El disolvente, y las moléculas de bajo peso molecular como iones inorgánicos (cloruro y sodio) y pequeñas moléculas orgánicas (glucosa) atraviesan la membrana desde la solución más concentrada a la más diluida, la difusión de las moléculas es inversamente proporcional a su peso molecular. Las membranas dialíticas son aquellas permeables al



agua y a solutos cristaloides, como el celofán, pergamino y el colodión. Este método permite la separación de iones y moléculas pequeñas como la glucosa de macromoléculas como las proteínas, con lo cual estas últimas se pueden purificar.

La diálisis es un proceso muy lento, en algunos casos requiere días e incluso semanas para su realización. Los coloides muy dializados se vuelven inestables al perder demasiados electrolitos y tienden a precipitar.

La **difusión** es el fenómeno por el cual las moléculas disueltas tienden a distribuirse uniformemente en el seno del agua. Puede ocurrir también a través de una membrana si es lo suficientemente permeable.

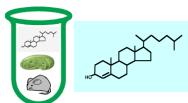
Cuando se tienen dos disoluciones acuosas de distinta concentración separadas por una membrana semipermeable (deja pasar el disolvente pero no el soluto), se produce el fenómeno de la **ósmosis** que sería un tipo de difusión pasiva caracterizada por el paso del agua (disolvente) a través de la membrana semipermeable desde la solución más diluida (hipotónica) a la más concentrada (hipertónica), este traslado continuará hasta que las dos soluciones tengan la misma concentración (isotónicas o iso-osmóticas). Se entiende por **presión osmótica** la presión que sería necesaria para detener el flujo de agua a través de la membrana semipermeable.

A través de estos fenómenos se realizan los intercambios de gases y de algunos nutrientes entre la célula y el medio en el que vive. La membrana plasmática de la célula puede considerarse como semipermeable, y por ello las células deben permanecer en equilibrio osmótico con los líquidos que las bañan. Cuando las concentraciones de fluidos extracelulares e intracelulares son iguales, ambas disoluciones son isotónicas. Si los líquidos extracelulares aumentan su concentración de solutos se hacen hipertónicos respecto a la célula, ésta pierde agua y se deshidrata, fenómeno conocido como plasmólisis. Y si por el contrario los medios extracelulares se diluyen, se hacen hipotónicos respecto a la célula, el agua tiende a entrar y las células aumentan su tamaño, se hacen turgentes, llegando incluso a estallar.

## MEMBRANAS SEMIPERMEABLES

Son aquellas que permiten el paso de moléculas en función de su peso/tamaño molecular, permitiendo el paso de pequeñas moléculas pero impidiendo el paso de moléculas de gran tamaño. Estas membranas están dotadas de poros microscópicos y dependiendo de las dimensiones de los poros, podrán pasar determinadas moléculas a través de ellas. Unas lo harán libremente, otras a medias y otras no podrán pasar en absoluto. Este transporte de masa a través de las membranas semipermeables sigue determinadas reglas:

Transporte difusivo: por diferencia de concentración. Es un transporte pasivo que no consume energía. El movimiento de solutos por difusión es el resultado del movimiento al azar que tienen las moléculas dentro de esta solución. Un soluto en una disolución, en su movimiento aleatorio de vez en cuando impacta contra la membrana. Si la molécula de



sóluto encuentra un poro de tamaño adecuado podrá pasar al otro lado de la membrana. De igual manera en la solución existente al otro lado de la membrana podrá ocurrir lo mismo y otro sóluto podrá pasar en dirección contraria.

Diferencia o gradiente de concentración: la cantidad de sóluto que pase de una solución A a una solución B y viceversa va a depender del número de impactos o colisiones contra la membrana. La frecuencia de colisiones contra la membrana va a depender de la concentración de sólitos a cada lado de la membrana. Por ejemplo, si la concentración de un sóluto x en una solución A es 50 mmol y en la otra solución B este mismo sóluto tiene una concentración de 10 mmol, la probabilidad de que el sóluto x en la solución A choque contra la membrana, y por lo tanto pase al lado B es 5 veces mayor que del lado B este mismo sóluto pase al lado A. Por tanto la transferencia neta de sóluto de una solución A, a la solución B va a ser mayor mientras más grande sea el gradiente de concentración entre las dos soluciones.

Peso molecular: cuanto mayor sea el peso molecular de un sóluto, menor será su tasa de transporte a través de una membrana semipermeable. Los motivos para esto se deben a la velocidad y al tamaño. La velocidad de una molécula en una solución está inversamente relacionada con el peso de la molécula. Por ejemplo, la velocidad de una molécula que pesa 200 daltons será menor que la de una molécula que solo pesa 100 daltons. Las moléculas pequeñas se mueven a una velocidad elevada e impactan con gran frecuencia con la membrana por lo que su transporte difusivo va a ser alto. Las moléculas grandes, aunque pudieran pasar fácilmente por los poros, van a difundir poco ya que al ir a una velocidad más lenta van a colisionar con menos frecuencia contra la membrana. El tamaño de una molécula se relaciona con su peso molecular. La membrana va a impedir parcial o totalmente el paso a través de un sóluto que sea de un tamaño aproximado o mayor que el del poro de la membrana.

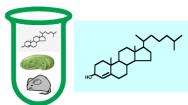
Permeabilidad de la membrana: tamaño de poros, densidad de poros, grosor de la membrana.

Resistencia de la membrana: la resistencia de la membrana al transporte de sólitos será mayor si la membrana es gruesa, si el número de poros es pequeño o si los poros son estrechos.

## MATERIAL Y REACTIVOS

### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

1 liga o trozo de parafilm	Hilo cáñamo
----------------------------	-------------

**MATERIAL POR EQUIPO****MATERIAL POR GRUPO**

1 vaso de precipitados de 250mL	1 vaso de precipitados 2000 mL
2 vaso de precipitados de 100mL	1 vaso de precipitados de 250mL
8 tubos de ensaye 16 x 150mm	20 celdas para espectrofotómetro
2 pipetas graduadas de 2mL	1 parrilla de calentamiento c/agitación
5 pipetas graduadas de 1mL	4 propipetas
2 pipetas pasteur	1 pipeta graduada de 2mL
2 matraces volumétricos de 100mL	3 pipeta graduada de 1mL
1 probeta de 100mL	4 vasos de precipitado de 100mL
2 propipetas	5 espectrofotómetro
1 gradilla	1 mechero bunsen
1 placa de porcelana	1 tripie
1 piseta	1 tela de asbesto
	5 termómetros
	5 baño maría
	1 pinzas de punta roma
	10L agua destilada

**REACTIVOS**

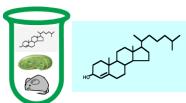
150 mL de almidón al 1%	100 mL de lugol 0.01M / en 5 frascos goteros
60 mL HCl 1N	Tiras de pH
10 tubos para diálisis de 10 cm de longitud	10 pzas Parafilm
100g Bicarbonato de sodio / 100mL NaOH	1 magneto grande

**METODOLOGÍA****I. Recolección de la muestra**

1. Un voluntario se enjuaga perfectamente la boca y mastica la liga o un trozo de parafilm
2. En un vaso de 100mL, colecte una muestra de 10 mL de saliva.

**II. Diálisis de una muestra de saliva**

1. En un vaso de precipitados con agua destilada, hierva un segmento de tubo para diálisis y cierre cuidadosamente por un extremo.
2. Coloque 2 mL de saliva en la bolsa y cierre el otro extremo.
3. Sumerja la bolsa en 1L de agua destilada y ponga en agitación durante 60 min.
4. Cambie el agua cada 20 min.



### III. Método colorimétrico para la observación de la actividad de amilasa salival.

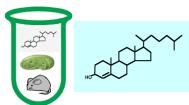
1. Diluya una fracción de saliva no dializada. Elija usted la dilución (Se sugiere iniciar con una dilución 1:10).
2. Coloque en un tubo de ensaye 1 mL de sol. de almidón al 1% en agua.
3. Incube a 37°C por 2 min.
4. Añada al tubo 1 mL de saliva diluida, incube a 37°C y mezcle.
5. Tome, cada 30 seg una muestra de la mezcla de incubación y colóquela sobre una cavidad de una placa de porcelana a la cual previamente se le ha depositado 2 gotas de solución de lugol.
6. Busque la dilución adecuada para que el tiempo en que la enzima degrada el almidón sea de entre 3 y 5 min.
7. Una vez obtenida la dilución adecuada, repita la metodología con una muestra de saliva dializada a la misma dilución (no pipetee el precipitado obtenido en el tubo de diálisis).
8. Compare sus resultados y concluya.

### IV. Método espectrofotométrico para la cuantificación alfa-amilasa

1. Rotule dos tubos de ensaye como 1 (testigo) y 2 (problema).
2. Adicione a cada tubo 2 mL de almidón calentado previamente a 37°C.
3. Agregue al tubo 2 (problema), 0.1 mL de saliva.
4. Incube los dos tubos en un baño a 37°C y deje actuar durante 30 minutos.
5. Mientras espera prepare dos matraces volumétricos de 100 mL y rotúlelos como 1 (testigo) y 2 (problema).
6. Adicione a cada matraz 2 mL de HCl 1.0 N y 50 mL de agua destilada.
7. Transfiera el contenido de cada tubo al matraz respectivo y lave con agua destilada cada uno de los tubos por lo menos cinco veces y vierta el agua de lavado al matraz.
8. Agregue al matraz No. 1, 0.1 mL de saliva.
9. Adicione a cada matraz 1 mL de solución de lugol y homogenice perfectamente.
10. Lleve el volumen de cada matraz a 100 mL y deje reposar 15 minutos.
11. Lea la absorbancia de cada matraz en el espectrofotómetro a 580 nm y utilice agua destilada como blanco para ajustar el aparato.
12. Para obtener las unidades de amilasa utilice la siguiente relación:

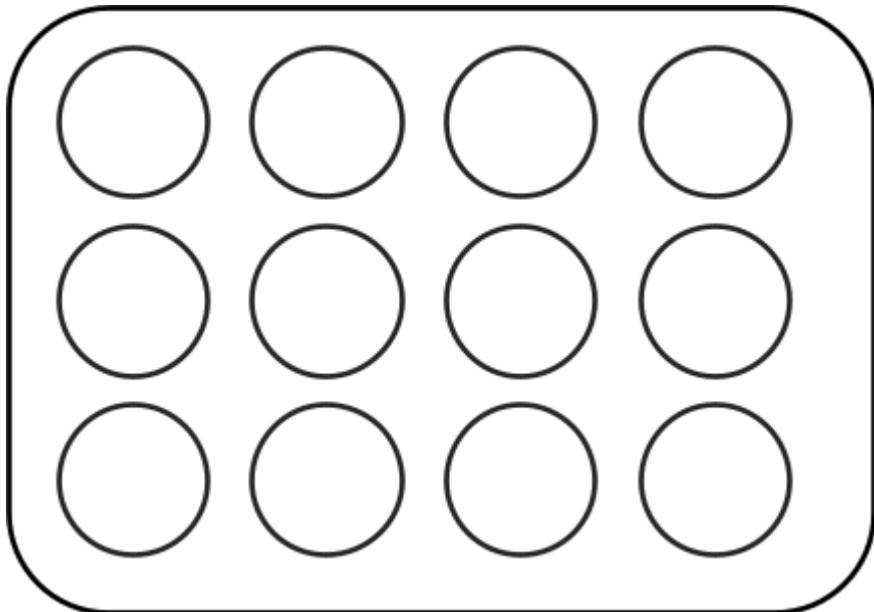
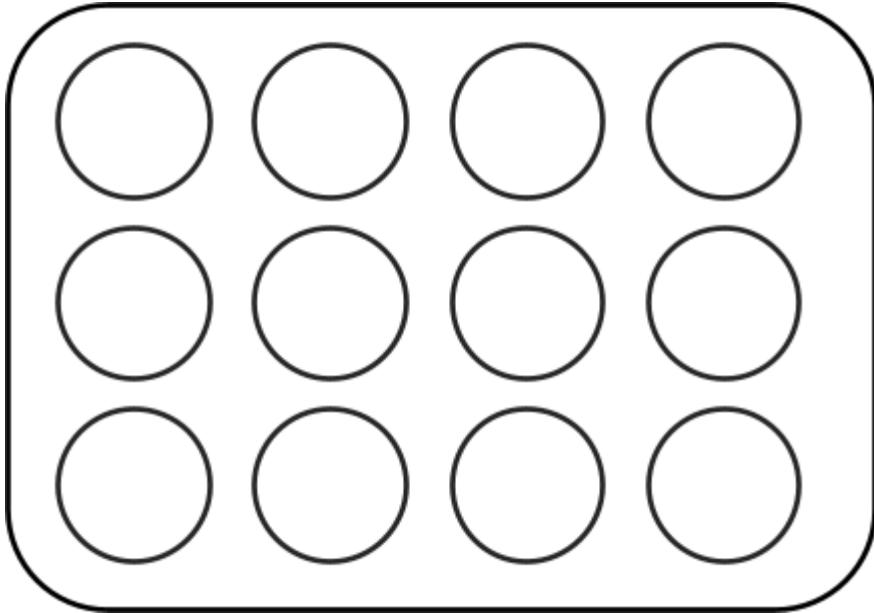
$$\text{UNIDADES DE AMILASA (100ML)} = \frac{\text{Absorbancia testigo} - \text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia testigo}} * 600$$

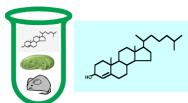
Nota: Investigue el significado de “unidades de amilasa” para que pueda elaborar de manera correcta su reporte.



## Observaciones y resultados

Método colorimétrico para la observación de la actividad de amilasa salival.



**Método de colorimetría visual para la observación de la actividad de amilasa salival.**

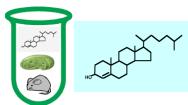
Dilución	Tiempo (Saliva no dializada)	Tiempo (Saliva dializada)

**Método espectrofotométrico para la cuantificación alfa-amilasa**

Absorbancia del testigo	
Absorbancia del problema	

\* Para el análisis, debe considerar las siguientes preguntas como guía, sin embargo recuerde que no debe incluirlo como cuestionario en el reporte:

1. ¿Qué es la amilasa y qué reacción cataliza?
2. ¿Al hacer una diálsis qué le ocurre a la saliva?
3. La amilasa requiere de cofactores y/o activadores. ¿Cuál o cuáles son?
4. ¿Por qué incuba a 37 °C?
5. ¿Todas las salivas que contienen diferentes amilasas tienen la misma actividad a una dilución específica? ¿Por qué son diferentes?
6. Al hacer la reacción con almidón y utilizando saliva dializada, ¿Qué observa?
7. ¿A qué se debe esa diferencia de actividad?
8. ¿Cuál es el papel de?
  - 8.1. Una coenzima
  - 8.2. Un activador enzimático.

