

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CÓRDOBA**
Universidad Jesuita

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

BIOQUÍMICA Y BIOFÍSICA

Objetivos:

- Promover el uso de técnicas y aparatos, destinados al análisis y estudio de diferentes metabolitos, relacionados con la actividad de los profesionales odontólogos.
- Comprender la importancia del laboratorio en el diagnóstico de muchas enfermedades bucodentales.
- Conocer los valores de referencia de los distintos analitos, presentes en los líquidos biológicos incluida la saliva.
- Entender la importancia de las variables que pueden modificar los resultados de los análisis en un laboratorio.
- Relacionar los bioelementos con la composición elemental del cuerpo humano.
- Conocer la metodología analítica. Indicación y selección diagnóstica. Fuentes de error.
- Evaluar los resultados analíticos y su interpretación clínica.
- Aplicar las estrategias propias del método científico para realizar las investigaciones relacionadas con las Ciencias de la Naturaleza.
- Adoptar actitudes favorables para el análisis de situaciones, para la resolución de problemas, y para la toma de decisiones de forma ordenada y metódica desarrollando el rigor intelectual, el interés por el trabajo bien hecho, y la voluntad de corregirlo y perfeccionarlo.
- Analizar la información con sentido crítico y comunicarla a los demás oralmente y por escrito de manera organizada e inteligible.
- Desarrollar destrezas y habilidades específicas para el análisis, diseño, elaboración, utilización o manipulación de forma segura, ordenada y responsable de los materiales, recursos, objetos, productos o sistemas tecnológicos empleados en el proyecto, aplicando las medidas básicas de seguridad para la prevención de riesgos.
- Desarrollar la autoestima, la autonomía y la iniciativa personal, participar en tareas de equipo, en diálogos y debates con una actitud igualitaria, constructiva y tolerante, y valorar la importancia del esfuerzo personal y la responsabilidad.

Estructura del Práctico

- 1) Evaluación múltiple opción del trabajo práctico a realizar ese día.
- 2) Introducción y explicación del tema a desarrollar durante el práctico.
- 3) Desarrollo práctico y obtención de resultados.
- 4) Interpretación final del trabajo práctico.

Programación

Primer semestre:

- a) Presentación y gestión de los TP. Normas de Bioseguridad.
- b) Soluciones y Espectrometría. Práctica de pipeteo.
- c) pH y capacidad buffer.
- d) Clase de repaso para el parcial.
- e) Primer parcial práctico.**
- f) Determinación de glucosa.
- g) Determinación de colesterol y triglicéridos.
- h) Cuantificación de proteínas totales.
- i) Clase de repaso para el parcial.
- j) Segundo parcial práctico.**
- k) Presentación de Seminario por alumnos.

Segundo semestre:

- l) Recuperatorios Primer y Segundo parcial práctico.
- m) Actividad enzimática de la amilasa.
- n) Extracción de ADN salival.
- o) Coagulación y Fibrinólisis.
- p) Clase de repaso para el parcial.
- q) Tercer parcial práctico.**
- r) Metabolismo fosfocálcico.
- s) Determinación de Bicarbonato.
- t) Presentación de Seminario por alumnos.
- u) Determinación de Flúor.
- v) Cuarto parcial práctico.**
- w) Clase de consulta para recuperatorios (opcional).
- x) Recuperatorios Tercer y Cuarto parcial práctico.

Aclaración: la estructura puede verse modificada por razones internas de la Universidad y de la Facultad.

Regularización y Promoción de los trabajos prácticos

Los prácticos se evalúan en cada una de las clases y en cuatro parciales distribuidos en todo el ciclo lectivo.

En cada uno de los prácticos se realizará, antes del comienzo del mismo, una evaluación escrita múltiple opción de 5 (cinco) preguntas que tendrán una puntuación de 2 puntos cada pregunta, dando una nota máxima de 10 puntos para cada evaluación. *Los temas a ser evaluados comprenden exclusivamente lo escrito en la presente Guía de Trabajos Prácticos.*

Las notas de cada evaluación serán difundidas a través de la Secretaría en la semana siguiente a cada evaluación, en día y horario a determinar por dicha Secretaría y por el medio que ésta considere más adecuada.

Se harán 11 evaluaciones durante todo el año, uno por cada tema programado menos el primer práctico de *“Presentación y gestión de los TP. Normas de Bioseguridad”*.

Al final del ciclo lectivo estas 11 notas se promediarán entre ellas y dicho valor se utilizará como una “quinta nota” que finalmente se promediará con las 4 notas de los parciales prácticos del año.

Solo los 4 parciales prácticos pueden ser recuperados. Dicha recuperación está programada para realizarse en dos etapas, una a la mitad del ciclo lectivo (Primer y Segundo Parcial Práctico) y otra en el final del ciclo lectivo (Tercer y Cuarto Parcial Práctico).

Las 11 evaluaciones de cada uno de los prácticos NO podrán ser recuperadas.

El promedio de esas 5 notas evaluativas darán al alumno la **Nota Final** y por tanto definirán su regularización y promoción de los trabajos prácticos.

Aquellos alumnos que tengan el 80% de asistencia a los prácticos y una Nota Final igual o mayor a 4 (cuatro) regularizarán los trabajos prácticos.

En dicho grupo, aquellos alumnos cuya Nota Final sea igual o mayor a 7 (siete) obtendrán la Promoción de los trabajos prácticos y NO rendirán la parte práctica en el examen final de la materia.

Los trabajos prácticos definidos como *“Presentación de Seminario por alumnos”* también serán evaluados y definirán una nota de concepto que permitirá redondear para arriba o para abajo el promedio de las 11 notas de las evaluaciones de cada práctico (la llamada “quinta nota”).

Finalmente también se evaluará en cada práctico la participación activa del alumno durante el mismo, su conducta para con el profesor y compañeros, su integración con todos y cada uno de los compañeros de cada comisión.

Presentación del proyecto de trabajo y gestión de los TP

Las actividades prácticas que se desarrollarán en cada comisión incluirán determinaciones cualitativas y cuantitativas de diferentes analitos biológicos utilizando técnicas de bioquímica tradicionales.

La muestra para analizar es plasma humano proveniente de Banco de donantes, el cual ha sido controlado para diferentes enfermedades transmisibles por esta vía. De cualquier manera, se recomienda el uso de guantes de látex durante su manipulación, junto con todas las medidas de bioseguridad que se indicarán oportunamente. En algunos prácticos también se trabajará con muestras de saliva obtenidas de alumnos pertenecientes a cada comisión.

La mayoría de las determinaciones bioquímicas programadas en cada práctico serán realizadas utilizando kits comerciales de probada eficiencia. En cada caso los protocolos a desarrollar serán resumidos en esta guía práctica, pero se pueden obtener en los sitios web de la empresa correspondiente.

Explicación de la estructura de cada clase práctica

Cada comisión en su horario determinado será guiada para cumplir con los siguientes requisitos para su aprobación:

- 1) Evaluación escrita del trabajo práctico a realizar ese día.
Al inicio de la clase se realizará una evaluación escrita múltiple opción a los alumnos sobre el tema que se desarrollará ese día de acuerdo a la programación descrita más arriba. Estas preguntas comprenderán conceptos teóricos y de interpretación de lo que se estará por determinar en dicho práctico.
- 2) Introducción y explicación del tema a desarrollar durante el práctico.
A continuación, el profesor dará una breve introducción del tema a desarrollar, profundizando sobre los tópicos más importantes (teóricos y prácticos) a tener en cuenta por los alumnos.
- 3) Desarrollo práctico y obtención de resultados.
Siguiendo las indicaciones del profesor y lo escrito en esta guía, el alumno trabajará en grupos reducidos de integrantes para realizar la determinación analítica correspondiente a ese día. Cualquier modificación que se hiciera en el protocolo a realizar, debe ser anotada por el alumno en su guía correspondiente y pasará a formar parte del nuevo protocolo a realizar y podrá ser evaluado en el Parcial Práctico correspondiente.
- 4) Interpretación final del trabajo práctico.
El alumno deberá realizar una interpretación de todo lo visto en el práctico, determinando los pasos más importantes que se desarrollaron y las conclusiones obtenidas.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°1:

NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

La seguridad en el laboratorio abarca muchísimos aspectos, sin embargo, podemos resumir algunas normas generales de acuerdo con las situaciones más comunes que se observan en los laboratorios de enseñanza de la química:

1) Siempre estará presente en el laboratorio un docente, encargado de la actividad experimental. El/la docente tiene mucha experiencia en el trabajo de laboratorio, por eso es de suma importancia que sigas atentamente sus indicaciones para la ejecución de la actividad. Nunca dudes en consultar al docente ante cualquier inconveniente que surja.

2) En el laboratorio se va a trabajar siempre con material de vidrio y con sustancias químicas con cierto grado de peligrosidad, por lo que hay que estar atento a la hora de manipular estos materiales. Al momento de trabajar hay que estar concentrado y evitar distraerse, por ejemplo, con el celular.

3) Las sustancias químicas con las que se puede trabajar en el laboratorio pueden ser muy irritantes para la piel, los ojos y las vías respiratorias, por lo que se debe evitar el contacto directo con los mismos. Considerando lo anterior, tampoco tienes que comer o beber en el laboratorio así no ocurren ingestiones accidentales. Si hay contacto directo con un reactivo hay que lavar la zona inmediatamente con abundante agua y, si cae sobre la ropa, es importante quitar la ropa contaminada y lavar la zona de piel que estuvo en contacto con la misma.

4) Usa los elementos de protección personal y ropa adecuada para realizar las actividades, siempre es mejor prevenir el contacto con sustancias peligrosas que tener que tratar las heridas que pueden ocasionar. Siempre usa guardapolvo, calzado cerrado y pantalones largos. Si tienes el cabello largo, es necesario que éste esté recogido. Si vas a manipular algún elemento o reactivo, usa guantes para proteger las manos y gafas para proteger los ojos.

5) Los envases que contienen los reactivos químicos presentan etiquetas que dan información valiosa sobre dicho reactivo, incluyendo características físicas y químicas como riesgos y toxicidad de los mismos. Asimismo, están siempre disponibles en internet fichas de seguridad de reactivos químicos con la misma información o incluso más detallada. Es muy importante prestar atención a los rótulos y las fichas de seguridad, no sólo para identificar correctamente los reactivos y no cometer errores en la ejecución del práctico, sino también para identificar posibles riesgos.

6) El orden en el área de trabajo puede influir mucho en la probabilidad de que ocurra algún accidente. Tener al alcance los materiales necesarios para efectuar la actividad práctica y mantener la limpieza son aspectos fundamentales.

7) El conocimiento de la técnica experimental a utilizar y de los fundamentos teóricos por los cuales se rige pueden ser de gran utilidad en caso de que durante la actividad ocurra algún suceso inesperado en cuanto al procedimiento realizado. Es importante que puedas tener a tu alcance la mayor cantidad de información posible acerca de las tareas que realizamos.

8) En la misma línea de pensamiento que el punto anterior, para evitar problemas, debes realizar las actividades experimentales sin efectuar modificaciones del método, a menos que sean indicadas por el/la docente. Todos los prácticos son previamente realizados por los encargados de este para que sean seguros y de utilidad desde el punto de vista de la enseñanza para todos ustedes.

Estas recomendaciones tienen el propósito de brindar una guía o código de práctica voluntario, así como también objetivos para mejorar las operaciones. Sin embargo, la aplicación de estas recomendaciones a una operación de laboratorio específica debe basarse en la evaluación del riesgo de los agentes y actividades especiales, en lugar de utilizarse como un código genérico y universal aplicable a todas las situaciones.

Desde hace muchos años se ha hecho hincapié en los cuidados y precauciones que se deben tener en el manejo de los distintos fluidos biológicos (sangre, orina, líquidos pleurales, etc.). En este aspecto el aumento en las estadísticas de enfermedades infectocontagiosas en el mundo y en especial en aquellas personas que trabajan en los sistemas de salud, ha alertado en la sociedad la necesidad del uso de elementos que permitan protegerse en lo posible y de esta forma evitar el contacto directo con material que puede ser potencialmente contaminante.

El término "**contención**" se utiliza para describir métodos seguros para manejar materiales infecciosos en el medio ambiente del laboratorio donde son manipulados o conservados. El objetivo de la contención es reducir o eliminar la

exposición de quienes trabajan en laboratorios u otras personas, y del medio ambiente externo a agentes potencialmente peligrosos.

La **contención primaria**, la protección del personal y del medio ambiente inmediato del laboratorio de la exposición a agentes infecciosos, es provista tanto mediante buenas técnicas microbiológicas como a través del uso de equipos de seguridad adecuados. El uso de vacunas puede brindar un mayor nivel de protección del personal. La **contención secundaria**, la protección del medio ambiente externo al laboratorio de la exposición a materiales infecciosos, se logra a través de una combinación del diseño de la instalación y prácticas operativas. Por lo tanto, **los tres elementos de contención incluyen prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad y el diseño de la instalación.**

Con respecto a aquellas personas que específicamente realizan tareas de extracción/manipulación de sangre u otros fluidos biológicos como orina, materia fecal, saliva, y secreciones en general se recomienda hacerlo usando guantes descartables, barbijos y lentes protectores. En cuanto a los médicos que desarrollan tareas de alto riesgo como las cirugías de diferentes especialidades y otras actividades relacionadas deben extremar las precauciones en cuanto al uso de material descartable e instrumentos con garantía de esterilidad.

En el caso especial de los guantes si bien no puede resguardarnos de los pinchazos, lo hace cuando tenemos heridas abiertas en las manos expuestas. Esto es importante pues debemos saber que la sangre es uno de los sistemas de transporte de enfermedades infectocontagiosas.

En cuanto a los barbijos es importante en el caso de los odontólogos que pueden recibir el spray (gotitas pulverizadas) y llegar a la boca, nariz y ojos, siendo en este último caso recomendable el uso de lentes protectores.

EQUIPO	PELIGRO EVITADO	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD
Batas y monos de laboratorio	Contaminación de la ropa	<ul style="list-style-type: none"> • Abertura trasera • Cubren la ropa de calle
Delantales de plástico	Contaminación de la ropa	<ul style="list-style-type: none"> • Impermeables
Calzado	Impactos y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Puntera cerrada
Gafas de máscara	Impactos y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Lentes resistentes a los impactos (con corrección óptica o bien deben usarse sobre las lentes correctoras) • Protección lateral
Gafas de seguridad	Impactos	<ul style="list-style-type: none"> • Lentes resistentes a los impactos (con corrección óptica) • Protección lateral
Viseras	Impactos y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Protegen todo el rostro • Se retiran fácilmente en caso de accidente
Mascarillas respiratorias	Inhalación de aerosoles	<ul style="list-style-type: none"> • Varios diseños disponibles: desechables, de un solo uso; purificadoras de aire, de cara entera o de media cara; purificadoras de aire eléctricas, de cara entera o con capucha; con suministro de aire
Guantes	Contacto directo con microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> • De látex, vinilo o nitrilo, aprobados para uso microbiológico, desechables • Protección de las manos
	Punciones o cortes	<ul style="list-style-type: none"> • De malla

Para la bioseguridad en el laboratorio es fundamental disponer de conocimientos básicos sobre la desinfección y la esterilización. Habida cuenta de que los objetos muy sucios no pueden desinfectarse o esterilizarse con rapidez, es igualmente importante comprender los conceptos básicos de la limpieza previa. A este respecto, los siguientes principios generales se aplican a todas las clases conocidas de microbios patógenos.

Cuando se ha terminado de utilizar los materiales que han estado en contacto con algún tipo de material contaminante, se debe en el caso del descartable descartarlo inmediatamente. Y en el caso de aquel que se debe volver a utilizar aplicarle métodos de esterilización como el calor, u otros como el óxido de etileno o radiación ultravioleta los cuales son los más seguros y recomendables. Todos estos pasos deben ser posteriores al uso de líquidos desinfectantes como la lavandina diluida u otros sistemas como el alcohol yodado.