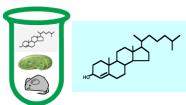


## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en qué práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Crockford. (1990). *Fundamentos de Fisicoquímica*. Limusa Noriega México.
2. Ganong, F. (2002). *Fisiología Médica*. (18<sup>a</sup>) Manual Moderno México,
3. Rendina, G. (1974). *Técnicas de bioquímica Aplicada*. Interamericana México.
4. Skoog, A.D., Holles, J. F., Nieman, A.T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. (5a) Mc Graw Hill España.
5. Stryer, L. (1996). *Bioquímica*. (4a) Editorial Reverté Barcelona, España.
6. Yáñez, A. R. (1996). *Manual de Prácticas de Bioquímica*. IPN México.



## PRÁCTICA 3

# FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

### OBJETIVOS

Realizar fermentación alcohólica con levadura bajo diferentes condiciones, para relacionar el tipo de metabolismo con la producción de energía que se realiza en estos organismos.

### CUESTIONARIO PREVIO

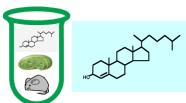
1. ¿Qué es la respiración aeróbica? Explique
2. ¿Qué es la respiración anaeróbica? Explique
3. ¿Qué es la fermentación? ¿Cuántos tipos hay?
4. ¿Qué organismo es *Saccharomyces cerevisiae*? ¿Qué tipo de carbohidratos puede metabolizar?
5. Investiga las rutas metabólicas que realiza *Saccharomyces cerevisiae*
6. Explica con detalle la glucólisis. Incluye fórmulas y enzimas que participan.
7. ¿Cuáles son los posibles destinos metabólicos del piruvato?
8. ¿Qué regulación presenta la glucólisis?
9. ¿La tasa de fermentación se afecta con la temperatura?
10. ¿Qué efecto provoca el NaF sobre la glucólisis? ¿Afecta a alguna enzima en especial? ¿Cuál y Cómo?

### CONTENIDO

En esta práctica el alumno realiza la fermentación alcohólica con levadura, comprueba la desaparición de glucosa con la prueba de Benedict, experimenta la fermentación con diferentes carbohidratos como sustratos: glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa. Realiza la fermentación a dos temperaturas diferentes y prueba también el efecto que el NaF ejerce sobre la ruta metabólica.

### INTRODUCCIÓN

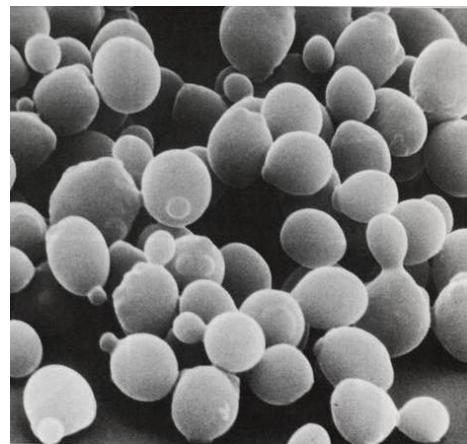
De todos los organismos que habitan la tierra, solo unas cuantas especies son estrictamente anaeróbicos, es decir, que solamente pueden vivir en ausencia de oxígeno. La mayoría son microorganismos que habitan ambientes que tienen poco oxígeno o carecen de él, como: el intestino de los animales, el suelo profundo, sedimentos de lagos y océanos o pantanos. Sin embargo, hay una gran cantidad de organismos que pueden vivir en ausencia y presencia de oxígeno, entre ellos, se incluyen microorganismos, sino



también animales superiores y plantas. Incluso ciertos tejidos de nuestro organismo pueden funcionar anaeróbica o aeróbicamente.

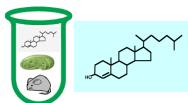
Las células que pueden vivir bajo ambas condiciones reciben el nombre de células facultativas. Un aspecto muy significativo de ellas es que, cuando el oxígeno está ausente de su medio ambiente, pueden extraer energía de la glucosa mediante el mismo tipo de mecanismo de fermentación anaeróbica que utilizan las anaeróbicas estrictas. Mientras que en presencia de oxígeno prefieren oxidar completamente los alimentos hasta la formación de  $\text{CO}_2$ , agua y energía, esto es, hacen oxidación aerobia.

Los productos de fermentación varían de un tipo de célula o microorganismo a otro. La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias. Estos microorganismos transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono. La fermentación alcohólica, inicia después de que la glucosa entra en la célula. La glucosa se degrada en ácido pirúvico. Este ácido pirúvico se convierte en seguida en  $\text{CO}_2$  y etanol. Los seres humanos han aprovechado este proceso para la fabricación de pan, cerveza y vino. El bióxido de carbono crea la efervescencia en la cerveza y hace que el pan "suba" dentro del horno. El etanol que se produce es el alcohol presente en la cerveza y en los vinos. Para la elaboración de estos tres productos se emplea el mismo microorganismo: la levadura común o *Saccharomyces cerevisiae*.



*Saccharomyces cerevisiae*.

Cuando se requiere contracción repetida en el músculo esquelético, por ejemplo, durante el ejercicio fuerte y continuo, el suministro de oxígeno no puede mantener la demanda metabólica de las células y en este caso el piruvato producto de la glucólisis se convierte en lactato. La acumulación de ácido láctico causa el dolor característico cuando se ejercitan los músculos excesivamente. La fermentación láctica ocurre también en algunas bacterias gracias a este proceso se obtienen productos de origen lácteo tales como el yogur, crema agria y quesos.



## MATERIAL Y REACTIVOS

### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

1 paquete de levadura  
liofilizada

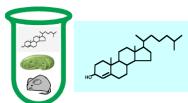
### MATERIAL POR EQUIPO

### MATERIAL POR GRUPO

2 vasos de precipitado de 250 mL	
2 vasos de precipitado de 100 mL	5 baños maría con gradilla
1 probeta de 100 mL	5 termómetros
4 pipeta graduada de 10 mL	1 vasos de precipitado de 600mL
2 pipetas graduada de 5 mL	2 vasos de precipitado de 100mL
6 pipetas graduada de 2 mL	6 vasos de precipitado de 50mL
2 pipetas graduada de 1 mL	3 pipetas graduada de 10mL
2 pipetas pasteur	1 pipetas graduada de 2mL
6 tubos de ensaye de 16 x 250mm	4 pipetas volumétrica de 2mL
15 tubos de ensaye de 16 x 150mm	1 pipeta graduada de 1mL
1 gradilla p/tubo de ensaye 16 x 250mm	8 propipetas
1 gradilla p/tubo de ensaye 16 x 150mm	1 galón de agua destilada
1 piseta	Papel parafilm
3 propipetas	1 balanza digital
1 varilla de vidrio	1 gradilla p/tubo de ensaye 16 x 250mm
1 tripie	2 frascos de residuos 100mL
1 tela de asbesto	
1 vaso de precipitados 600mL	
1 mechero bunsen	
2 pinzas para tubo de ensaye	

### REACTIVOS

400 mL de solución de glucosa al 10 %	50 mL de solución de sacarosa al 2 %
150 mL de solución de glucosa al 2 %	80 mL de NaF al 0.01M
50 mL de solución de galactosa al 2 %	100 mL Reactivo de Benedict
50 mL de solución de fructosa al 2 %	10 pzas papel parafilm



## METODOLOGÍA

Para esta metodología es importante revisar la temperatura a la cual deben estar las soluciones que se van a utilizar.

### Preparación de una suspensión de levadura al 10%

1. En un vaso de precipitados de 250mL, vierta el sobre de 11g de levadura liofilizada
2. Agregue 110 mL de agua destilada
3. Agite con varilla de vidrio hasta que se disuelva la levadura
4. En un tubo de ensaye 16 x 150mm, coloque 10 mL de suspensión de levadura y manténgalo en un baño de hielo y los otros 60 mL restantes, en un vaso de precipitados de 100mL, colóquelo en el baño a 37°C.

## II. Fermentación de glucosa y demostración con la prueba de Benedict

Prueba de Benedict:

1. Para comprobar la presencia de azúcares reductores en la solución de glucosa al 2%, realice una prueba de Benedict. Mida 0.5 mL de la solución problema + Agregue 1 mL del reactivo de Benedict. Caliente en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos:

Prueba positiva : color rojo ladrillo

Prueba negativa: color azul

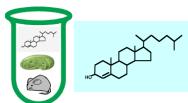
2. Para verificar que la levadura no contiene ningún azúcar reductor realice un blanco de la siguiente manera: Mezcla 3 mL de levadura al 10% con 10 mL de agua destilada. Efectúe una prueba de Benedict tomando únicamente 0.5 mL de esta disolución.

Fermentación de glucosa.

3. En un tubo de ensaye 16 x 150mm, agregue 10 mL de una solución de glucosa al 2%.
4. Agregue 3 mL de suspensión de levadura al 10% a 37°C
5. Mezcle perfectamente hasta que la mezcla esté homogénea
6. Incube a 37°C
7. Realice una prueba de Benedict con 0.5 mL de la mezcla a los 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación.
8. Registre sus resultados en la tabla 1

## III. Fermentación con diferentes carbohidratos

1. Rotule cinco tubos de ensaye como: agua, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa
2. Adicione a cada uno lo siguiente:  
Agua: 2 mL de agua destilada



Glucosa: 2 mL de glucosa al 2%  
Fructosa: 2 mL de fructosa al 2 %  
Sacarosa: 2 mL de sacarosa al 2%  
Galactosa: 2 mL de galactosa al 2 %

3. Para cada uno de los tubos por separado y uno por uno:
4. Adicione 2 mL de suspensión de levadura y

Llene completamente una pipeta graduada de 2mL con la solución del tubo que corresponda y tape el extremo con un dedo, mientras sella el lado opuesto con un trocito de “parafilm”. Utilizando una pipeta pasteur, continúe el llenado de la pipeta graduada hasta que la solución llegue hasta antes de que se desborde.

Invierta la pipeta y colóquela dentro del tubo de ensayo.

5. Inicie la toma del tiempo.

Observe cada 5 minutos, durante media hora y con ayuda de una regla anote el volumen desplazado del líquido.

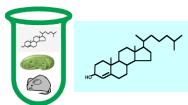
Registre sus datos en la tabla 2.

#### IV. Fermentación a diferentes temperaturas

1. Prepare un baño de agua con hielo (0°C) y un baño a 37°C
  2. Rotule dos tubos de ensayo de 15 x 1.5 cm como: A (0°C) y B (37°C)
  3. Adicione a cada uno lo siguiente:
    - A: 7.5 mL de suspensión de levadura incubada 0°C + 7.5 mL de glucosa al 10% + 7.5 mL de agua destilada fría.
    - B: 7.5 mL de suspensión de levadura a 37°C + 7.5 mL de glucosa al 10% + 7.5 mL de agua destilada a 37°C.
  4. Coloque sobre cada tubo un tubo de ensayo de 15 x 2.5 cm, inviértalos rápidamente y ponga el tubo A en el baño de agua con hielo (0°C) y el B en el baño a 37°C.
  5. Inicie la toma del tiempo.
- Observe cada 5 minutos, durante media hora y con ayuda de una regla anote el volumen desplazado del líquido.
- Registre sus datos en la tabla 3.

#### V. Efecto del NaF sobre la fermentación.

1. Rotule dos tubos de ensayo de 15 x 1.5 cm como: C (sin NaF) y D (con NaF)
2. Adicione a cada uno lo siguiente:
  - C: 7.5 mL de suspensión de levadura a 37°C + 7.5 mL de glucosa al 10% + 7.5 mL de agua destilada a 37°C.
  - D: 7.5 mL de suspensión de levadura a 37°C + 7.5 mL de glucosa al 10% + 7.5 mL de solución de NaF 0.01M a 37°C
3. Coloque sobre cada tubo un tubo de ensayo de 15 x 2.5 cm, inviértalos rápidamente y ponga los dos tubos en un baño a 37°C.
4. Inicie la toma del tiempo.

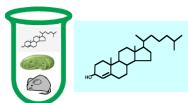


Observe cada 5 minutos, durante media hora y con ayuda de una regla anote el volumen desplazado del líquido.  
Registre sus datos en la tabla 4.

## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

**Tabla 1. Fermentación de glucosa y demostración con la prueba de Benedict**

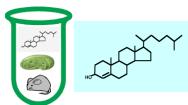
Muestra	Prueba de Benedict
Glucosa	
Levadura	
30 min	
60 min	
90 min	
120 min	

**Tabla 2. Fermentación con diferentes carbohidratos**

Tiempo (min)	Agua	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Galactosa
5					
10					
15					
20					
25					
30					

**Tabla 3. Fermentación a diferentes temperaturas**

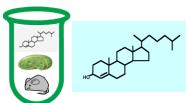
Tiempo (min)	A (0°C) Volumen desplazado	A (37°C) Volumen desplazado
5		
10		
15		



20		
25		
30		

**Tabla 4. Efecto del NaF sobre la fermentación**

Tiempo (min)	C(sin NaF) Volumen desplazado	D (con NaF) Volumen desplazado
5		
10		
15		
20		
25		
30		

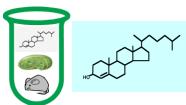


## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento qué tipo de residuos son, quién los generó y en qué práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Dennis B., Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J. (2000). *Biología Molecular de la Célula*. (4a) Editorial Omega Barcelona, España.
2. Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2000). *Principios de Bioquímica de Lehninger*. (3a) Omega Barcelona, España.
3. Stryer, L. (1996). *Bioquímica*. (4a) De Reverté Barcelona, España.
4. Yáñez, A. R. (1996). *Manual de Prácticas de Bioquímica*. IPN México.



## PRÁCTICA 4

# EXTRACCIÓN DE GLUCÓGENO DE HÍGADO DE RATÓN

### OBJETIVOS

1. Inducir la síntesis de glucógeno por medio de una dieta rica en carbohidratos para extraerlo en hígado de ratón.
2. Conocer las rutas metabólicas implicadas en la síntesis y degradación del glucógeno.
3. Realizar el sacrificio de los animales de experimentación y su disección posterior para obtener el órgano que se va a trabajar.

### CUESTIONARIO PREVIO

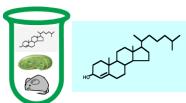
1. ¿Cuál es la importancia del uso de animales de experimentación?
2. ¿Cuáles son las formas de sacrificar a un ratón?
3. ¿Cómo se realiza la disección de un ratón?
4. ¿Qué es el glucógeno y cuál es su estructura?
5. ¿Cuál es la vía metabólica de síntesis del glucógeno?. Explique ampliamente e incluya las enzimas que participan.
6. ¿Cuál es la vía metabólica de degradación del glucógeno?. Explique ampliamente e incluya las enzimas que participan.
7. Explique ampliamente la gluconeogénesis e indique qué significa.
8. Explique la regulación energética de la síntesis y degradación del glucógeno.
9. Explique la regulación hormonal de la síntesis y degradación del glucógeno

### CONTENIDO

En esta práctica se manejan como mínimo 4 grupos de trabajo; de los cuales se debe considerar un blanco, un control positivo y un problema (se someterá a dieta rica en carbohidratos por un periodo mínimo de 3 semanas).

Se sacrifican los animales de experimentación por exposición de solvente. Del lote “dieta rica en carbohidratos”, se debe someter al menos un ratón a estrés durante un mínimo de 15 minutos y posterior sacrificio. Se realiza la disección, se extrae el hígado y se pesa. Después se realiza la técnica de extracción de glucógeno y por último se identifica mediante la reacción con Molish y Lugol.