Definiciones:

En la esfera de la desinfección y la esterilización se utilizan muchos términos diferentes. Los siguientes se encuentran entre los más comunes en el campo de la bioseguridad:

Antimicrobiano – Agente que mata los microorganismos o suprime su crecimiento y proliferación.

Antiséptico – Sustancia que inhibe el crecimiento y el desarrollo de microorganismos, pero no necesariamente los mata. Los antisépticos suelen aplicarse a las superficies corporales.

Biocida – Término general para cualquier agente que mate organismos.

Descontaminación – Cualquier proceso utilizado para eliminar o matar microorganismos. También se utiliza para referirse a la eliminación o neutralización de sustancias químicas peligrosas y materiales radioactivos.

Desinfección – Medio físico o químico de matar microorganismos, pero no necesariamente esporas.

Desinfectante – Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos, pero no necesariamente esporas. Los desinfectantes suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados.

Esporicida – Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizadas para matar microorganismos y esporas.

Esterilización – Proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismos y esporas.

Germicida químico – Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos.

Microbicida – Sustancia o mezcla de sustancias químicas que mata microorganismos. Este término se utiliza a menudo en lugar de «biocida», «germicida químico» o «antimicrobiano».

Alcoholes:

El etanol (alcohol etílico) y el 2-propanol (alcohol isopropílico) tienen propiedades desinfectantes similares. Son activos contra las formas vegetativas de las bacterias, los hongos y los virus con envoltura lipídica, pero no contra las esporas. Su acción sobre los virus sin envoltura lipídica es variable. Para conseguir la máxima eficacia deben utilizarse en concentraciones acuosas de aproximadamente un 70% (v/v): las concentraciones más altas o más bajas pueden no tener tanto poder germicida. Una de las grandes ventajas de las soluciones acuosas de alcoholes es que no dejan residuo alguno en los objetos tratados.

Diluciones recomendadas de compuestos que liberan cloro:

	SITUACIONES «LIMPIAS» ^a	SITUACIONES «SUCIAS» ^b
Cloro libre requerido	0,1% (1 g/l)	0,5% (5 g/l)
Solución de hipoclorito sódico (5% de cloro libre)	20 ml/l	100 ml/l
Hipoclorito cálcico (70% de cloro libre)	1,4 g/l	7,0 g/l
Dicloroisocianurato sódico en polvo (60% de cloro libre)	1,7 g/l	8,5 g/l
Dicloroisocianurato sódico en comprimidos (1,5 g de cloro libre por comprimido)	Un comprimido por litro	Cuatro comprimidos por litro
Cloramina (25% de cloro libre) ^c	20 g/l	20 g/l

^a Después de retirar el material grueso.
^b Para enjuagar, por ejemplo sobre la sangre o antes de retirar el material grueso.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°2:

SOLUCIONES Y ESPECTROFOTOMETRÍA

❖ SOLUCIONES

Una solución química es la **mezcla homogénea de una o más sustancias disueltas en otra de mayor proporción**. Está compuesta por solutos, que son las sustancias que se disuelven, y solventes, que son las sustancias que disuelven los solutos.

Las soluciones químicas, también llamadas disoluciones, pueden presentar los tres estados de la materia: líquido, sólido y gaseoso. A su vez, sus solutos y solventes también pueden estar en cualquier estado, dando lugar a distintos tipos de soluciones.

La mezcla del alcohol en el agua, por ejemplo, es una solución líquida de soluto y solvente líquidos. Otro caso es el aire, una mezcla gaseosa y homogénea compuesta de nitrógeno, oxígeno y otros gases.

Al ser homogéneas, las soluciones químicas presentan **una sola fase**. En otras palabras, no se puede distinguir el soluto del solvente. Además, las sustancias polares solo disuelven otras sustancias polares, mientras que las apolares disuelven a otras apolares.

Tipos de soluciones químicas

Soluciones químicas según el grado de solubilidad

Las soluciones químicas se pueden dividir según diferentes factores. Uno es el grado de solubilidad del soluto en el solvente. En este sentido, tenemos:

- Las **soluciones insaturadas**, las cuales se dividen en:
 - Soluciones diluidas**, que presentan un porcentaje bajo de soluto respecto al solvente.
 - Soluciones concentradas**, que tienen un gran porcentaje de soluto en el solvente.
- Las **soluciones saturadas**, que son aquellas que no admiten más soluto en el solvente. A partir de este límite, la solución será heterogénea y presentará por lo menos dos fases.
- Las **soluciones sobresaturadas**, que son las que poseen más soluto de lo que admite el solvente y, por lo tanto, se puede apreciar una mezcla heterogénea.

Soluciones químicas según el estado de agregación de la materia

A pesar de que las soluciones químicas se suelen encontrar generalmente en estado líquido, también se puede encontrar en estado gaseoso o sólido. Según el estado resultante, las soluciones químicas pueden ser:

- **Soluciones sólidas**, en el que el estado resultante de la solución química es una mezcla sólida.
- **Soluciones líquidas**, en el que el estado resultante de la solución química es una mezcla líquida.
- **Soluciones gaseosas**, en el que el estado resultante de la solución química es una mezcla gaseosa.

Soluciones químicas según el tipo de solvente que se utilice:

- **Soluciones acuosas**, en las que el solvente utilizado es el agua. Son el tipo más abundante de soluciones químicas.
- **Soluciones alcohólicas**, las cuales emplean alcoholes como solvente. Los más populares son el etanol y metanol.
- **Soluciones salinas**, que poseen sal y agua destilada como solvente de otros componentes. La mezcla de sal en agua destilada se utiliza para fines médicos, pero también sirve como solvente de glucosa y algunos polisacáridos.
- **Aleaciones de metal**, que son mezclas homogéneas de dos metales en estado sólido. Algunos ejemplos son el acero (hierro y carbono), el latón (cobre y zinc) o el oro blanco (oro mezclado con níquel, plata o paladio, entre otros).

Concentración de soluciones químicas

La concentración química determinará, en unidades físicas de peso, volumen o partes por millón (ppm), el porcentaje de soluto presente en la solución.

La concentración de soluto en las soluciones se suele expresar en:

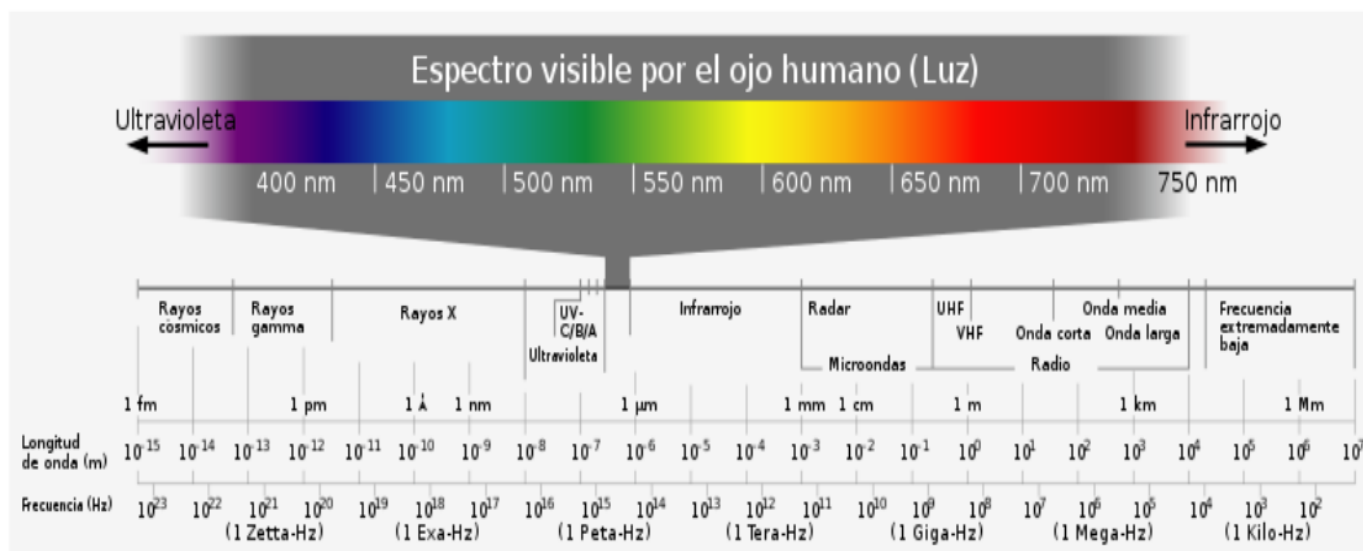
- **Molaridad:** determina la concentración de soluto en moles, dividido en el volumen del solvente. Se suelen utilizar los moles y litros como unidades, es decir, **mol (soluto) / l (solvente)**.
- **Molalidad:** determina la concentración de soluto en moles, dividido en el peso del solvente. Usualmente, las unidades son moles y kilogramos, es decir, **mol (soluto) / kg (solvente)**.
- **Fración molar:** determina la concentración de soluto en moles, dividido en moles de solvente, es decir, **mol (soluto) / mol (solvente)**.

El conocimiento de la concentración en una solución química es importante. Ello determinará la cantidad de soluto y solvente presentes para determinar los factores de cambio y así recrear la solución para su uso o estudio posterior.

❖ ESPECTROFOTOMETRÍA

Durante mucho tiempo los químicos han utilizado el color como una ayuda para la identificación de sustancias químicas. La espectrofotometría se puede considerar como la "extensión de la inspección visual" en donde un estudio más detallado de la absorción de energía radiante por las especies químicas permite una mayor precisión en su caracterización y en su cuantificación. Al reemplazar el ojo humano con otros detectores de radiación podemos estudiar la absorción fuera de la región visible del espectro y con frecuencia podemos realizar los experimentos espectrofotométricos en forma automática. El término espectrofotometría sugiere la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, así como las mediciones por separado a una longitud de onda determinada. En otras palabras, el término espectrofotometría se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de sustancias químicas.

Los cuerpos luminosos como el sol o una lámpara eléctrica emiten radiación en un amplio espectro que comprende muchas longitudes de onda. Aquellas longitudes de onda que están asociadas con la luz visible son capaces de afectar la retina del ojo humano y con ello dan origen a las impresiones subjetivas de la visión. Pero gran parte de la radiación que emiten los cuerpos calientes, caen fuera de la región donde el ojo humano es sensible, hablamos de las regiones ultravioleta e infrarrojo ubicadas a ambos lados de la región visible del espectro. El espectro electromagnético completo está clasificado en forma aproximado como se muestra en la **Figura**.

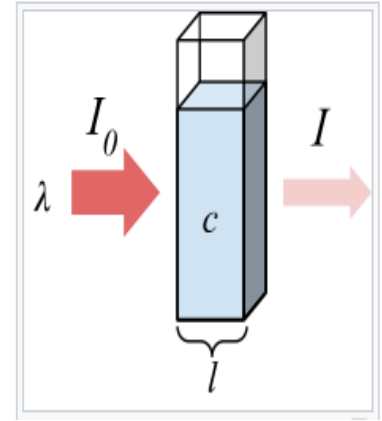


La parte de la molécula a la que se debe la absorción de la luz se llama cromóforo. Cualquier sustancia que absorba luz visible se verá coloreada cuando refleje la luz blanca o cuando ésta se transmita por ella. La sustancia absorbe ciertas longitudes de onda de la luz blanca y el ojo humano detecta longitudes de onda no absorbidas (reflejadas).

Aspectos cuantitativos. Ley de Lambert-Beer

Cuando un haz de luz de determinada longitud de onda incide sobre una muestra pueden ocurrir dos cosas: que la luz sea transmitida en toda su intensidad (en cuyo caso implica que la muestra es transparente a esa longitud de onda), o que parte de la luz sea absorbida. El espectro de absorción de una sustancia es indicativo de las regiones del espectro electromagnético en las cuales la muestra es o no transparente. Dicho en otras palabras, es indicativo de las regiones del espectro electromagnético en las que la muestra absorbe radiación.

Si un haz de luz de intensidad I_0 y de longitud de onda λ incide sobre una celda o cubeta transparente (cuarzo) de espesor L , que contiene una solución de concentración C de una sustancia que absorbe luz a esa longitud de onda, parte de la radiación será absorbida y parte transmitida $I < I_0$



La transmitancia (T) de una solución se define como: $T = (I / I_0)$

El porcentaje de transmitancia (%T) se define como $\%T = (I / I_0) \times 100$ y da idea de la fracción de luz absorbida por la muestra de concentración C a dicha longitud de onda.

La fracción de luz absorbida depende de la distancia que el haz de luz atraviesa en la celda donde se encuentra la muestra; a esta distancia se la denomina paso óptico (indicada como L en la figura). Si L es mayor, la intensidad de luz transmitida es menor

La fracción de luz absorbida también depende de la concentración de la solución (C). Se observa que, si la solución es más concentrada, la intensidad de luz transmitida también es menor. Existe una dependencia de la transmitancia con la concentración y el paso óptico para una dada sustancia a una dada longitud de onda.

La transmitancia no es una función lineal de la concentración ni del paso óptico.

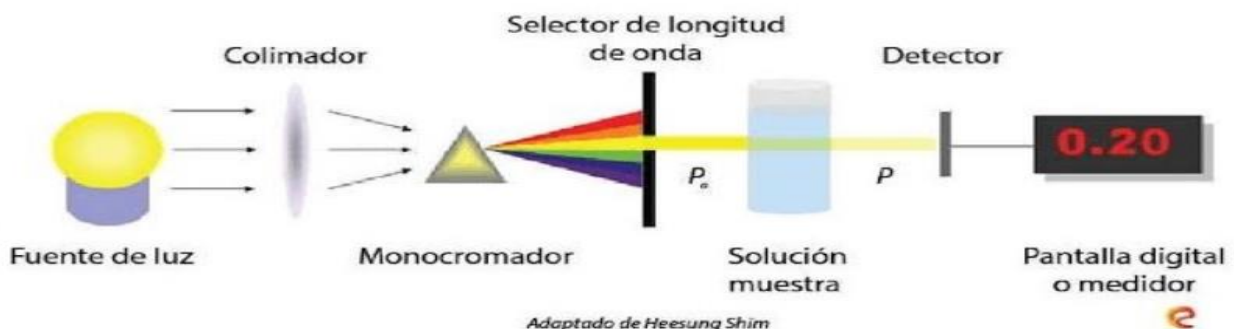
La absorbancia es proporcional a la concentración y al paso óptico de la solución: Ley Lambert-Beer que relaciona la absorbancia con la concentración de la solución y con el paso óptico de la celda.

La medición espectrofotométrica

Si bien el ojo humano es capaz de apreciar variaciones muy pequeñas de intensidad de luz, no es adecuado cuando se trata de medir la absorción de luz en forma cuantitativa. Para esto, se utiliza un espectrofotómetro.

El espectrofotómetro consta de:

- Una **fente de radiación**, que, para las mediciones realizadas en la zona visible del espectro, es simplemente una lámpara tungsteno alimentada por una fuente estabilizada para evitar fluctuaciones en la luz;
- un **monocromador** encargado de producir la separación de las distintas longitudes de onda y así seleccionar la correspondiente al análisis que se desea realizar;
- un **porta celda** donde se coloca una celda con la muestra a analizar y cuya naturaleza dependerá del tipo de radiación del espectro electromagnético que se esté empleando;
- un **detector**, que mide la cantidad de luz que sale de la celda luego de atravesar la muestra y la transforma en una señal eléctrica que es finalmente registrada por un dispositivo de lectura. La señal producida por el detector es medida a través de un dispositivo de lectura analógico o digital que da el % de transmitancia o la absorbancia.



Ajuste del cero eléctrico

En los aparatos más antiguos, previo a la medición espectrofotométrica es necesario el ajuste del cero del dispositivo de lectura o cero eléctrico, el que se realiza bloqueando totalmente el paso de luz, a fin de que ésta no llegue al detector. Como resultado, si la lectura no es exactamente cero, se traslada la aguja o lector a este valor con los controles que el aparato tiene para ese fin.

En los instrumentos más modernos (como el que se usará en el trabajo práctico) esta etapa no es necesaria.