El alumno realiza una investigación completa de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis y degradación del glucógeno.



## GENERALIDADES

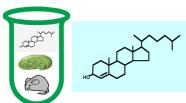
En animales, el glucógeno es la forma principal de almacenamiento de los carbohidratos. Se presenta sobre todo en hígado (hasta 8 %) y en músculo donde raras veces excede el 1%. Sin embargo, debido a la gran masa muscular de los animales, el glucógeno del músculo, representa de 3 a 4 veces la reserva hepática. El glucógeno es un polímero de glucosa con una estructura mucho más ramificada que la amilopectina del almidón, presenta cadenas de 12 a 14 residuos de alfa - D - glucopiranosa, con enlaces glucosídicos alfa -D[1 - 4] y ramificaciones unidas por enlaces glucosídicos alfa [1 - 6].

El glucógeno muscular funciona como fuente de fácil disponibilidad de unidades de hexosa para la glucólisis dentro del propio músculo. El glucógeno hepático sirve en gran medida para exportar unidades de hexosa para la conservación de la glucosa sanguínea, en particular entre comidas. Después de un ayuno de 12 a 18 horas, el hígado casi agota sus reservas de glucógeno. Por su parte el glucógeno muscular sólo disminuye de manera significativa después de un ejercicio vigoroso prolongado.

El glucógeno se sintetiza por medio de glucogénesis a partir de glucosa y otros precursores, ocurre en todos los tejidos, pero es más activa en músculo y en hígado. La glucogenólisis es la degradación de glucógeno a glucosa; la degradación se realiza tanto en el hígado como en el músculo por la enzima glucógeno-fosforilasa, que es la enzima que cataliza la fosforolisis de los enlaces alfa [1 - 4] glucosídicos del glucógeno liberando glucosa 1-P, las fosforilasas del hígado y del músculo son semejantes; son alostéricas y requieren de fosfato de piridoxal (vitamina B<sub>6</sub>), las dos enzimas presentan una interconversión entre la forma fosforilada activa y la forma desfosforilada inactiva. La adrenalina activa a las dos fosforilasas, en su efecto interviene el AMPc, la insulina tiene un efecto depresivo en la degradación del glucógeno, el glucagón tiene efecto estimulante al igual que la adrenalina.

La regulación de la síntesis de glucógeno y su utilización está vinculada en los mecanismos reguladores de la glucólisis y del ciclo de Krebs. Así un exceso de glucosa, se refleja por una elevada concentración de glucosa-6-fosfato, o un abundante suministro de otros combustibles que se refleja en una gran carga energética, tiende a hacer funcionar a la glucógeno sintetasa (para la glucogénesis) y desconectar la glucógeno fosforilasa (para la glucogenólisis) con lo que se producirá un almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en hígado y músculo. Cuando hacen falta combustibles por que la carga energética es baja, como ocurre en el trabajo muscular intenso o cuando el nivel de glucosa sanguínea es bajo, se estimula la glucógeno fosforilasa y se inhibe la glucógeno sintetasa y el glucógeno hepático se degrada para rendir glucosa sanguínea y el glucógeno muscular produce glucosa-6-P.

La regulación en el metabolismo del glucógeno se basa en el equilibrio de la actividad entre la glucógeno sintetasa y la fosforilasa, las cuales están bajo control del sustrato por medios alostéricos y desde luego bajo control hormonal. Así la fosforilasa no sólo se activa cuando hay elevación de AMPc por acción de la fosforilasa-cinasa sino que, la glucógeno sintetasa es convertida a su forma inactiva y estos efectos están mediados por



protein-cinasas que depende del AMPc. Al inhibirse la glucogenólisis se incrementa la glucogénesis y si se inhibe la glucogénesis aumenta la glucogenólisis. La concentración de la fosforilasa a, es el factor más importante en el control del metabolismo del glucógeno en el hígado ya que esta enzima no sólo controla el paso limitante de la velocidad en la glucogenólisis, también inhibe la actividad de la protein-fosfatasa 1 y en esta forma controla la síntesis de glucógeno.

Las enfermedades por almacenamiento de glucógeno son un grupo de trastornos hereditarios caracterizados por la deficiente movilización de glucógeno o por la deposición de formas de glucógeno anormales, originando debilidad muscular e incluso la muerte.

## MATERIAL Y REACTIVOS

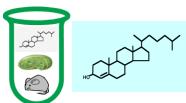
### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

Navaja para bisturí	1 Jaula con bebedero
Tabla de madera para disección	Periódico y/o papel estraza
1 botella de Etanol 96°C	1 bolsa p/residuos

### MATERIAL POR EQUIPO

### MATERIAL POR GRUPO

1 vaso de precipitados de 100 mL	10 vasos de precipitado de plástico
6 tubos de ensaye para centrífuga	1 mechero
4 tubos de ensaye de 16 x 150mm	1 gradilla
1 pipeta graduada de 5 mL	5 centrifugas
1 pipeta graduada de 2 mL	5 balanzas granataria de 2 platos
1 pipeta graduada de 1 mL	2 balanzas electrónicas
1 propipeta	1 vaso de precipitado de 250mL
1 mango p/bisturí,	4 vaso de precipitado de 50mL
1 tijeras de disección	1 vaso de precipitado de 100mL
1 pinzas de disección	1 pipeta graduada de 10mL
1 gradilla	1 pipeta graduada de 5mL
1 mortero chico con pistilo	1 pipeta graduada de 2mL
2 vidrio de reloj	1 pipeta graduada de 1mL
2 varilla de vidrio	1 vortex
1 piseta	1 frasco para residuos de 100 mL
1 placa de porcelana	3 campanas de anestesia
1 pinza p/tubo de ensaye	3 caja Petri
	1 galón agua destilada



## REACTIVOS

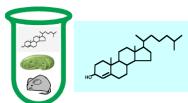
120 mL etanol de 96°	60 mL etanol absoluto
50 mL ácido tricloroacético al 10%	3 g NaCl (cristales)
20 mL solución de lugol (gotero)	40 mL reactivo de molish (gotero)
40 mL ácido sulfúrico concentrado	100mL éter etílico
½ pliego de papel filtro	

## METODOLOGÍA

**NOTA:** Durante el seminario teórico se detalla el manejo bioético de los animales de experimentación, los cuidados y las consideraciones con base en las normativas vigentes. El alumno asume el compromiso de respetar las disposiciones establecidas así como generar un trato digno al modelo biológico experimental.

**Todo el material que se va a usar para pesar, homogeneizar y centrifugar se debe colocar en hielo al inicio de la sesión. Adicional enfriar ácido tricloroacético.**

1. Se alimentan dos ratones  durante 3 semanas con alimento rico en carbohidratos (10% almidón y 5% sacarosa) y se les da a beber una solución al 5 % de glucosa o sacarosa. Se debe disponer de 2 animales de experimentación control los cuales se someten a una normodieta.
2. Un ratón con normo dieta y otro con dieta rica en carbohidratos se sacrifican, mediante sobredosis de éter etílico, dentro de una campana de anestesia. Se realiza la disección del animal, se extrae el hígado, lo más rápido posible y se coloca sobre un vidrio de reloj, en hielo. El tercer ratón, dieta normal, y el cuarto ratón, dieta alta en carbohidratos, se someten a estrés por un periodo mínimo de 15 minutos y posteriormente se sacrifican con sobredosis de éter etílico.
3. Se seca el hígado con una tela o toalla de papel y se coloca sobre hielo molido.
4. Una vez frío el hígado, se pesa lo más exacto posible y se anota el peso.
5. Corte el hígado en trozos pequeños y colóquelo en un mortero previamente enfriado que contenga 1 mL de ácido tricloroacético al 10 % (**frío**) por cada gramo de peso del tejido.
6. Moler el tejido con mucho cuidado hasta obtener una pasta totalmente homogénea.
7. Transfiera cuidadosamente el homogenizado a tubos de centrífuga (previamente enfriados). Lave el mortero con la mínima cantidad de ácido tricloroacético al 10 % (**frío**).
8. Equilibre los tubos de centrífuga con las camisas, que deben estar frías también
9. Centrifugue a 2500 rpm durante 10 minutos.
10. El sobrenadante se decanta en otro tubo previamente pesado y la pastilla se desecha.
11. Agregue lentamente dos volúmenes de alcohol etílico (96%) al extracto de ácido tricloroacético, agitando constantemente.
12. Deje reposar la mezcla hasta que observe un precipitado. (Si no hay precipitado agregue un poco de cloruro de sodio en cristales y caliente ligeramente el recipiente).
13. Centrifugue a 2500 rpm durante 5 minutos.



14. Deseche el sobrenadante y lave el precipitado con 2 mL de alcohol etílico al 96 % y agite fuerte.
15. Elimine el sobrenadante y repita el lavado con 3 mL de alcohol absoluto, nuevamente centrifugar.
16. Si el precipitado no es blanco repita el lavado.
17. Deje secar el precipitado, pese el tubo nuevamente y anote sus resultados.
18. En un tubo de ensaye, realice prueba de Molish y en la placa de porcelana, realice prueba de Lugol, para corroborar presencia de glucógeno.
18. Calcule el rendimiento del glucógeno con base al peso húmedo del tejido de cada animal.
19. Analice los resultados de todos los ratones y concluya.

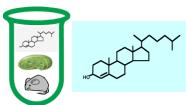
## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Muestra	Peso del Hígado	Peso del glucógeno	% de glucógeno	Prueba de identificación*
<b>Ratón con dieta normal Sacrificado sin estrés</b>				
<b>Ratón con dieta normal Sacrificado con estrés</b>				
<b>Ratón con dieta rica en carbohidratos Sacrificado sin estrés</b>				
<b>Ratón con dieta rica en carbohidratos Sacrificado con estrés</b>				

- Prueba de identificación positiva / negativa Molish / Lugol

Para el análisis, debe considerar las siguientes preguntas como guía, sin embargo recuerde que no debe incluirlo como cuestionario en el reporte:

1. En el procedimiento experimental, ¿cómo se interpreta un control positivo y un control negativo?
2. ¿Por qué es necesario enfriar el hígado y los reactivos en las primeras etapas de separación y purificación?
3. ¿Por qué se eligió el hígado para extraer el glucógeno y no otro órgano o tejido?
4. Compare y discuta los resultados obtenidos en cada ratón.

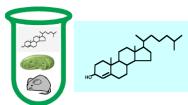


## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en qué práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Dennis B., Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J. (2000). *Biología Molecular de la Célula*. (4a) Editorial Omega Barcelona, España.
2. Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2000). *Principios de Bioquímica de Lehninger*. (3a) Omega Barcelona, España.
3. Hill, R. (1937). Oxygen evolved by isolated chloroplasts. *Nature* 139, 881.
4. Rendina, G. (1974). *Técnicas de bioquímica Aplicada*. Interamericana México.
5. Stryer, L. (1996). *Bioquímica*. (4a) De Reverté Barcelona, España.
6. Yáñez, A. R. (1996). *Manual de Prácticas de Bioquímica*. IPN México.



## PRÁCTICA 5

### FOTOSÍNTESIS

## AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS Y REACCIÓN DE HILL

### OBJETIVO

Realizar el aislamiento de cloroplastos de hojas de espinaca mediante una técnica de fraccionamiento celular para aprender algunos principios fundamentales de la fotosíntesis así como demostrar la capacidad reductora de los cloroplastos aislados: la reacción de Hill.

### CUESTIONARIO PREVIO

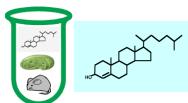
1. ¿Cuáles son los componentes estructurales del cloroplasto?
2. ¿Cuáles son los componentes químicos de cada parte del cloroplasto?
3. ¿Qué pigmentos están presentes en las membranas tilacoides y qué características de absorción tienen?
4. ¿Qué es la fotosíntesis y cuáles son sus fases?
5. ¿Qué son y cómo están estructurados los fotosistemas I y II?
6. ¿Cuál es el fundamento de la práctica? Nota: busque la reacción de Hill

### CONTENIDO

En esta práctica el alumno realiza el aislamiento de cloroplastos de hojas de espinaca. Se asegura de trabajar siempre a temperaturas frías para preservar la actividad de los cloroplastos. Posteriormente con el uso de un colorante de óxido reducción demuestra la capacidad reductora de los cloroplastos a diferentes condiciones de longitud de onda, tiempo y oscuridad.

### GENERALIDADES

Los cloroplastos  son estructuras subcelulares que se encuentran en las algas eucariotas y en las células del tejido fotosintetizador de las plantas superiores; pertenecen a un grupo de organelos citoplasmáticos denominados plástidos, contienen entre otros, un pigmento verde: la clorofila. La fotosíntesis es el proceso a través del cual algunos organismos captan y transforman la radiación luminosa del sol, en compuestos de alto poder reductor o elevada energía química de enlace; estos productos se utilizan posteriormente para la reducción y transformación del  $\text{CO}_2$  a carbohidratos.



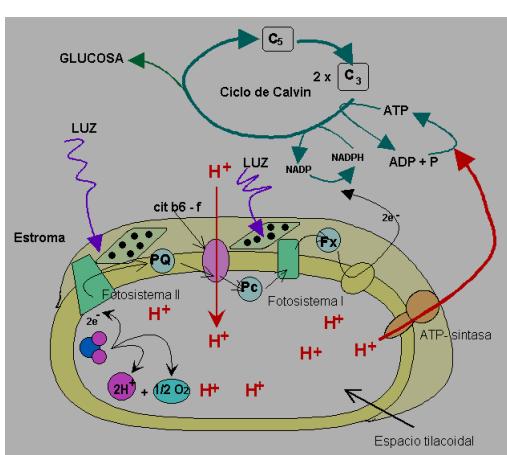
La vida en la tierra depende de la energía que suministra la luz solar, pero las células no pueden emplear o almacenar la energía luminosa directamente, sino que tienen que convertirla en energía química. Los electrones son “moneda” de uso común en la conversión de energía en los sistemas biológicos: muchas de las reacciones energéticas de la célula se explican en términos de transferencia de electrones entre moléculas. Por tanto, las células necesitan para vivir una fuente de electrones. Hace aproximadamente tres mil millones de años, algunas células fotosintéticas aprendieron a prosperar casi en cualquier tipo de entorno natural; sacaron electrones de una sustancia simple: el agua. Estas células desarrollaron la facultad de dissociar pares de moléculas de agua en electrones, protones y oxígeno molecular. Los protones y electrones resultaron energéticamente muy útiles; el oxígeno era simplemente un producto de desecho. La fotosíntesis produce todo el oxígeno de la atmósfera y se realiza en los cloroplastos.