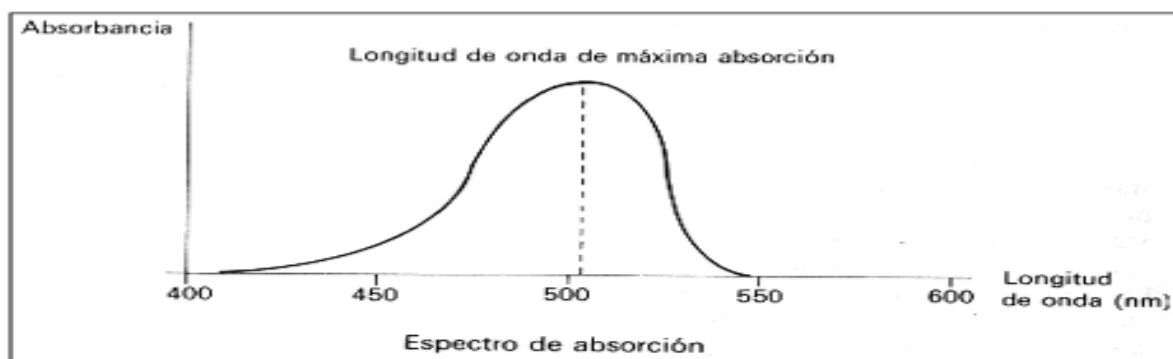
Ajuste del cero de absorbancia

A continuación, se describe la primera etapa a realizar cuando se utilizan los espectrofotómetros modernos. Inicialmente se debe ajustar el 100 % de transmitancia (o cero de absorbancia) a cada una de las longitudes de onda a las que se desea medir. A tal fin se debe preparar una solución blanco, la cual contiene todos los reactivos empleados para preparar la solución a analizar, menos la especie que se está por analizar mediante espectrofotometría. Con esta solución se ajusta en el dispositivo de lectura, la máxima transmitancia posible % T=100 (absorbancia igual a cero, A = 0). Una vez realizado este paso, se coloca la solución con el analito en la celda, y se lee la transmitancia o absorbancia correspondiente. Obviamente, la cantidad de luz transmitida es, en este caso, menor que en el blanco ya que esta solución sí contiene el analito.

Curva espectral

El primer paso que se debe realizar cuando se va a efectuar la determinación de la concentración de un compuesto por espectrofotometría UV-visible, es la selección de la longitud de onda de trabajo, para lo cual se debe construir una curva espectral (gráfico A vs λ). A tal fin se debe usar una solución del compuesto de interés de concentración intermedia (no demasiado concentrada) y se debe medir la absorbancia para cada longitud de onda en un amplio intervalo de longitudes de onda, una vez obtenido el espectro de este compuesto se selecciona la longitud de onda adecuada, teniendo en cuenta que se debe llegar a una situación de compromiso entre dos aspectos: la longitud de onda seleccionada tendrá que ser tal que se corresponda con un máximo de absorbancia, pero ésta debe corresponder a una zona donde la absorbancia no varíe demasiado con λ (ver Figura).

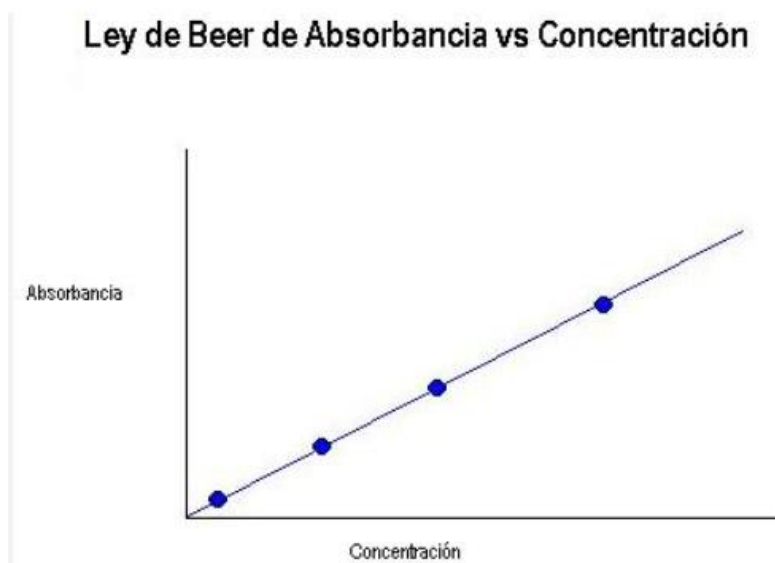
Mientras se efectúa el barrido de longitudes de onda se está trabajando con una misma celda de un determinado paso óptico b y con una solución de una dada concentración C . Debido a esto, lo único que se está modificando es la absorbancia para las distintas longitudes de onda, es decir, la absorptividad molar del compuesto. De esta forma, la curva espectral da información acerca de cómo varían las absorptividades molares del compuesto con la longitud de onda.



Curva de trabajo de calibración

Si se va a efectuar la determinación cuantitativa de un dado compuesto, es necesario conocer además de la longitud de onda de trabajo, su absorptividad molar a fin de poder emplear la ecuación que surge de la ley de Lambert y Beer ($A = \xi \cdot b \cdot C$) donde A es la absorbancia, ξ es el coeficiente de extinción molar (que depende de la naturaleza del producto químico y de la longitud de onda de la luz utilizada), b es la longitud del camino que la luz debe recorrer en la solución en centímetros y C es la concentración de una solución dada. Por lo tanto, será necesario conocer la absorptividad molar de dicho compuesto a la longitud de onda de trabajo seleccionada. Para poder calcular la absorptividad molar del compuesto se deberá construir una curva de calibración o de trabajo. Gráfico de absorbancia (a una dada longitud de onda) en función de la concentración de soluciones estándar del compuesto que se está analizando (A vs C). Se deben preparar varias (al menos 5) soluciones estándar (de concentración perfectamente conocida) del compuesto en estudio y luego se debe efectuar la determinación de la absorbancia de cada una, a la

longitud de onda seleccionada, con lo cual se tendrá un conjunto de valores de absorbancia para cada una de las soluciones preparadas. Si se grafica A vs C utilizando varias concentraciones estándar (en unidades M), en un cierto intervalo de concentraciones se obtiene una recta cuya pendiente es igual al valor de $\epsilon \times b$. Este tipo de gráfico puede ser utilizado para determinar la concentración incógnita de una solución a partir de una lectura de absorbancia de dicha solución.



Trabajo Práctico de Espectrofotometría Utilizando Azul de Metileno

Objetivo: Construir una curva espectral utilizando espectrofotometría para determinar la absorbancia del azul de metileno a diferentes longitudes de onda.

Materiales:

Azul de metileno
Espectrofotómetro
Cubetas de cuarzo o plástico óptico
Agua destilada
Micropipetas de volumen variable
Tubos de ensayo

Procedimiento:

Preparación de la solución de azul de metileno:

Preparar una solución de azul de metileno al 0.2% p/v. Esto implica disolver 0.2 g de azul de metileno en 100 mL de agua destilada. Agitar bien para asegurar la homogeneidad de la solución.

Preparación de diluciones 1:2 de la solución original:

Cada grupo deberá preparar 3 tubos de ensayo con una dilución 1:2 de la solución original de azul de metileno. Para ello deberá colocar en cada uno de los 3 tubos de ensayo 0,5 ml de agua destilada y luego agregarle a cada uno 0,5 ml de la solución de azul de metileno al 0.2% p/v y mezclar bien por inversión utilizando guantes de látex.

¿Cuál sería su concentración final? =

¿Y si hiciera una dilución 1:10? =

Paso 1: Calibración del Espectrofotómetro:

Encender el espectrofotómetro y dejar que se estabilice.

Ajustar el espectrofotómetro a una longitud de onda inicial de 400 nm.

Colocar una cubeta con agua destilada en el compartimento de medición y ajustar el blanco a cero absorbancia.

Verificar que el espectrofotómetro esté calibrado correctamente.

Paso 2: Medición de la absorbancia de la solución de azul de metileno:

Tomar una celda de cuarzo o plástico óptico y llenarla con la solución de azul de metileno preparada.

Colocar la celda en el compartimento de medición del espectrofotómetro.

Ajustar el espectrofotómetro a la longitud de onda deseada para la primera medición (por ejemplo, 400 nm).

Registrar la absorbancia de la solución de azul de metileno para esa longitud de onda.

Repetir los pasos 1 y 2 para cada longitud de onda requerida (ir aumentando la longitud de onda de a 50 nm hasta los 700 nm), cambiando la configuración del espectrofotómetro según sea necesario.

Registrar los valores de absorbancia obtenidos para cada longitud de onda.

Paso 3: Construcción de la curva espectral:

Graficar los datos obtenidos, donde en el eje x se coloca la longitud de onda y en el eje y la absorbancia.

Conectar los puntos en el gráfico para obtener la curva espectral del azul de metileno.

Interpretación de resultados:

La curva espectral obtenida muestra cómo la absorbancia del azul de metileno varía en función de la longitud de onda de la luz incidente.

Picos de absorbancia en la curva indican las longitudes de onda en las que el azul de metileno absorbe la luz de manera más eficiente.

Esta información puede ser útil para la identificación y cuantificación de azul de metileno en muestras desconocidas, así como para entender su comportamiento frente a la luz en diferentes condiciones experimentales.

Medición de la absorbancia en la longitud de onda encontrada

Cada grupo deberá medir la absorbancia de los restantes 2 tubos de ensayos donde se preparó la dilución 1:2 de la solución de azul de metileno.

1. Colocar en el aparato la longitud de onda definida por la curva espectral realizada.
2. Llevar el aparato a cero con agua destilada.
3. Realizar la medición de la Absorbancia para cada uno de los tubos y anotarlos.
4. Comparar las mediciones dentro del grupo y con los demás grupos.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°3

pH Y CAPACIDAD BUFFER

¿QUE ES EL pH?

El pH es una medida que **sirve para establecer el nivel de acidez o alcalinidad de una disolución**. La “p” es por “potencial”, por eso el pH se llama: potencial de hidrógeno.

Se expresa como el logaritmo negativo de base 10 de la concentración de iones hidrógeno. La siguiente ecuación representa esta definición:

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+] \quad [\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$$

$$\text{pOH} = -\log_{10}[\text{OH}^-] \quad [\text{OH}^-] = 10^{-\text{pOH}}$$

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

Por otra parte, el **pOH es una medida de la concentración de iones hidroxilo en una disolución**. Se expresa como el logaritmo negativo de base 10 de la concentración de iones hidroxilo y, a diferencia del pH, se utiliza para medir el nivel de alcalinidad de una disolución.

Un dato adicional es que en disolución acuosa a 25 °C, la suma del pH y el pOH es igual a 14.

Las disoluciones ácidas tienen una alta cantidad de iones hidrógeno. Esto significa que tienen bajos valores de pH (ver ecuación 1) y, por tanto, su nivel de acidez es alto. Así, una disolución será más ácida o menos ácida dependiendo de la cantidad de iones hidrógeno que tenga.

Por otra parte, **las disoluciones básicas (alcalinas) tienen bajas cantidades de iones hidrógeno**. Esto significa que tienen elevados valores de pH (ver ecuación 1) y, por tanto, su nivel de acidez es bajo.

Ejemplo:

En el plasma normal la concentración de $[\text{H}^+]$ es de 40 nmol/l. Para no utilizar estas unidades tan pequeñas, Sorensen propuso el concepto de pH, que es el logaritmo negativo de la concentración de $[\text{H}^+]$ expresada en mol/l.

El pH del plasma normal es $-\log 0.00000004 = 7.3979$ (aprox. 7.40).

Si el valor llega por debajo de 7.34 se considera un estado de acidosis, y si se encuentra por encima de 7.47 es un estado alcalosis. Si analizamos detenidamente el rango es muy reducido, es decir solamente se tiene un rango de 0.13.

Para ello es increíble como nuestro organismo tiene diferentes maneras de regular las sustancias ácidas o alcalinas. Una de ellas son las sustancias volátiles cuya regulación es a través de los pulmones. Por otro lado, existen las sustancias no-volátiles que se regulan a través de los riñones.

La escala de medida del pH



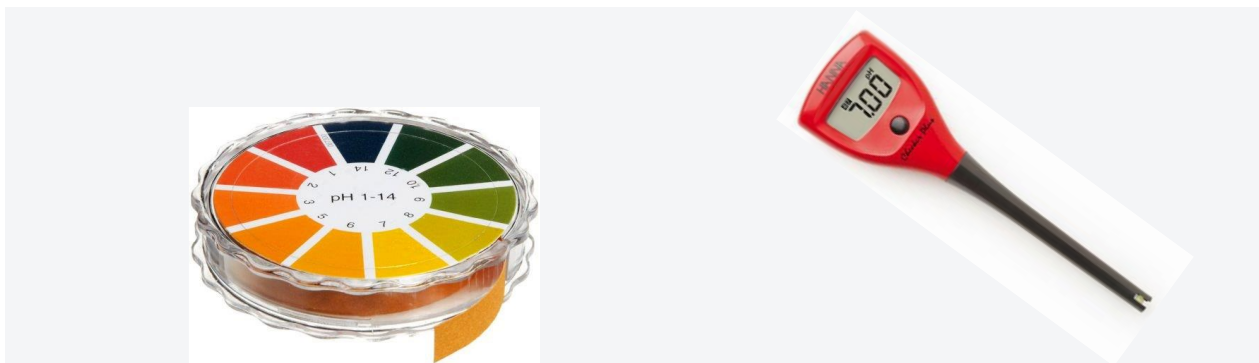
La escala de pH se utiliza para medir el grado de acidez de una disolución y, como el pH está relacionado con el pOH (ver ecuación 1), entonces sabiendo el grado de acidez de una disolución, también podemos saber su grado de basicidad.

Así, la escala de pH va desde el valor 0 hasta el 14. Por ejemplo, las sustancias con valor de $\text{pH}=0$ son las más ácidas (menos básicas), las que tienen $\text{pH}=7$ son neutras, y las que tienen $\text{pH}=14$, son las menos ácidas (más básicas).

¿COMO SE MIDE EL pH?

La forma de distinguir entre un compuesto ácido y uno básico es midiendo su valor de pH. En la actualidad existen numerosos métodos para medir el pH de una sustancia.

- **Usando indicadores ácido-base.** Los indicadores son compuestos que cambian de color al cambiar el pH de la disolución en que se encuentren. Por ejemplo, la fenolftaleína es un líquido que toma color rosa si es añadido a una base y se torna incoloro si es añadido a un ácido. Otro ejemplo es el papel tornasol: si se sumerge un fragmento en una disolución ácida se torna rojo-anaranjado, y si se sumerge en una solución básica se oscurece tomando color azul. También existen algunos tipos de papel tornasol con escalas de colores más específicas que indican valores de pH más exactos.
- **Usando un potenciómetro o pH-metro.** instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata/cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ion de hidrógeno.



La saliva es un líquido incoloro, viscoso, de pH alrededor de 6.8 y densidad de 1. Un adulto normal produce hasta 1 litro de saliva por día.

Saliva Parcial: es la secreción de cada una de las glándulas salivales por separado (Parótida – Submaxilar – Sublingual).

Saliva Total: es la mezcla de las salivas parciales obtenido directamente de la boca y se encuentra contaminada con partículas provenientes del medio bucal (gérmenes, células descamadas del epitelio, leucocitos, restos de alimentos, etc.).

Composición:

El 99% de la saliva es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas.

Las concentraciones de iones cloruro y sodio son muy inferiores a las plasmáticas, mientras que las concentraciones de iones bicarbonato y potasio son varias veces superiores.

La casi totalidad de sustancias orgánicas son proteínas. Las más importantes son la amilasa salival, las mucoproteínas y la inmunoglobulina A secretoria.

Capacidad Buffer:

Un tampón, buffer, solución amortiguadora o solución reguladora es la mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada.

Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes.