La fotosíntesis, es el proceso que transforma la luz solar en la energía que precisan las funciones vitales de los organismos. Es sin duda, el proceso bioquímico más importante de la Biosfera por varios motivos:

- La síntesis de materia orgánica a partir de la inorgánica se realiza principalmente mediante la fotosíntesis.
- Produce la transformación de la energía luminosa en energía química, necesaria y utilizada por los seres vivos.
- Libera oxígeno, que será utilizado en la respiración aeróbica como oxidante.
- Fue causante del cambio producido en la atmósfera primitiva, que era anaerobia y reductora.
- De él depende también la energía almacenada en combustibles fósiles como carbón, petróleo y gas natural.
- Mantiene el equilibrio necesario entre seres autótrofos y heterótrofos.

Se puede concluir que la diversidad de la vida existente en la Tierra, depende principalmente de la fotosíntesis.

1. Etapas de la fotosíntesis: En la fotosíntesis se diferencian dos fases o etapas: La luminosa y la oscura.



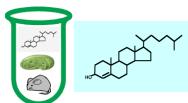
*Fase luminosa:* se realiza en el tilacoide, en ella se producen transferencias de electrones, se produce oxígeno.

*Fase oscura:* se lleva a cabo en el estroma, en ella se realiza la fijación de carbono, se producen carbohidratos.

*Visión global de la fotosíntesis.*

*Fase luminosa y Fase oscura*

Los eventos de la fase luminosa, se pueden resumir en los siguientes puntos:



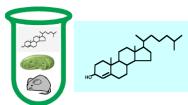
- a) Síntesis de ATP o fotofosforilación que puede ser: acíclica o cíclica.
- b) Síntesis de poder reductor en forma de NADPH<sup>+</sup>.
- c) Fotolisis del agua.

#### Descripción de eventos de la fase luminosa

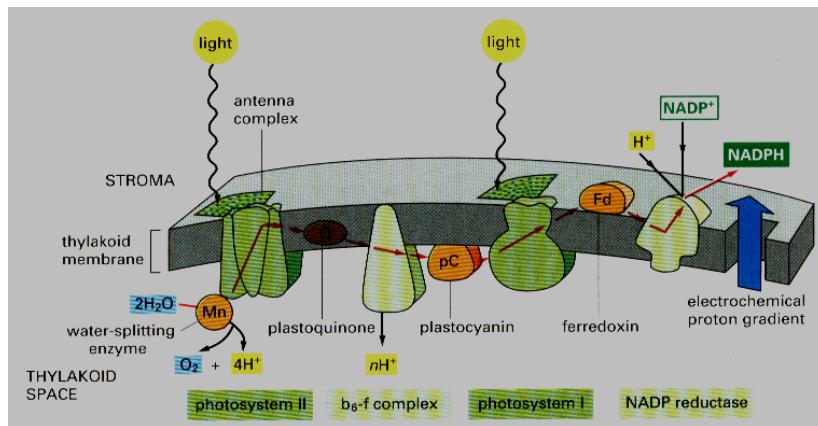
Cuando un pigmento absorbe energía, uno de tres cosas puede ocurrir: la energía es disipada como calor; la energía puede emitirse inmediatamente como una longitud de onda más larga (fluorescencia) o la energía puede activar una reacción química, como el caso de la fotosíntesis.

La captación de energía radiante la realiza el cloroplasto a través de las antenas y los CCL. En el proceso dos fotorreacciones operan en serie para elevar electrones desde el agua, un donador con alto potencial redox, al aceptor final NADP<sup>+</sup>, de bajo potencial redox, una y otra reacción se desarrollan en los fotosistemas I y II. La captación fotónica por ambos fotosistemas, viene facilitada y canalizada vía los correspondientes CCL, e induce un estado excitado en los centros P-700 y P-680; que ceden inmediatamente un electrón a los aceptores primarios respectivos: un componente para el fotosistema I, y una feofitina para el fotosistema II. A consecuencia de ello aparecen los radicales catiónicos P-700<sup>+</sup> y P-680<sup>+</sup>, que, por su elevado potencial redox, son inmediatamente reducidos por los donadores primarios de ambos fotosistemas, ese electrón es recogido por una sustancia aceptora de electrones que se reduce: la Plastoquinona (PQ) y desde ésta va pasando a lo largo de una cadena transportadora de electrones, entre los que están varios citocromos (cyt b/f) y así llega hasta la plastocianina (PC), que se los cederá a moléculas de clorofila del FSI. A su vez, la plastocianina se verá reducida por el flujo electrónico procedente del fotosistema II, mientras que un complejo enzimático dependiente de manganeso, tras acumular cuatro cargas positivas a consecuencia de cuatro fotoactos sucesivos en P-700, recupera su situación basal mediante los cuatro electrones que proceden de la escisión o ruptura de dos moléculas de agua, con desprendimiento simultáneo de oxígeno el proceso se llama fotólisis del H<sub>2</sub>O. De este modo se puede mantener un flujo continuo de electrones desde el agua hacia el fotosistema II y de éste al fotosistema I. Finalmente, el flujo de electrones procedentes del fotosistema I suministra los equivalentes de reducción necesarios para la síntesis del potencial reductor generado en la fotosíntesis; el NADP<sup>+</sup> obtiene dos electrones y un ión hidrógeno.

En el descenso por esta cadena, con oxidación y reducción en cada paso, el electrón va liberando la energía que tenía en exceso; energía que se utiliza para bombear protones de hidrógeno desde el estroma hasta el interior de los tilacoides, generando un gradiente electroquímico de protones. Estos protones vuelven al estroma a través de la ATP-asa y se originan moléculas de ATP.



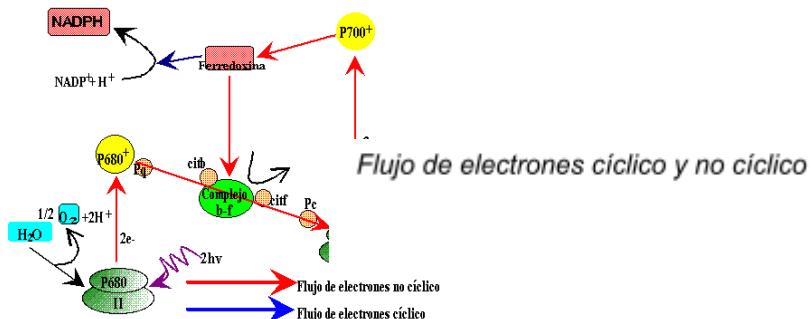
Flujo electrónico durante la fotosíntesis en la membrana tilacoides.

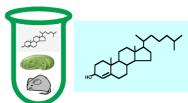


La síntesis de ATP en el cloroplasto se explica mediante la hipótesis quimiosmótica de Mitchell, de forma muy semejante a como ocurre en la mitocondria. El transporte de electrones en la cadena transportadora de la membrana tilacoidal produce el bombeo de protones desde el estroma hacia el espacio tilacoidal a nivel del complejo citocromo b6-f, lo que genera un gradiente electroquímico. El flujo de protones a favor del gradiente desde el espacio tilacoidal hasta el estroma, a través del canal de protones de la ATP sintasa, activa la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. Los electrones se emplean para reducir el NADP<sup>+</sup> a NADPH. El ATP y el NADPH producidos de esta forma pueden utilizarse en la fase oscura.

Los dos fotosistemas pueden actuar conjuntamente proceso conocido como *esquema en Z*, para producir la fotofosforilación (obtención de ATP) o hacerlo solamente el fotosistema I; se diferencia entonces entre fosforilación no cíclica o acíclica cuando actúan los dos, y fotofosforilación cíclica, cuando actúa el fotosistema I únicamente. En la fotofosforilación acíclica se obtiene ATP y se reduce el NADP<sup>+</sup> a NADPH, mientras que en la fotofosforilación cíclica únicamente se obtiene ATP y no se libera oxígeno.

Mientras la luz llega a los fotosistemas, se mantiene un flujo de electrones desde el agua al fotosistema II, de éste al fotosistema I, hasta llegar el NADP<sup>+</sup> que los recoge; ésta pequeña corriente eléctrica es la que mantiene el ciclo de la vida.





### Fase oscura:

En esta fase, se va a utilizar la energía química obtenida en la fase luminosa, en reducir  $\text{CO}_2$ , Nitratos y Sulfatos y asimilar los elementos C, H, y S, con el fin de sintetizar carbohidratos, aminoácidos y otras sustancias.

Descripción de eventos de la fase oscura.

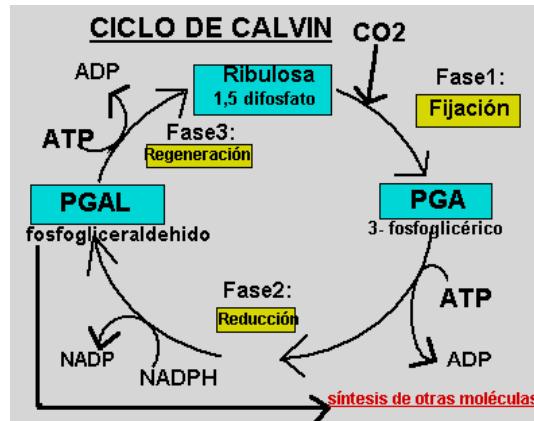
Las plantas obtienen el  $\text{CO}_2$  del aire a través de los estomas de sus hojas. El proceso de reducción del carbono es cíclico y se conoce como Ciclo de Calvin, en honor de su descubridor M. Calvin.

La fijación del  $\text{CO}_2$  se produce en tres fases:

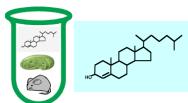
1. *Carboxilativa*: El  $\text{CO}_2$  se fija a una molécula de 5C, la ribulosa 1,5 difosfato, formándose un compuesto inestable de 6C, que se divide en dos moléculas de ácido 3 fosfoglicérico conocido también con las siglas de PGA.
2. *Reductiva*: El ácido 3 fosfoglicérico se reduce a gliceraldehido-3-fosfato, también conocido como PGAL, utilizando ATP y NADPH.
3. *Regenerativa/Sintética*: Las moléculas de gliceraldehido-3-fosfato formadas siguen diversas rutas; de cada seis moléculas, cinco se utilizan para regenerar la ribulosa 1,5 difosfato y hacer que el ciclo de Calvin pueda seguir, y una será empleada para poder sintetizar moléculas de glucosa (vía de las hexosas), ácidos grasos, aminoácidos, etc; y en general todas las moléculas que necesita la célula.

En el ciclo para fijar el  $\text{CO}_2$ , intervienen una serie de enzimas, y la más conocida es la enzima Rubisco (ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa/oxidasa), que puede actuar como carboxilasa o como oxidasa, según la concentración de  $\text{CO}_2$ .

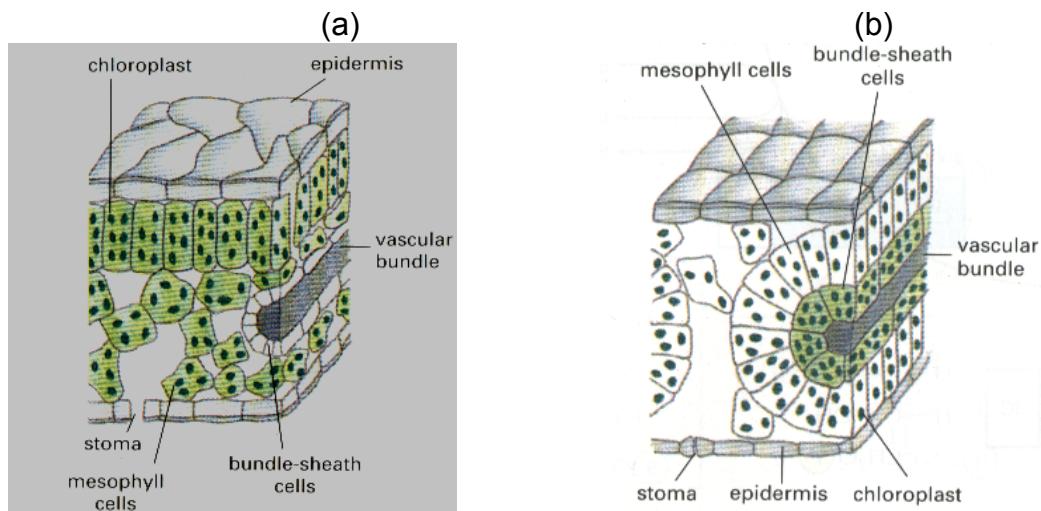
Si la concentración de  $\text{CO}_2$  es baja, funciona como oxidasa, y en lugar de ayudar a la fijación de  $\text{CO}_2$  mediante el ciclo de Calvin, se produce la oxidación de carbohidratos hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , y al proceso se le conoce como fotorrespiración. La fotorrespiración no debe confundirse con la respiración mitocondrial, la energía se pierde y no se produce ni ATP ni NADPH +  $\text{H}^+$ ; y se disminuye el rendimiento de la fotosíntesis, porque sólo se produce una molécula de PGA que pasará al ciclo de Calvin; en cambio cuando funciona como carboxilasa, se obtienen dos moléculas de PGA.



Esquema simplificado del Ciclo de Calvin.



En la mayor parte de los vegetales pluricelulares, todas las células que poseen cloroplastos tienen las mismas actividades fotosintéticas; incorporan en presencia de luz el anhídrido carbónico dando moléculas de tres átomos de carbono. En ciertas plantas superiores, la mayoría de las cuales viven en regiones cálidas y áridas, los primeros productos de la incorporación del  $\text{CO}_2$  no son moléculas de 3C, sino ácidos dicarboxílicos de 4C; estas plantas son las llamadas  $\text{C}_4$ . Las células fotosintéticas de las plantas  $\text{C}_4$ , son de dos tipos: unas incorporan el  $\text{CO}_2$  del aire formando ácidos dicarboxílicos, las otras descarboxilan estos ácidos e incorporan el  $\text{CO}_2$  en la ribulosa 1,5 difosfato. El desarrollo de la fotosíntesis en las plantas  $\text{C}_4$  requiere de intercambio entre dos tipos de células cuyas funciones están diferenciadas y son complementarias y este intercambio está favorecido por la organización anatómica de las hojas en estos organismos. En las plantas  $\text{C}_4$ , las células clorofílicas están dispuestas en dos capas concéntricas alrededor de los haces de las células conductoras de la savia; una capa interna o vaina perivascular y una capa externa o capa del mesófilo, con excepción de las células de los estomas, las otras células de la hoja no tienen cloroplastos funcionales; en las plantas  $\text{C}_3$ , todas las células del parenquima foliar son clorofílicas.

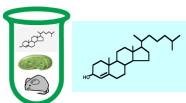


Anatomía foliar de las plantas (a)  $\text{C}_3$  y (b)  $\text{C}_4$ .