En los líquidos corporales, tanto extra como intracelulares, existen buffers cuya misión es amortiguar, es decir, disminuir los cambios de acidez de una solución cuando a ésta se le añade un ácido o un álcali y conseguir, por lo tanto, que el pH de la solución cambie lo menos posible; su efecto es prácticamente inmediato. Lo ideal es que un buffer tenga la misma cantidad de sus dos componentes (ácido y base), para amortiguar tanto un ácido como una base.

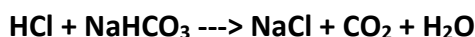
Los sistemas tampón salivares corrigen las variaciones de pH causadas por los cambios de concentración de iones ácidos o básicos producidos, por ejemplo, por la fermentación de los azúcares.

Mecanismo de actuación de las soluciones tampón:

Para poder entender con claridad el mecanismo que utiliza el organismo para evitar cambios significativos de pH, pondremos un ejemplo de actuación del tampón de más importancia en el organismo, el equilibrio de ácido carbónico (H_2CO_3) y bicarbonato (HCO_3^-), presente en el líquido intracelular y en la sangre. Como producto del metabolismo se produce CO_2 que al reaccionar con las moléculas de agua produce ácido carbónico, un compuesto inestable que se disocia parcialmente y pasa a ser bicarbonato según el siguiente equilibrio:



Entonces, el bicarbonato resultante se combina con los cationes libres presentes en la célula, como el sodio, formando así bicarbonato sódico (NaHCO_3), que actuará como tampón ácido. Supongamos que entra en la célula un ácido fuerte, por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl):



Como se puede ver en la anterior reacción el efecto ácido clorhídrico queda neutralizado por el bicarbonato de sodio y resultan como productos sustancias que no provocan cambios en el pH celular y lo mantienen en su valor normal, alrededor de 7.

Buffer y Saliva:

La capacidad buffer de la saliva incluye tres sistemas principales: el bicarbonato, el fosfato, y sistema buffer de proteínas. El sistema buffer del bicarbonato es el más importante y los otros dos tienen una importancia muy menor.

La saliva cumple funciones buffer principalmente gracias a la presencia de bicarbonato, si la saliva mantiene un pH alto y constante se favorece el proceso de remineralización de los dientes, en presencia de calcio libre en la saliva. De esta manera en pacientes con caries incipientes sin cavitación el proceso carioso es reversible siempre que haya un pH adecuado y calcio suficiente para ello.

La concentración de bicarbonato aumenta al aumentar el flujo salival, así como también su capacidad de neutralizar ácidos, por lo tanto, la presencia de bicarbonato logra disminuir el nivel ácido de los gérmenes cariogénicos, también la capacidad de desmineralización de la placa bacteriana será menor y sus efectos dañinos se minimizan.

El sistema bicarbonato es bajo en la saliva no estimulada y aumenta a medida que la saliva es estimulada.

En la saliva no estimulada, la concentración del buffer del fosfato inorgánico es más alto, mientras que el sistema bicarbonato / ácido carbónico es baja.

La capacidad buffer de la saliva está dada mayoritariamente por el ion bicarbonato, pero también existen otros mecanismos de menor trascendencia como el de la urea, proteínas ricas en arginina las que liberan amoníaco (elevando el pH).

Ejemplo:

En el plasma normal la concentración de $[\text{H}^+]$ es de 40 nmol/l. Para no utilizar estas unidades tan pequeñas, Sorensen propuso el concepto de pH, que es el logaritmo negativo de la concentración de $[\text{H}^+]$ expresada en mol/l.

El pH del plasma normal es $-\log 0.00000004 = 7.3979$ (aprox. 7.40).

Si el valor llega por debajo de 7.34 se considera un estado de acidosis, y si se encuentra por encima de 7.47 es un estado alcalosis. Si analizamos detenidamente el rango es muy reducido, es decir solamente se tiene un rango de 0.13.

Para ello es increíble como nuestro organismo tiene diferentes maneras de regular las sustancias ácidas o alcalinas. Una de ellas son las sustancias volátiles cuya regulación es a través de los pulmones. Por otro lado existen las sustancias no-volátiles que se regulan a través de los riñones.

Actividad Práctica

▪ **Método de Ericsson (1959)**

Es el método clásico para determinar la **capacidad buffer de la saliva**.

Para hacerlo se recolecta saliva, puede ser No Estimulada o Estimulada.

- Para recolectar la **saliva Estimulada** el alumno escogido de cada grupo deberá masticar un chicle (preferentemente aquellos sin azúcar, ej.: TopLine) como forma de estímulo. Se comienza a contar el tiempo y a medida que se va generando saliva se la va recolectando en un tubo o frasco de plástico limpio durante un total de **5 minutos**. Al finalizar los 5 minutos se detiene la recolección de saliva.
- Para recolectar la **saliva No Estimulada** se procede de manera similar, salvo que no se utiliza un chicle ni otra cosa en la boca. Se comienza a contar el tiempo y a medida que se va generando saliva se la va recolectando en un tubo o frasco de plástico limpio durante un total de **15 minutos**. Al finalizar los 15 minutos se detiene la recolección de saliva.

Si el tubo donde se recolecta la saliva es graduado (es decir que tiene marcas que indican diferentes medidas de volumen) se puede anotar el Volumen Total recolectado durante el tiempo indicado (5 min o 15 min).

Luego sabiendo este valor, se divide el Volumen Total por la cantidad de minutos y obtendremos **X** mililitros por minuto (ml/min). Esto nos dará una idea del **Flujo salival** de la persona.

Procedimiento:

1. Tomamos **1 mililitro** (ml) de la saliva recolectada y la transferiremos a un tubo limpio.
2. Posteriormente colocaremos en ese tubo **3 mililitros** (ml) una solución de **ácido clorhídrico** (HCl).

Se debe usar una concentración diferente de HCl dependiendo si la saliva recolectada fue Estimulada o No Estimulada.

En el caso de querer determinar la capacidad buffer de saliva Estimulada, se utiliza una solución de **HCl 0,005 Molar** (M). Y en el caso de que la saliva sea No Estimulada se utiliza una solución de **HCl 0,0033 Molar** (M).

3. Se mezcla el tubo conteniendo la saliva y el HCl invirtiéndolo un par de veces. Evitar hacerlo de forma muy enérgica. Para prevenir la formación de espuma se puede agregar 1 gota de 2-octanol.
4. Se mezcla por 20 minutos para remover el CO₂.
5. Se introduce el electrodo del pH metro en el tubo, se lee el valor de pH que indica el aparato y se anota.
(Aclaración: el pH metro debe ser calibrado utilizando soluciones de pH conocido antes de utilizarlo para realizar las mediciones correspondientes).
6. Utilizando la tabla que se encuentra a continuación, se establece si la Capacidad Buffer de la saliva de esa persona es Alta, Normal, Baja o Muy Baja.

Tabla de valor pH de saliva No Estimulada o Estimulada, y su evaluación
(evaluación alta significa mayor poder de remineralización).

	Valor pH final	Evaluación
Búffer para saliva no estimulada	Mas de 4,75 4,25 a 4,75 3,50 a 4,24 Menos de 3,50	Alto Normal Bajo Muy bajo
Búffer para saliva estimulada	Mas de 6,50 5,75 a 6,50 4,00 a 5,74	Alto Normal Bajo

Autoevaluación

1. ¿Qué componentes de la saliva le dan su capacidad buffer?
2. ¿Qué sistema buffer está presente preferentemente en la saliva estimulada?
3. ¿Qué determinamos con el Método de Ericsson? ¿Por qué esto es importante?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°4

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído).

Los tres constituyentes más importantes en la alimentación de una persona son los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Cuando se realiza una ingesta, de los nutrientes se obtiene la glucosa y esta depende de la insulina para poder ser aprovechada por las células.

La glucosa es el último eslabón de los carbohidratos ingeridos y tiene tres destinos principales: almacenarse en forma de glucógeno en hígado y músculos, convertirse en grasa o ser utilizada directamente. En este sentido, el hígado es el único órgano productor de glucosa ya que el glucógeno muscular se utiliza como fuente de energía en el mismo músculo.

Por otra parte, la regulación glucémica natural tiene por objetivo asegurar un perfecto equilibrio entre la producción de glucosa y su consumo, donde las principales hormonas implicadas en el control son la insulina, el glucagón, la hormona del crecimiento, los glucocorticoides, la adrenalina y la tiroxina.