## MATERIAL Y REACTIVOS

### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

1 rollo de espinacas frescas	Papel aluminio
25 mL de aceite vegetal	3 lámparas con focos de color rojo, azul y verde (con cable y socket)
Hielo	

**MATERIAL POR EQUIPO****MATERIAL POR GRUPO**

1 vaso de precipitados de 600 mL	10 vasos de precipitado de plástico
1 vaso de precipitados de 100 mL	20 celdas para espectrofotómetro
10 tubos de ensaye 16 x 150mm	1 frasco para residuos de 500 mL
6 tubos para centrífuga	5 centrifugadoras
1 pipeta graduada 10 mL	5 balanza granataria de 2 platos
1 pipeta graduada de 5 mL	5 espectrofotómetros
1 pipeta graduada de 1 mL	4 gradillas
1 pipeta pasteur	2 balanza electrónica
2 propipeta	2 pipetas graduada de 10mL
1 piseta	1 pipeta graduada de 5mL
1 mortero chico con pistilo	4 vasos de precipitado de 50mL
1 gradilla	3 propipetas
1 mechero bunsen	6L de agua destilada
1 tripie	
1 tela de asbesto	
1 vidrio de reloj	

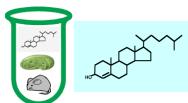
**REACTIVOS**

150mL buffer fosfatos 0.02 M pH 8.0	150mL NaCl 0.35M
450mL 2,6 diclorofenolindofenol $2 \times 10^{-5}$ M	

**METODOLOGÍA****1. OBTENCIÓN DE CLOROPLASTOS A PARTIR DE HOJAS DE ESPINACA**

Las técnicas de aislamiento de cloroplastos no son muy sencillas; sin embargo, pueden utilizarse técnicas aproximadas, que permiten mantener algo de la actividad de los cloroplastos. Para poder preservar la actividad debe asegurarse de trabajar siempre a temperaturas frías, incluyendo las soluciones y la cristalería.

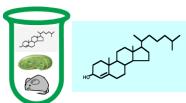
1. Mantener los extractos y los reactivos en hielo.
2. Pese 3 g de hojas de espinacas frescas y lavadas; córtelas (descartando las venas grandes)
3. Macerar las hojas en un mortero con 15 mL de una mezcla (2:1) de una solución buffer de fosfatos 0.02 M pH 8.0 y una solución de NaCl 0.35 M.
4. Centrifugue todo el contenido del tubo, por 2 minutos a 1500 rpm.
5. Centrifugue el sobrenadante a velocidad máxima durante 10 minutos.
6. Resuspender la pastilla en 7 mL de solución de NaCl 0.35 M.
7. Durante todas las manipulaciones, asegúrese de que el envase que contenga los cloroplastos esté sumergido en hielo.



## 2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA: REACCIÓN DE HILL

En esta parte de la práctica el DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), que es un colorante redox que en su forma oxidada presenta color azul y en su forma reducida pierde color, se utilizará para demostrar la capacidad reductora de los cloroplastos. El objetivo es observar el transporte electrónico de la fase luminosa, mediante la reducción de un colorante que realizará la aceptación de los electrones en lugar del NADPH.

1. Preparar una serie de tubos, rotulados del 1 al 8 y agregar a cada uno 5 mL de la solución de Diclorofenolindofenol  $2 \times 10^{-5}$  M. Recuerde el reactivo es fotosensible.
2. Leer en un espectrofotómetro a X nm la absorbancia de la solución en el tubo 1. Nota: Investigar la longitud de onda de máxima absorción del colorante.
3. Agregar al tubo 2, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos y agitar. Leer la absorbancia del tubo 2 a las mismas condiciones indicadas en el punto anterior.
4. Agregar al tubo 3, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos, agitar y colocar una capa delgada de aceite vegetal y exponer el tubo a la luz solar durante 30 minutos. Enseguida leer, en el espectrofotómetro, la absorbancia. Exponerlo nuevamente a la luz solar por 30 minutos y leer absorbancia. Analizar la intensidad de color.
5. Agregar al tubo 4, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos, agitar, colocar una capa de aceite vegetal y exponer durante 30 minutos a luz roja. Transcurridos los 30 minutos leer la absorbancia.
6. Agregar al tubo 5, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos, agitar, colocar una capa de aceite vegetal y exponer durante 30 minutos a luz azul. Transcurridos los 30 minutos leer la absorbancia.
7. Agregar al tubo 6, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos, agitar, colocar una capa de aceite vegetal y exponer durante 30 minutos a luz verde. Transcurridos los 30 minutos leer la absorbancia.
8. Añadir al tubo 7, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos previamente hervidos, durante 5 minutos. Exponer el tubo a la luz solar durante 30 minutos. Leer la absorbancia.
9. Añadir al tubo 8, 0.5 mL de la suspensión de cloroplastos, cúbralo con papel aluminio durante 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos leer la absorbancia.

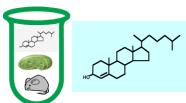


## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Tubo No.	Absorbancia	Observaciones
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

\* Para el análisis, debe considerar las siguientes preguntas como guía, sin embargo recuerde que no debe incluirlo como cuestionario en el reporte:

1. ¿La capacidad reductora de los cloroplastos es dependiente de la luz?
2. ¿En qué medida influye la longitud de onda (color de la luz) sobre la capacidad reductora de la suspensión de cloroplastos?
3. ¿Cómo afecta la oscuridad sobre la capacidad reductora de la suspensión de cloroplastos?

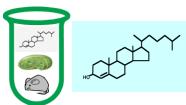


## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Dennis B., Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J. (2000). *Biología Molecular de la Célula*. (4a) Editorial Omega Barcelona, España.
2. Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2000). *Principios de Bioquímica de Lehninger*. (3a) Omega Barcelona, España.
3. Barón, M., Chueca, A. y Lopez, J. (1986). Inhibición de la fotosíntesis por herbicidas. *Investigación y Ciencia*, 175, 10-17.
4. Coleman, G., Coleman, M.I. (1990). How plants make oxygen. *Scientific American*, 262 (2), 50-8.
5. Hill, R. (1937). Oxygen evolved by isolated chloroplasts. *Nature* 139, 881.
6. Stryer, L. (1996). *Bioquímica*. (4a) De Reverté Barcelona, España.
7. Youvan, D. Y Marrs, B. (1988). Mecanismo molecular de la fotosíntesis. *Investigación y Ciencia*, 179, 34-41



## PRÁCTICA 6

# CUANTIFICACIÓN DE CREATININA EN SUERO SANGUÍNEO

### OBJETIVO

Cuantificar la concentración de creatinina, en una muestra de suero sanguíneo, mediante el método colorimétrico de Jaffé, con el fin de hacer una comparación con los valores de referencia reportados en la literatura.

### CUESTIONARIO PREVIO

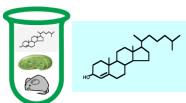
1. Investigar la forma correcta de obtener una muestra sanguínea y el tratamiento a seguir para obtener el suero sin provocar hemólisis.
2. ¿Qué es la creatinina y cuáles son sus propiedades?
3. ¿Cuál es la importancia metabólica de la creatinina?
4. ¿Cuáles son los niveles normales de creatinina en sangre de acuerdo con la edad?
5. Investigue el fundamento de la técnica de cuantificación de creatinina que se utilizará en el laboratorio.
6. ¿Qué enfermedades están ligadas a los niveles anómalos de creatinina en sangre?

### INTRODUCCIÓN

La creatina es una sustancia producida en la degradación metabólica de los aminoácidos glicina, arginina y metionina, principalmente en el hígado, los riñones y el páncreas; de allí es transportada en el torrente sanguíneo a todas las células del cuerpo. Ya que la creatina participa en todos los procesos que requieren energía, las células musculares, cerebrales y nerviosas contienen mucha creatina.

La creatinina es un producto final del metabolismo muscular, se origina a partir de la creatina por pérdida de una molécula de agua. A su vez, la creatina se produce por hidrólisis del fosfato de creatina, por acción de la creatin-fosfokinasa (CPK), apareciendo como metabolitos de dicha reacción el fosfato energético y la creatina. El radical fosfato puede aportar energía directamente por dicha reacción a través de su acoplamiento a una molécula de ADP para formar ATP y posterior hidrólisis por acción de ATPasa.

A diferencia de la urea, la eliminación de creatinina por la orina no viene afectada por la diuresis, al mismo tiempo que para una persona es muy constante su eliminación diaria casi independientemente de la dieta alimenticia, siendo la masa muscular el factor condicionante más directo de su excreción total por día.



Jaffé describió un método en 1886 para la determinación de creatinina el cual envolvía una proteína libre filtrada y una reacción con ácido pírico en una solución alcalina. Aunque desde entonces se han descrito varios métodos, el método clásico de reacción de Jaffé sigue siendo el más utilizado.

La creatinina reacciona con el ácido pícrico en condiciones alcalinas para formar un complejo de color amarillo – anaranjado, el cual absorbe a 510 nm. La reacción química de Jaffé no es específica para la creatinina. También reacciona principalmente con las proteínas, bilirrubina y hemoglobina. Es por esta razón que la muestra debe ser desproteínezada.

## MATERIAL Y REACTIVOS

## **MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS**

Lentes de seguridad	Material para toma de muestra sanguínea
Equipo vacutainer®	Tubo vacutainer® de tapón amarillo o rojo
Papel aluminio	

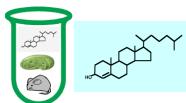
## MATERIAL POR EQUIPO

## MATERIAL POR GRUPO

5 tubos de ensaye 16 x 150mm	5 centrífugas
1 pipeta Pasteur	5 balanzas granatarias de dos platos
2 propipetas	5 espectrofotómetros
1 piseta	4 celdas de cuarzo
1 gradilla	2 propipetas
1 vaso de precipitado de 250 mL	3 vasos de precipitados 50mL
	2 vasos de precipitados 100mL
	1 vasos de precipitados 250mL
	2 pipeta graduada 5mL
	5 goteros de plástico
	2 pipeta graduada 5mL
	2 micropipeta 20-200mL
	2 micropipeta 10-100 $\mu$ L
	2 micropipeta 100-1000 $\mu$ L
	1 frasco p/residuos 100L
	1 galón de H <sub>2</sub> O destilada
	10 vasos de precipitado de plástico

## REACTIVOS

Kit de creatinina Spinreact®	10mL solución de creatinina estándar 2 mg/L
------------------------------	--



## METODOLOGÍA

### I. TOMA DE MUESTRA

Se debe considerar un ayuno no mayor de 8 hrs. previo a la toma de muestra.

### II. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Para evitar que se produzca hemólisis, se quita la aguja de la jeringa y se vacía la sangre lentamente a un tubo perfectamente limpio y seco. Es muy importante que el contenido de la jeringa no se vacíe a través de la aguja, ni se empuje mucho el émbolo y que no se forme espuma. Para obtener el suero, el tubo se somete a centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, se saca el tubo, el suero es el sobrenadante y debe ser de un color amarillo pálido, libre de coloración roja.
2. Preparar las muestras con base en la información del inserto Spinreact®.
3. Leer la absorbancia de la muestra, en 492nm, a los 30 (AM1) y 60 segundos (AM2). Calcular  $AM = (AM2 - AM1)$
4. Cuantificar con ayuda de la fórmula.

## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

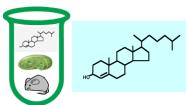
### CUADRO A. Medidas de absorbancias

Muestra	Absorbancia (P)	Absorbancia (M)
Problema 1		
Problema 2		

## CUANTIFICACIÓN

Para cuantificar la creatinina presente en el suero se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Creatinina} \left( \frac{mg}{dL} \right) = \frac{A_M}{A_p} \times 2 \text{ (Conc. patrón)}$$



SPINREACT



CREATININE -J

Creatinina

Jaffé. Colorimétrico - cinético

**Determinación cuantitativa de creatinina**  
IVD

Conservar a 2-8°C

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

El ensayo de la creatinina esta basado en la reacción de la creatinina con el pícrato alcalino descrito por Jaffé.

La creatinina reacciona con el pícrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada<sup>1</sup>.**SIGNIFICADO CLÍNICO**

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células.

La producción de creatinina depende de la modificación de la masa muscular. Varía poco y los niveles suelen ser muy estables.

Se elimina a través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico.

Niveles altos de creatinina son indicativos de patología renal<sup>1,4,5</sup>.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

**REACTIVOS**

<b>R 1</b> Reactivos Pícrico	Ácido pícrico	17,5 mmol/L
<b>R 2</b> Reactivos Alcalinizante	Hidróxido sódico	0,29 mol/L
<b>CREATININE CAL</b>	Patrón primario acuoso de Creatinina	2 mg/dL

**PRECAUCIONES**

Hidróxido sódico: Irritante (Xi): R36/38: Irrita ojos y la piel. S26: En caso de contacto con los ojos, lavar de inmediato con abundante agua y acudir al médico. S37/39: Usar guantes adecuados y proteger cara y ojos. S45: En caso de accidente o malestar, acudir inmediatamente al médico.

**PREPARACIÓN**

Reactivos de trabajo (RT): Mezclar volúmenes iguales de R 1 Reactivo Pícrico y de R 2 Reactivo Alcalinizante.

Estabilidad del reactivo de trabajo: 10 días a 15-25°C.

**CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

**CREATININE CAL**

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

**Indicadores de deterioro de los reactivos:**

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 492 nm  $\geq 1,80$ .

**MATERIAL ADICIONAL**

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 492 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

**MUESTRAS**

- Suero o plasma heparinizado<sup>1</sup>.

Estabilidad de la creatinina: al menos 24 horas a 2-8°C.

- Orina<sup>2</sup>: Diluir la muestra al 1/50 con agua destilada. Mezclar. Multiplicar el resultado obtenido por 50 (factor de dilución)

Estabilidad de la creatinina: 7 días a 2-8°C.

**PROCEDIMIENTO**

1. Condiciones del ensayo:  
Longitud de onda: ..... 492 nm (490-510)  
Cubeta: ..... 1 cm paso de luz  
Temperatura: ..... 37°C / 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente al blanco de reactivo.

## 3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón <sup>(Nota 1,2)</sup> (μL)	--	100	--
Muestra (μL)	--	--	100

4. Mezclar y poner en marcha el cronómetro.

5. Leer la absorbancia ( $A_1$ ) al cabo de 30 segundos y al cabo de 90 segundos ( $A_2$ ) de la adición de la muestra.

6. Calcular:  $\Delta A = A_2 - A_1$ .

**CÁLCULOS**

$$\frac{\Delta A \text{ Muestra}}{\Delta A \text{ Patrón}} \times 2 \text{ (Conc. Patrón)} = \text{mg/dL de creatinina en la muestra}$$

**Factor de conversión:** mg/dL  $\times 88,4 = \mu\text{mol/L}$ **CONTROL DE CALIDAD**

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

**VALORES DE REFERENCIA<sup>1</sup>**

Suero o plasma:

Hombres 0,7 - 1,4 mg/dL 61,8 - 123,7 μmol/L

Mujeres 0,6 - 1,1 mg/dL 53,0 - 97,2 μmol/L

Orina: 15-25 mg/Kg/24 h

Hombres 10 - 20 mg/Kg/24 h 88 - 177 μmol/Kg/24 h

Mujeres 8 - 18 mg/Kg/24 h 71 - 177 μmol/Kg/24 h

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO****Rango de medida:** Desde el límite de detección de 0,09 mg/dL hasta el límite de linealidad de 15 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

**Precisión:**

	Intraserie (n=20)	Interserie (n=20)
Media (mg/dL)	1,06	3,58
SD	0,22	0,06
CV (%)	2,07	1,54

**Sensibilidad analítica:** 1 mg/dL =  $\Delta A$  0,03 A/min . mg/dL.**Exactitud:** Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coeficiente de correlación (r): 0,986

Ecuación de la recta de regresión:  $y = 0,975x + 0,047$ 

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

**INTERFERENCIAS**Hemoglobina (1 g/L), Bilirrubina (55 mg/dL), interfiere<sup>1</sup>.Se han descrito varias drogas y otras substancias que interfieren en la determinación de la creatinina<sup>2,3</sup>.**NOTAS**

1. La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.

2. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.

3. SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

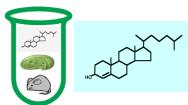
**BIBLIOGRAFÍA**

1. Murray R.L. Creatinine. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 and 418.
2. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
3. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
4. Burlis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
5. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

**PRESENTACIÓN**

Ref: 1001111	2 x 150 mL
Ref: 1001113	4 x 150 mL



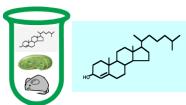


## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento qué tipo de residuos son, quién los generó y en qué práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ganong, F. (2002). "Fisiología Médica". (18<sup>a</sup> ed.) D.F., México: El Manual Moderno.
2. Viniegra, P. (1994). "Manual de Química Clínica". Estado de México, México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
3. Karp, G. (2010). "Biología celular y molecular". (6<sup>a</sup> ed.) D.F., México: Mc Graw Hill.
4. Murray, K., Granner, K., Mayes, A. y Rodwell, W. (2001). "Bioquímica de Harper". (15<sup>a</sup> ed.) D.F., México: El Manual Moderno.



## PRÁCTICA 7

# CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL y BILIRRUBINA

### OBJETIVOS

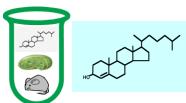
1. Realizar la toma correcta de muestras sanguíneas, practicando la punción en la fosa antecubital para la obtención de suero.
2. Realizar la cuantificación de colesterol y bilirrubina en el suero sanguíneo, a través de un método colorimétrico, para corroborar si se obtienen valores óptimos con base en los rangos de referencia.
3. Conocer los niveles normales de colesterol sanguíneo, con base en los rangos de referencia, para reconocer la importancia metabólica y fisiológica de este esteroide.
4. Determinar la presencia de bilirrubina en muestras de suero sanguíneo a través de tres pruebas cualitativas (Fouchet y reacción de Smith) para comprobar que realmente está presente en las muestras.
5. Medir la absorbancia de las muestras de suero sanguíneo utilizando el método de Malloy-Evelyn con el fin de cuantificar la cantidad de bilirrubina presente.

### CUESTIONARIO PREVIO

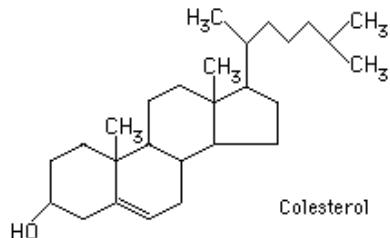
1. ¿Qué es el colesterol?, ¿cuál es su estructura?, ¿cuáles son sus propiedades?
2. ¿Cuál es la importancia bioquímica del colesterol?
3. Haga un diagrama general de la ruta de síntesis del colesterol. Indique fórmulas, nombre de intermediarios y enzimas participantes.
4. ¿Cuáles son los niveles normales de colesterol en sangre de acuerdo con la edad?
5. ¿Cuál es la forma correcta de tomar una muestra sanguínea?
6. ¿Qué tratamiento se debe hacer a una muestra sanguínea para obtener el suero?
7. Investigue el fundamento de la técnica de determinación de colesterol que se va a utilizar en el laboratorio.
8. ¿Qué enfermedades están ligadas a los niveles de colesterol en sangre?
9. ¿Cuál es la importancia del metabolismo de bilirrubina?
10. ¿Cuáles son los niveles normales de bilirrubina en sangre de acuerdo con la edad?
11. Investigue el fundamento de las técnicas de identificación y cuantificación de bilirrubina que se utilizarán en el laboratorio.
12. ¿Qué enfermedades están ligadas a los niveles anormales de bilirrubina en sangre?

### INTRODUCCIÓN

El colesterol es un compuesto alicíclico, se clasifica como lípido y pertenece al grupo de los esteroides. Tiene como estructura básica al ciclopentano perhidrofenantreno, presenta



además dos grupos metilo, un OH, una doble ligadura y una cadena lateral en el carbono 17. Es un compuesto importante para las células del organismo y componente esencial de los líquidos que constituyen los tejidos; sólo alrededor del 30 % del colesterol circulante en sangre se presenta en forma libre el resto se encuentra en forma de ésteres del colesterol.



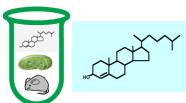
En relación a sus propiedades físicas, es un lípido poco soluble en agua (a 25°C el límite de su solubilidad es 0.2 mg/100 mL). La alta “solubilidad” del colesterol en sangre se debe a la presencia de lipoproteínas plasmáticas que tienen la capacidad de fijar y solubilizar grandes cantidades de colesterol por asociación de lípidos y proteínas. Sus propiedades como alcohol dependen del grupo OH; la cadena lateral de hidrocarburo unida al átomo de carbono 17 le da las características de lípido, como son solubilidad en éter, cloroformo, etc.

El colesterol tiene una gran importancia desde el punto de vista bioquímico, ya que es el precursor de otros esteroides entre los que se encuentran ácidos biliares, hormonas corticosuprarrenales, hormonas sexuales, vitamina D, glucósidos cardíacos y algunos alcaloides. Además es un componente muy importante de las membranas celulares, su presencia modifica la fluididad de la membrana ya que le confiere rigidez debido a su estructura policíclica. Está ampliamente distribuido en todas las células del organismo, pero en particular en el sistema nervioso.

Es sintetizado en numerosos tejidos a partir de acetil CoA y finalmente eliminado del cuerpo en la bilis, como colesterol o como sales biliares. Es un producto típico del metabolismo animal, por lo cual existe en los alimentos de este origen, como la yema de huevo, carne, hígado y cerebro.

Los niveles de colesterol en sangre están relacionados con la edad, el sexo, el peso, la dieta y el ejercicio. Es muy importante mantener el colesterol dentro de ciertos límites porque un exceso de esta sustancia puede provocar problemas cardiovasculares.

Las técnicas tradicionales de determinación de colesterol se basan en la reacción de Liebermann Buchard. El colesterol y algunos otros esteroides en una mezcla ácida, compuesta de ácido sulfúrico, anhídrido acético, ácido acético y sulfato de sodio producen un complejo de ácido 3,3 biscolesta 3,5 dienil sulfónico (amarillo) y el ácido 3-3 biscolesta 2,4 dienilsulfónico (azul), este complejo colorido de color verde, se cuantifica a 610 nm de longitud de onda.



El colesterol es atacado por reactivos muy ácidos, estos reactivos eliminan del colesterol una molécula de agua, para después oxidar al intermediario y formar el 3,5 colestadieno, este a su vez es atacado para formar el bis-3,5 colestadieno y con la adición de ácido sulfúrico se obtiene el ácido bis-colestadienilmonosulfónico (color verde) o ácido bis-colestadienildisulfónico (color rojo).

También se puede considerar el método enzimático, como se indica en el inserto del kit de colesterol spinreact ®.

La bilirrubina es un compuesto muy colorido producto de la degradación de la hemoglobina. En condiciones normales, la vida de los eritrocitos es de alrededor de 120 días, momento en el cual las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial del bazo y el hígado los destruyen. La hemoglobina liberada es degradada en sus componentes, uno de ellos es la protoporfirina. Las células del sistema reticuloendotelial convierten la protoporfirina en bilirrubina. Ésta luego se libera en la circulación, donde se une con la albúmina y es transportada al hígado. En el hígado, la bilirrubina se conjuga con ácido glucurónico por acción de la enzima glucuroniltransferasa para formar el diglucurónido de bilirrubina hidrosoluble (bilirrubina conjugada o directa).

La hepatitis y la cirrosis son ejemplos comunes de enfermedades que producen daño hepático y dan como resultado la aparición de bilirrubina.

El desarrollo de los métodos para la detección de bilirrubina se inició en 1883, cuando Ehrlrich descubrió que la bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico y forma un compuesto colorido al que llamó azobilirrubina.

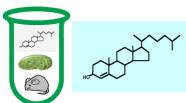
La bilirrubina conjugada, muy polar, reacciona en medio acuoso con el reactivo de diazotación, por lo que se le llamó directa, pues al poner en contacto el suero y el reactivo aparecía directamente el color. Sin embargo, la bilirrubina libre, poco polar, no da directamente la reacción y es preciso añadir un tercer reactivo que inicialmente fue el metanol para que produzca la reacción de diazotación con la consiguiente aparición del color, por este motivo se llamó bilirrubina indirecta.

### Reacción con tira reactiva

La bilirrubina se combina con la sal de diazonio 2,4-dicloroanilina o 2,6-diclorobenceno-diazonio-tetrafluoroborato en medio ácido para producir un colorante azoico, con colores que varían desde grados crecientes de beige a café. Los resultados cualitativos se informan como negativo (beige), escaso (beige fuerte), moderado (café claro) o abundante (café), o bien como negativo, +1, +2 ó +3.

### Prueba de Fouchet

Se añade al suero solución de cloruro de bario. Se produce un precipitado de sulfato de bario que absorbe la bilirrubina. La bilirrubina absorbida sobre el sulfato de bario se



separa y reacciona con una solución de cloruro férrico de Fouchet. El cloruro férrico oxida la bilirrubina a biliverdina y se produce una coloración azul-verdosa.

### Reacción de Yodo de Smith

Se basa en la reacción colorimétrica del yodo con la bilirrubina convirtiendo a ésta en biliverdina y bilicianina. Se añade al suero una solución de yodo, la presencia de bilirrubina se observa a través de la formación de un anillo color verde esmeralda en la interfase de ambos líquidos.

### Método de cuantificación

Se basa en la reacción de Malloy-Evelyn, que valora bilirrubina colorimétricamente por la formación de azobilirrubina, de color rosa a violeta, cuando a la bilirrubina se le hace reaccionar en determinadas condiciones con el ácido sulfanílico diazotado. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de bilirrubina en la muestra.

## MATERIAL Y REACTIVOS

### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

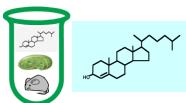
Lentes de seguridad	Material para toma de muestra sanguínea
Equipo vacutainer ®	Tubo vacutainer® de tapón amarillo o rojo
Papel aluminio	Torundas con etanol

### MATERIAL POR EQUIPO

11 tubos de ensaye medianos 16 x 150mm
1 vaso de precipitados de 250 mL
1 vaso de precipitados de 50 mL
2 pipeta graduada de 5 mL
1 pipeta graduada de 1 mL
1 pipeta pasteur
2 propipetas
1 piseta
2 gradilla
1 embudo de vidrio
1 soporte universal
1 triángulo de porcelana
1 aro metálico universal

### MATERIAL POR GRUPO

4 celdas para espectrofotómetro de cuarzo
20 celdas para espectrofotómetro de plástico
5 espectrofotómetros
5 centrifugas
5 balanzas granataria de dos platos
10 vasos de precipitado de plástico
1 pipeta graduada de 1mL
1 pipeta graduada de 5mL
4 pipetas graduadas de 2mL
2 vasos de precipitado de 250mL
2 vasos de precipitado de 100mL
7 vaso de precipitado de 50mL
1 pipeta pasteur
7 propipetas
2 micropipetas 1-10 $\mu$ L
2 micropipetas 10-100 $\mu$ L



2 micropipetas 100-1000 $\mu$ L
2 micropipetas 20-200 $\mu$ L
1 galón agua destilada
5 goteros de plástico
2 frascos para residuos de 1L

## REACTIVOS

10 mL de Reactivo de Fouchet	100 mL de Cloruro de bario 10%
50 mL Reactivo de Smith	100 mL NaCl (9 g/L)
1 pliego de papel filtro	1 kit colesterol Spinreact®
	1 kit bilirrubina Spinreact®

---

## METODOLOGÍA

### I. TOMA DE MUESTRA.

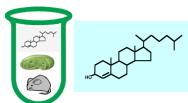
Se debe considerar un ayuno no mayor de 8 hrs. previo a la toma de muestra.

### II. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Para evitar que se produzca hemólisis, se quita la aguja de la jeringa y se vacía la sangre lentamente a un tubo perfectamente limpio y seco. Es muy importante que el contenido de la jeringa no se vacíe a través de la aguja, ni se empuje mucho el émbolo y que no se forme espuma. El tubo se somete a centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, se saca el tubo, el suero es el sobrenadante y debe ser de un color amarillo pálido, libre de coloración roja.

### III. CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL

1. Se utilizará el método enzimático para determinación de colesterol en suero
2. Por grupo, preparar 2 tubos blanco (B) y 2 tubos patrón (P), al mismo tiempo
3. Por equipo, prepare en un tubo la muestra (M)
4. Siga cuidadosamente el orden de adición indicado en el inserto del kit de colesterol Spinreact ®
5. Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C
6. Leer la absorbancia (A) del patrón (P) y la muestra (M), frente al blanco (B) de reactivo a 505 nm
7. El color es estable 60 minutos



8. Determine la concentración de la muestra problema con ayuda de la fórmula indicada en los cálculos del inserto. Anote sus resultados en el cuadro A
9. Compare sus resultados con los datos de concentración normal que investigó y concluya para la realización de su reporte

#### IV. PRUEBA DE FOUCHE

1. En un tubo de ensaye coloque 5 mL de una de las muestra problema y añada 5 mL de la solución de cloruro de bario 10%
2. Mezcle y filtre dicha mezcla. Colocar el papel filtro extendido
3. Añada al precipitado unas gotas del reactivo de Fouchet. Si existe bilirrubina presente aparecerá un color verde o azul verdoso
4. Repita el procedimiento anterior con la otra muestra problema
5. Anote los resultados en el cuadro B

#### V. PRUEBA DE YODO DE SMITH.

1. En un tubo de ensaye coloque 5 mL de muestra problema
2. Adicione lentamente por las paredes del tubo 2 mL de reactivo de yodo de Smith
3. La formación de un anillo color verde esmeralda en la interfase de ambos líquidos da positivo a la presencia de bilirrubina
4. Repita el procedimiento con las demás muestras
5. Registre los resultados en la columna correspondiente del cuadro B

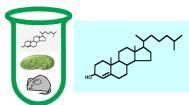
#### VI. CUANTIFICACIÓN DE BILIRRUBINA.

1. Se utilizará la metodología indicada en el inserto de bilirrubina T & D Spinreact ®.
2. Por grupo, preparar tubos blanco (B).
3. Preparar las muestras con base en la información del inserto Spinreact®.
4. Leer la absorbancia del blanco, calibrador y muestra a 555 nm
5. Registre los datos en el cuadro C.

### RESULTADOS

#### CUADRO A. Cuantificación de Colesterol

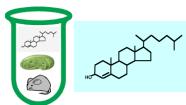
Muestra	Patrón (P)	Muestra (M)
Absorbancia		
[mg/dL] de colesterol		

**CUADRO B. Resultados de observaciones de pruebas cualitativas**

Muestra	Prueba de Fouchet	Prueba de Smith
Problema 1		
Problema 2		

**CUADRO C. Medidas de absorbancia**

Muestra	Blanco Calibrador	Blanco Muestra	Calibrador	Muestra
Bilirrubina directa				
Bilirrubina total				



## CÁLCULOS PARA COLESTEROL Y BILIRRUBINA (inserto spinreact ®)



CHOLESTEROL -LQ

Colesterol

CHOD-POD. Líquido

Determinación cuantitativa de colesterol  
IVD

Conservar a 2-8°C

## PRINCIPIO DEL MÉTODO

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada<sup>1,2</sup>.

## SIGNIFICADO CLÍNICO

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular<sup>3,4</sup>.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

## REACTIVOS

R	PIPER pH 6.9 Fenol Colesterol esterasa (CHE) Colesterol oxidasa (CHOD) Peroxidasa (POD) 4 - Aminofenazona (4-AF)	90 mmol/L 26 mmol/L 1000 U/L 300 U/L 650 U/L 0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Patrón primario acuoso de Colesterol	

## PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

## Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias (A) del Blanco a 505 nm > 0,26.

## MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

## MUESTRAS

Suero o plasma<sup>1,2</sup>. Estabilidad de la muestra 7 días a 2-8°C y 3 meses si se mantiene la muestra congelada (-20°C).

## PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:  
Longitud de onda: ..... 505 nm (500-550).  
Cubeta: ..... 1 cm paso de luz  
Temperatura ..... 37°C/15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta:  

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón <sup>(Nob1-2)</sup> (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10
4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C.
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

## CÁLCULOS

$$\frac{(\text{A})\text{Muestra}}{(\text{A})\text{Patrón}} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0258= mmol/L

## CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

## VALORES DE REFERENCIA

Evaluación del riesgo<sup>5,6</sup>.

Menos de 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Moderado
240 o más	Alto

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

## CARÁCTERISTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,113 mg/dL hasta el límite de linealidad 750 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

## Precisión:

Media (mg/dL)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	99.789	185.309	96.346	184.962
SD (mg/dL)	1.213	1.405	4.196	12.773
CV (%)	1.216	0.758	4.355	6.906

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0015 (A).

Exactitud: Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coeficiente de correlación (r): 0,9968.

Ecuación de la recta de regresión:  $y = 0.9797x + 2.2603$ .

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

## INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias de hemoglobina hasta 5 g/L y bilirrubina hasta 10 mg/dL<sup>1,2</sup>. Se han descrito varias drogas y otras substancias que interfieren en la determinación del Colesterol<sup>3,4</sup>.

## NOTAS

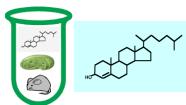
1. CHOLESTEROL CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
2. LCF (Lipid Clearing Factor) está integrado en el reactivo.
3. La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
4. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
5. **SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nishio H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. *Clin. Chem. The C.V. Mosby Co. St. Louis*. Toronto, Princeton 1984: 1194-11205 and 437.
2. Meistini F. et al. The 4-hydroxycholesterol/4-aminophenazona Chromogenic System. *Clin. Chem.* 1978; 24 (12): 2161-2165.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed AACC 1995.

## PRESENTACIÓN

Ref. 41020	2 x 50 mL
Ref. 41022	2 x 100 mL
Ref. 41021	2 x 250 mL
Ref. 41019	1 x 1000 mL



BILIRUBIN T&amp;D

Bilirrubina T & D  
DMSO. Colorimétrico**Determinación cuantitativa de bilirrubina**  
IVD

Conservar a 2-8°C

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada.<sup>1,2</sup>

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. Es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia: Bilirrubina Total (T): Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina Directa (D): Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas<sup>3</sup>. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

**REACTIVOS**

R 1 (D)	Ácido sulfanílico Ácido clorhídrico (CIH)	30 mmol/L 150 mmol/L
R 2 (T)	Ácido sulfanílico Ácido clorhídrico (CIH) Dimetilsulfóxido (DMSO)	30 mmol/L 50 mmol/L 7 mol/L
R 3	Sodio nitrito	29 mmol/L
Opcional	BILIRRUBIN CAL <sup>(Nota 3)</sup>	Ref: 1002250

**PRECAUCIONES**

R1/R2: H290-Puede ser corrosivo para los metales. H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. EUH208-Contiene ácido sulfanílico. Puede provocar una reacción alérgica. Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

**PREPARACIÓN**

Todos los reactivos están listos para su uso.

**CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

**Indicadores de deterioro de los reactivos:**

- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R 2.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 555 nm.
- Cubetas de 1.0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

**MUESTRAS**

Suero o plasma libre de hemólisis (separado lo antes posible de los hematies). Proteger de la luz.

Estabilidad de la muestra separada ya de los hematies: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

**PROCEDIMIENTO**

1. Condiciones del ensayo:  
Longitud de onda:..... 555 nm (530-580)  
Cubeta:..... 1 cm paso de luz  
Temperatura:..... 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetar en una cubeta: <sup>(Nota 2)</sup>

	Blanco	B. Total	Blanco	B. Directa
R 1 (D) (mL)	--	--	1,5	1,5
R 2 (T) (mL)	1,5	1,5	--	--
R 3 (μL)	--	50	--	50
Muestra <sup>(Nota 1)</sup> /Calibrador (μL)	100	100	100	100

4. Mezclar e incubar exactamente 5 minutos a 15-25°C.
5. Leer la absorbancia (A).

**CÁLCULOS****- Con Calibrador:**

$$\frac{(A) Muestra - (A) Blanco Muestra}{(A) Calibrador - (A) Blanco Calibrador} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

**- Con Factor:**

$$(A) Muestra - (A) Blanco Muestra \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$$

**\*Factor:** Concentración del Calibrador

$$(A) Calibrador - (A) Blanco Calibrador$$

**Factor de conversión:** mg/dL x 17,1 = μmol/L**CONTROL DE CALIDAD**

Es conveniente ensayar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

**VALORES DE REFERENCIA<sup>1</sup>**

Bilirrubina Total en adultos Hasta 1,10 mg/dL ≈ 18,81 μmol/L

Bilirrubina Total en recién nacidos &lt;12 mg/dL ≈ &lt;205,2 μmol/L

Bilirrubina Directa Hasta 0,25 mg/dL ≈ 4,27 μmol/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO**

Rango de medida: Desde el límite de detección de (T) 0,00526 mg/dL (D) 0,07 mg/dL hasta el límite de linealidad de 18 mg/dL (T) y 20 mg/dL (D).

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

**Precisión:**

Bilirrubina T	Intraserie (n= 20)	Interserie (n= 20)
Media (mg/dL)	1,53	5,06
SD	0,03	0,05
CV (%)	1,73	1,01
Bilirrubina D	Intraserie (n= 20)	Interserie (n= 20)
Media (mg/dL)	0,96	2,48
SD	0,024	0,051
CV (%)	2,52	2,06

**Sensibilidad analítica:** 1 mg/dL = 0,05074 A (T).

1 mg/dL = 0,06856 A (D).

**Exactitud:** Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras para Bilirrubina D fueron los siguientes:

Coeficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 0,96

Ecuación de la recta de regresión: y=0,71177x - 0,05267

Los resultados obtenidos con 50 muestras para Bilirrubina T fueron los siguientes:

Coeficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 0,991

Ecuación de la recta de regresión: y=0,82743x - 0,0382

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

**INTERFERENCIAS**La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina<sup>1,2</sup>.Se han descrito varias drogas y otras substancias que interfieren con la determinación de bilirrubina<sup>3,4</sup>.**NOTAS**

1. Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetar 50 μL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
2. Uso de pipeta desechable para la dispensación.
3. Sólo para ser utilizado en la bilirrubina total.
4. **SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 and 650.
2. Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2; 481-491.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

**PRESENTACIÓN**

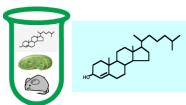
Ref. 1001044

Cont.

R 1 (D): 1 x 150 mL

R 2 (T): 1 x 150 mL

R 3: 1 x 10 mL



\* Para el análisis, debe considerar las siguientes preguntas como guía, sin embargo recuerde que no debe incluirlo como cuestionario en el reporte:

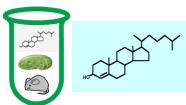
1. Con base en las reacciones de determinación, ¿qué tipo de reacción se llevó a cabo?
2. ¿Son congruentes sus resultados con la edad y género del donador de la muestra?
3. Si los valores están fuera del rango, ¿qué alteración metabólica pudiera estar presente?
4. ¿Cuáles son las recomendaciones para modificar la concentración anormal de este analito?

## MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos producidos en esta práctica serán manejados de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el apartado correspondiente de este manual: los ácidos o básicos se neutralizan y se eliminan en las tarjas con suficiente agua; los solventes y mezclas de reactivos se guardarán en frascos perfectamente etiquetados que permita conocer en todo momento que tipo de residuos son, quién los generó y en que práctica. Se debe ubicar los frascos contenedores de los residuos correspondientes a las reacciones desarrolladas y productos de reacción obtenidos. Los desechos sólidos orgánicos se colocan en bolsas y se depositan en los cestos de basura fuera del laboratorio. Si tiene dudas consulte a su asesor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Huang, T.C.C.P., Chem V., Wefrer and A. Raftery. (1961). A stable reagent for the Liebermann-Buchard reaction application to rapie serum cholesterol determination. *Analytical chem*, 33: 1405.
2. Murray, K. R., Granner, K.D., Mayes, A.P., Rodwell, W.V. (2001). *Bioquímica de Harper*. (15a) Manual Moderno México.
3. Stryer, L. (1996). *Bioquímica*. (4a) De Reverté Barcelona, España.
4. Wiener lab. (2000). *Bilirrubina. Método colorimétrico para la determinación de bilirrubina directa y total en suero*. Argentina.
5. Ganong, F. (2002). *Fisiología Médica*. (18a) Manual Moderno México.
6. Wein, K. (2008). *Campbell-Walash: Urología*. (9a) Editorial médica panamericana México.
7. Fischbach, T. (1997). *Manual de procesos diagnósticos*. (2a) Mc-GrawHill México.
8. Lynch, J. (1997). *Métodos de laboratorio*. (2<sup>a</sup>) México: Editorial interamericana.
9. Graff, L. (2007). "Análisis de orina". (2<sup>a</sup> ed.) Editorial médica panamericana México.



## PRÁCTICA 8

### CUANTIFICACIÓN DE UROBILINÓGENO EN ORINA

#### OBJETIVO

Cuantificar la concentración de urobilinógeno en una muestra de orina mediante el método colorimétrico de Ehrlich con el fin de compararlo con los valores de referencia reportados en la literatura.

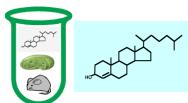
#### CUESTIONARIO PREVIO

1. ¿Cuál es la vía metabólica de formación de urobilinógeno?
2. ¿Cuál es la función del urobilinógeno?
3. ¿Cuáles son los niveles normales de urobilinógeno en orina de acuerdo con la edad?,,
4. Investigue el fundamento de las técnicas de identificación y cuantificación de urobilinógeno que se utilizará en el laboratorio.
5. ¿Qué enfermedades están ligadas a los niveles de urobilinógeno en orina?

#### INTRODUCCIÓN

La bilirrubina se forma a partir de la degradación de la hemoglobina en el sistema reticuloendotelial; unida a la albúmina, es transportada por la sangre hasta el hígado. En el intestino, las enzimas bacterianas convierten la bilirrubina, pasando por un grupo de compuestos intermedios, en diversos compuestos relacionados que se denominan en forma colectiva "urobilinógeno". La mayor parte del urobilinógeno (pigmento incoloro) y su variante oxidada, la urobilina (pigmento marrón), se pierde con las heces. Aproximadamente el 10 al 15 % del urobilinógeno es reabsorbido, pasa al torrente sanguíneo, retorna al hígado y es re-excretado hacia el intestino. Una pequeña cantidad de este urobilinógeno se excreta también por los riñones, y a diferencia de la bilirrubina, existe urobilinógeno en la orina en un nivel normal de aproximadamente 1-4 mg/24h.

Se pueden presentar resultados falsos negativos cuando el paciente recibe antibióticos, cuando hay suspensión de la producción de bilis en el hígado por ejemplo en hepatitis viral severa o cuando hay una obstrucción de los conductos biliares, debido a que en este caso la bilirrubina no pasaría al tracto digestivo. También se presentan resultados falsos negativos cuando la muestra se procesa más allá del tiempo óptimo, debido a que el urobilinógeno se oxida convirtiéndose en urobilina cuando la orina es expuesta a la luz y al aire.



El urobilinógeno en orina es estable durante 8 horas a temperatura ambiente protegido de la luz y aire y 5 días a 2-8 °C.

El pico de la excreción de urobilinógeno se produce entre las 14 y 16 horas, de modo que es aconsejable recolectar la orina en ese momento del día.

El urobilinógeno reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehído en un medio fuertemente ácido, produciendo una coloración rojo cereza, el cual absorbe a 500 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de urobilinógeno presente en la muestra.

La reacción química de Ehrlich no es específica para el urobilinógeno, con este método también se detecta porfobilinógeno. Al agregar una solución saturada de acetato de sodio produce la intensificación del color si éste se debe a la presencia de urobilinógeno, pero el color no se modifica si se debe a porfobilinógeno.

## MATERIAL Y REACTIVOS

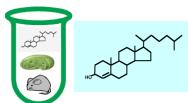
### MATERIAL QUE DEBEN PROPORCIONAR LOS ALUMNOS

Lentes de seguridad	Muestra de orina
Papel aluminio	

### MATERIAL POR EQUIPO

### MATERIAL POR GRUPO

1 vaso de precipitados de 100 mL	5 espectrofotómetros
4 tubos de ensaye 16 x 150mm	5 centrifugas
4 tubos para centrífuga	5 balanzas granataria de dos platos
1 pipeta graduada 2 mL	2 pipetas graduadas 1mL
2 pipeta graduada de 5 mL	1 pipeta graduada 2mL
1 pipeta pasteur	1 pipeta graduada 5mL
2 propipeta	2 pipeta graduada 10mL
1 piseta	6 vasos de precipitados de 50mL
1 gradilla	1 galón de H <sub>2</sub> O destilada
	10 vasos de precipitado de plástico
	4 celdas para espectrofotómetro vidrio
	1 frasco de residuos de 50mL
	5 goteros de plástico
	8 propipetas
	1 frasco de residuos de 50mL



## REACTIVOS

40 mL de p-dimetilaminobenzaldehído (R. Ehrlich)	50 mL carbonato de sodio 15%
40 mL HCl 6N	10 mL fenolftaleína 0.1%
200 mL acetato de sodio	

## METODOLOGÍA

### I. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

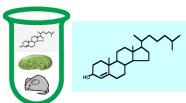
1. Las muestras estarán guardadas en frascos ámbar debido a que son sensibles a la luz o bien se cubrirán con papel aluminio.
2. En dos tubos para centrífuga verter 10 mL de muestra de orina, etiquetar como problema 1.
3. En otros dos tubos para centrífuga colocar 10mL de muestra de orina, etiquetar como problema 2.
1. Centrifugar durante 5 min a 2000 rpm.
2. Recuperar el sobrenadante.

### II. PRUEBA CUALITATIVA DE UROBILINÓGENO

1. Colocar en un tubo de ensaye 5 mL de orina.
2. Agregar 1 mL del reactivo de Ehrlich y mezclar.
3. Dejar en reposo durante 5 minutos.
4. Comprobar el cambio de color. Si la reacción es positiva la muestra virará a un tono rojo cereza.
1. Agregar 2.5 mL de solución saturada de acetato de sodio. Si la coloración se intensifica es positivo para urobilinógeno, si el color no se modifica es positivo para porfobilinógeno.
2. Repetir el mismo procedimiento empleando la otra muestra problema de orina.

### III. CUANTIFICACIÓN DE UROBILINÓGENO

1. Rotular tres tubos de ensaye como B (blanco), p (patrón) y P (problema).
2. Preparar los sistemas al mismo tiempo de acuerdo a la siguiente tabla:



TUBO	B (blanco)	p (patrón)	P (Problema)
Muestra de orina	2.0mL	-	2.0 mL
Sol. fenolftaleína	-	1.0 mL	-
Reactivos de Ehrlich	-	-	2.0 mL
HCl			2.0mL
Reposar 10 min			
Solución de acetato de sodio	6.0mL	6.0mL	-
Carbonato de sodio 15%	-	5.0mL	-
Agua destilada	7mL	3mL	9mL

2. Mezclar y esperar exactamente 5 min a temperatura ambiente y medir la absorbancia de p y P a 500 nm utilizando el blanco para calibrar el equipo.
3. Registrar los datos en el cuadro A.

## OBSERVACIONES Y RESULTADOS

CUADRO A. Medidas de absorbancias

Muestra	Absorbancia (p)	Absorbancia (P)
Problema 1		
Problema 2		

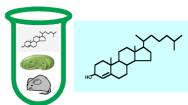
## CÁLCULOS

Para cuantificar el urobilinógeno presente en la orina se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Urobilinógeno} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \left( \frac{A_{\text{prob}}}{A_{\text{patrón}}} \right) (\text{Conc est\'andar})$$

## BIBLIOGRAFÍA

1. Graff, L. (2007). "Análisis de orina". (2<sup>a</sup> ed.) México: Editorial médica panamericana.
2. Silva, C. y García, J. (2006). "Laboratorio de Bioquímica". (1<sup>a</sup> ed.) España: Editorial MAD.
3. Ganong, F. (2002). "Fisiología Médica". (18<sup>a</sup> ed.) México: Manual Moderno.
4. Wein, K. (2008). "Campbell-Walash: Urología". (9<sup>a</sup> ed.) México: Editorial médica panamericana.
5. Fischbach, T. (1997). "Manual de procesos diagnósticos". (2<sup>a</sup> ed.) México: Mc-GrawHill.



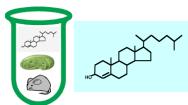
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 1: Cuantificación de DNA**

GRUPO \_\_\_\_\_ Q FECHA \_\_\_\_\_ EQUIPO \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_ FIRMA \_\_\_\_\_



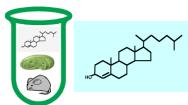
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 2: Introducción al metabolismo**

**GRUPO** \_\_\_\_\_ **Q** **FECHA** \_\_\_\_\_ **EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NOMBRE** \_\_\_\_\_ **FIRMA** \_\_\_\_\_



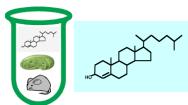
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 3: Fermentación Alcohólica**

**GRUPO** \_\_\_\_\_ Q **FECHA** \_\_\_\_\_ **EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NOMBRE** \_\_\_\_\_ **FIRMA** \_\_\_\_\_



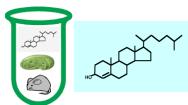
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 4: Extracción de glucógeno en hígado de ratón**

**GRUPO** \_\_\_\_\_ Q **FECHA** \_\_\_\_\_ **EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NOMBRE** \_\_\_\_\_ **FIRMA** \_\_\_\_\_



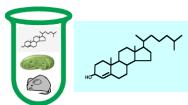
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 5: Fotosíntesis, aislamiento de cloroplastos y reacción de Hill**

GRUPO \_\_\_\_\_ Q FECHA \_\_\_\_\_ EQUIPO \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_ FIRMA \_\_\_\_\_



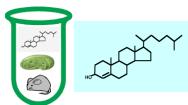
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 6: Cuantificación de creatinina  
en suero sanguíneo**

**GRUPO** \_\_\_\_\_ Q **FECHA** \_\_\_\_\_ **EQUIPO** \_\_\_\_\_

**NOMBRE** \_\_\_\_\_ **FIRMA** \_\_\_\_\_



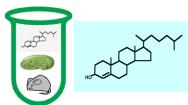
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 7. Cuantificación de Colesterol y Bilirrubina en suero sanguíneo.**

GRUPO \_\_\_\_\_ Q FECHA \_\_\_\_\_ EQUIPO \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_ FIRMA \_\_\_\_\_



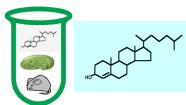
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**BIOQUÍMICA METABÓLICA**

**Práctica 8: Cuantificación de Urobilinógeno**

GRUPO \_\_\_\_\_ Q FECHA \_\_\_\_\_ EQUIPO \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_ FIRMA \_\_\_\_\_



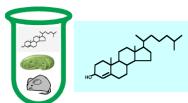
**ASIGNATURA** Bioquímica Metabólica **SEMESTRE** 2026-I  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE**  
**No. DE CUENTA** **GRUPO** **No. DE EQUIPO**  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** Práctica 1. Cuantificación de DNA  
**FECHA DE SOLICITUD** **FECHA DE DEVOLUCIÓN**

**FIRMA DEL SOLICITANTE**

## LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL

## LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL

<b>ADEUDO</b>	
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>	



	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
<b>VALE DE MATERIAL</b>	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09	
	Nº Revisión: 00	

**ASIGNATURA** Bioquímica Metabólica **SEMESTRE** 2026-I  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE**  
**No. DE CUENTA** **GRUPO** **No. DE EQUIPO**  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** Práctica 2. Introducción al metabolismo

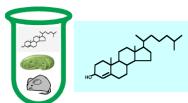
**FECHA DE SOLICITUD** \_\_\_\_\_ **FECHA DE DEVOLUCIÓN** \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado de 250 mL	1	
Vaso de precipitados de 100 mL	2	
Tubo de ensaye 16 x 150 mm	8	
Pipeta graduada de 2 mL	2	
Pipeta graduada de 1 mL	5	
Pipeta pasteur	2	
Matraz volumétrico de 100 mL	2	
Probeta de 100 mL	1	
Propipeta	2	
Gradilla	1	
Placa de porcelana	1	
Piseta	1	

**FIRMA DEL SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
<b>Nombre y firma</b>	<b>Nombre y firma</b>

<b>ADEUDO</b>
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>



	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09	
	Nº Revisión: 00	

ASIGNATURA Bioquímica Metabólica SEMESTRE 2026-I  
NOMBRE DEL SOLICITANTE  
No. DE CUENTA GRUPO  
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO No. DE EQUIPO  
Práctica 3. Fermentación alcohólica

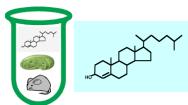
FECHA DE SOLICITUD \_\_\_\_\_ FECHA DE DEVOLUCIÓN \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado de 250 mL	2	
Vaso de precipitado de 100 mL	2	
Probeta de 100 mL	1	
Pipeta graduada de 10 mL	4	
Pipeta graduada de 5 mL	2	
Pipeta graduada de 2 mL	6	
Pipeta graduada de 1 mL	2	
Pipeta pasteur	2	
Tubo de ensaye de 16 x 250 mm	6	
Tubo de ensaye de 16 x 150 mm	15	
Gradilla p/tubo de ensaye grande (16 x 250 mm)	1	
Piseta	1	
Varilla de vidrio	1	
Tripie	1	
Tela de asbesto	1	
Vaso de precipitados 600mL	1	
Mechero bunsen	1	
Pinzas para tubo de ensaye	2	
Propipeta	3	
Gradilla p/tubo de ensaye mediano (16 x 150 mm)	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE \_\_\_\_\_

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL	LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma	Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR



MANUAL DE PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA

## SEMESTRE 2026-I

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

**ASIGNATURA** Bioquímica Metabólica **SEMESTRE** 2026-I

**NOMBRE DEL SOLICITANTE**

## Bioquímica Metabólica

**SEMESTRE 2026-I**

**No. DE CUENTA**

## GRUPO

**No. DE EQUIPO**

## NÚMERO Y NOMBRE DE LA

## Práctica 4. Extracción de glucógeno de

## modo de ratón

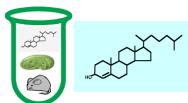
DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitados de 100 mL	1	
Tubo de ensaye para centrífuga	6	
Tubo de ensaye de 16 x 150 mm	4	
Pipeta graduada de 5 mL	1	
Pipeta graduada de 2 mL	1	
Pipeta graduada de 1 mL	1	
Propipeta	1	
Mango p/bisturí	1	
Gradilla	1	
Mortero chico con pistilo	1	
Vidrio de reloj	2	
Varilla de vidrio	2	
Piseta	1	
Placa de porcelana	1	
Pinza p/ tubo de ensaye	1	
Tijeras de disección	1	
Pinzas de disección	1	

**FIRMA DEL SOLICITANTE**

**LABORATORISTA O PROFESOR QUE  
ENTREGA EL MATERIAL**

## LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL

<b>ADEUDO</b>	
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>	



	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09	
	Nº Revisión: 00	

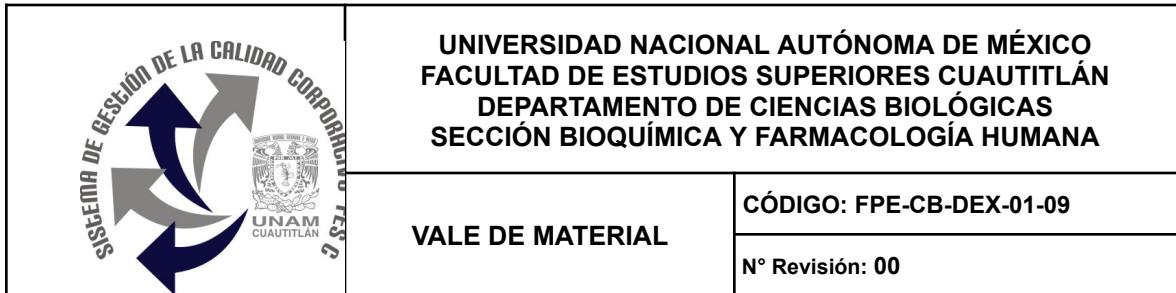
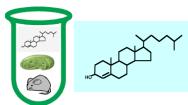
ASIGNATURA Bioquímica Metabólica SEMESTRE 2026-I  
NOMBRE DEL SOLICITANTE \_\_\_\_\_  
No. DE CUENTA \_\_\_\_\_ GRUPO \_\_\_\_\_  
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Práctica 5. Fotosíntesis, aislamiento de cloroplastos y reacción de Hill  
FECHA DE SOLICITUD \_\_\_\_\_ FECHA DE DEVOLUCIÓN \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Vaso de precipitado de 600 mL	1	
Vaso de precipitado de 100 mL	1	
Tubo de ensaye 16 x 150 mm	10	
Tubo para centrífuga	6	
Pipeta graduada 10 mL	1	
Pipeta graduada de 5 mL	1	
Pipeta graduada de 1 mL	1	
Pipeta pasteur	1	
Propipeta	2	
Piseta	1	
Mortero chico con pistilo	1	
Gradilla	1	
Mechero bunsen	1	
Tripie	1	
Tela de asbesto	1	
Vidrio de reloj	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE \_\_\_\_\_

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL	LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma	Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR



**ASIGNATURA** Bioquímica Metabólica **SEMESTRE** 2026-I

**NOMBRE DEL SOLICITANTE**

## Bioquímica Metabólica

SEMESTRE 2026-I

**NO. DE CUENTA**

GRUPO

**No. DE EQUIPO**

**N.º DE CUENTA**  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA**

## GRUPO O EXPERIMENTO

## Práctica 6. Cuantificación de creatinina

**FECHA DE SOLICITUD**

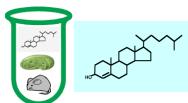
### FECHA DE DEVOLUCIÓN

**FIRMA DEL SOLICITANTE**

**LABORATORISTA O PROFESOR QUE  
ENTREGA EL MATERIAL**

**LABORATORISTA O PROFESOR QUE  
RECIBE EL MATERIAL**

<b>ADEUDO</b>	
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>	



	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
VALE DE MATERIAL	CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09	
	Nº Revisión: 00	

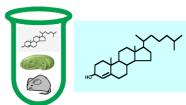
ASIGNATURA Bioquímica Metabólica SEMESTRE 2026-I  
NOMBRE DEL SOLICITANTE \_\_\_\_\_  
No. DE CUENTA \_\_\_\_\_ GRUPO \_\_\_\_\_  
NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO Práctica 7. Cuantificación de colesterol y  
bilirrubina en suero sanguíneo.  
FECHA DE SOLICITUD \_\_\_\_\_ FECHA DE DEVOLUCIÓN \_\_\_\_\_

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	OBSERVACIONES
Tubos de ensaye de 16 x 150 mm	11	
Vaso de precipitado de 250 mL	1	
Vaso de precipitado de 50 mL	1	
Pipetas graduadas de 5 mL	2	
Pipeta pasteur	1	
Propipetas	2	
Piseta	1	
Gradillas	2	
Embudo de vidrio	1	
Soporte universal	1	
Aro metálico	1	
Triángulo de porcelana	1	

FIRMA DEL SOLICITANTE \_\_\_\_\_

LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL	LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL
Nombre y firma	Nombre y firma

ADEUDO
NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**

---

**VALE DE MATERIAL**

**CÓDIGO: FPE-CB-DEX-01-09**

**Nº Revisión: 00**

**ASIGNATURA** Bioquímica Metabólica **SEMESTRE** 2026-I  
**NOMBRE DEL SOLICITANTE**  
**No. DE CUENTA** **GRUPO** **No. DE EQUIPO**  
**NÚMERO Y NOMBRE DE LA PRÁCTICA O EXPERIMENTO** Práctica 8. Cuantificación de Urobilinógeno en orina.  
**FECHA DE SOLICITUD** **FECHA DE DEVOLUCIÓN**

## **FIRMA DEL SOLICITANTE**

<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE ENTREGA EL MATERIAL</b>	<b>LABORATORISTA O PROFESOR QUE RECIBE EL MATERIAL</b>
<b>Nombre y firma</b>	<b>Nombre y firma</b>

<b>ADEUDO</b>	
<b>NOMBRE Y FIRMA DEL DEUDOR</b>	