El principal órgano encargado de que se realice la regulación glucémica es el páncreas, es el responsable de la digestión de las grasas, las proteínas y los carbohidratos de cadena larga, mediante enzimas y la regulación del nivel de glucosa sanguínea, mediante el glucagón y la insulina.

El páncreas tiene dos funciones principales, la función exocrina y la función endocrina. Las células exocrinas del páncreas producen enzimas que ayudan a la digestión. Cuando los alimentos ingresan al estómago, las glándulas exocrinas liberan enzimas dentro de un sistema de conductos que llegan al conducto pancreático principal. El conducto pancreático libera las enzimas en la primera parte del intestino delgado (duodeno), donde las enzimas ayudan en la digestión de las grasas, los carbohidratos y las proteínas de los alimentos.

La segunda función del páncreas es la función endocrina, la que envuelve la producción de hormonas o sustancias que se producen en una parte del organismo y que circulan en el torrente sanguíneo para influir en otra parte distinta del organismo. Las dos hormonas pancreáticas principales son la insulina y el glucagón. La insulina sirve para bajar el nivel de glucosa en la sangre (glucemia) mientras que el glucagón lo aumenta. Juntas, estas dos hormonas principales trabajan para mantener el nivel adecuado de glucosa en la sangre.

La diabetes es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar niveles altos de azúcar en sangre.

El azúcar en sangre (glucemia), cuando tiene valores por encima de lo normal, se lo denomina hiperglucemia, y cuando se sostiene en el tiempo puede dar lugar a complicaciones en diferentes órganos.

La diabetes es una enfermedad crónica, esto significa que acompaña toda la vida a la persona que la padece. Sin embargo, con un seguimiento y tratamiento adecuado se pueden prevenir complicaciones y llevar una vida normal.

- **Diabetes tipo 1:** el páncreas no produce insulina, por lo tanto, la glucosa no puede ingresar a las células. Generalmente comienza antes de los 30 años y su tratamiento requiere seguir un plan de alimentación adecuado y la aplicación de inyecciones de insulina todos los días.
- **Diabetes tipo 2:** es la **forma más común**. Si bien existe producción de insulina, esta es insuficiente y la misma actúa de forma incorrecta, de modo que el ingreso de la glucosa a las células se ve dificultado (insulinorresistencia). Si bien suele comenzar después de los 40 años, la enfermedad se observa en forma cada vez más frecuente en personas más jóvenes. Este tipo de diabetes se asocia a sobrepeso y obesidad, alimentación inadecuada, falta de actividad física y antecedentes familiares de diabetes tipo 2.

Algunos de los síntomas de niveles de glucosa en la sangre altos son:

- Aumento de la sed
- Orinar con más frecuencia
- Visión borrosa
- Cansancio
- Heridas que cicatrizan lentamente

Algunos de los síntomas de niveles de glucosa en la sangre bajos son:

- Ansiedad
- Sudor
- Temblores
- Hambre
- Confusión

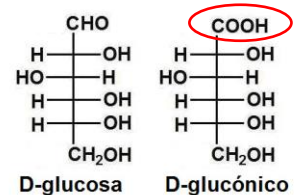


Actividad Práctica

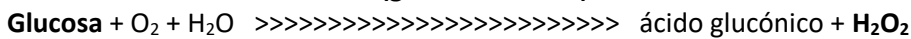
Se utilizará el kit diagnóstico comercial “Glicemia enzimática” de la empresa Wiener. Para la determinación de glucosa en suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo.

- Recuerde que puede acceder al protocolo del kit por internet (https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/glicemia_enzimatica_aa_liquida_sp.pdf)

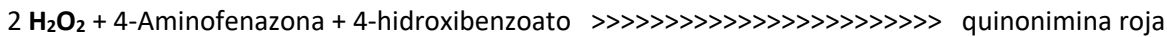
Fundamentos del Método



GOD (glucosa oxidasa)



POD (peroxidasa)



La **glucosa oxidasa (GOD)** es una enzima presente en el Reactivo A del kit, se utiliza acoplada a una reacción mediada por la **peroxidasa (POD)** (también presente en el Reactivo A del kit) para visualizar colorimétricamente el H₂O₂ formado. Este tipo de ensayo nos permite determinar la glucosa libre en el suero o plasma sanguíneo con finalidades diagnósticas.

La glucosa a determinar (presente en la muestra a analizar) es oxidada por la enzima Glucosa oxidasa (GOD) en el carbono 1 (Ac. Glucónico = es un ácido aldónico – ver teórico) y dando además como uno de los productos de la reacción Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂). Estas moléculas de H₂O₂ que se forman luego son utilizadas por la enzima Peroxidasa (POD) para oxidar un compuesto también presente en el Reactivo A del kit (el 4-hidroxibenzoato), dando como producto final Quinonimina roja. La quinonimina absorbe a **505 nm** y es directamente proporcional a la glucosa presente en la muestra.

La linealidad del método se extiende hasta 5,00 g/L de glucosa.

Importante

Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2 a 10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

MATERIAL REQUERIDO

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 µl
- Volumen de Reactivo A: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

Los volúmenes de Muestra y de Reactivo A pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 20 µl Muestra + 2 ml Reactivo A).

• **Procedimiento:**

En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	X	10 µl	x
Muestra	X	X	10 µl
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml
H2O	10 µl	X	X

Incubar 5 minutos en baño de agua a 37°C (Baño María) o 25 minutos entre 15 y 25°C.

Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) **llevando el aparato a cero con el Blanco.**

- El color de reacción final es estable 30 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = D \times f \quad \gg \gg \quad f = \frac{100 \text{ mg/dl}}{S}$$

Standard: solución de glucosa 100 mg/dl (1 g/l)

Donde "D" es la absorbancia leída en el espectrofotómetro a 505 nm del tubo "D" (Desconocido o muestra a determinar, en nuestro caso el suero o plasma).

Y "S" es la absorbancia leída en el espectrofotómetro a 505 nm del tubo "S" (Standard o solución de concentración conocida de glucosa, que viene con el kit).

VALORES DE REFERENCIA

Suero o plasma

Adultos: **74 - 106 mg/dl** (4,11 - 5,89 mmol/l)

Niños: 60 - 100 mg/dl (3,33 - 5,55 mmol/l)

Neonatos: 1 día: 40 - 60 mg/dl (2,22 - 3,33 mmol/l)

mayor a 1 día: 50 - 80 mg/dl (2,78 - 4,44 mmol/l)

Autoevaluación

1. ¿Cuál es el fundamento del método utilizado para medir la concentración de glucosa?
2. ¿Por qué es importante la utilización de un tubo Blanco?
3. ¿Cuál es el sentido de utilizar un tubo Standard?
4. ¿Cuál es la diferencia entre suero y plasma sanguíneo?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°5

LÍPIDOS: DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

Los lípidos son un conjunto de **moléculas orgánicas** (la mayoría biomoléculas) compuestas principalmente por **carbono e hidrógeno** y, en menor medida, **oxígeno**; aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno.

Tienen como característica principal el ser **hidrófobos** (insolubles en agua) y **solubles** en disolventes orgánicos como la bencina, el benceno y el cloroformo.

Los lípidos cumplen funciones diversas en los organismos vivos, entre ellas la de reserva energética (como los triglicéridos), la estructural (como los fosfolípidos de las bicapas) y la reguladora (como las hormonas esteroides).

La mayoría de los lípidos tiene algún tipo de carácter no polar, es decir, poseen una gran parte apolar o hidrofóbica ("que le teme al agua" o "rechaza el agua"), lo que significa que no interactúa bien con solventes polares como el agua, pero sí con la gasolina, el éter o el cloroformo.

Otra parte de su estructura es polar o hidrofílica ("que tiene afinidad por el agua") y tenderá a asociarse con solventes polares como el agua; cuando una molécula tiene una región hidrofóbica y otra hidrofílica se dice que tiene carácter anfipático.

Los lípidos son un grupo muy heterogéneo que usualmente se subdivide en dos, atendiendo a que posean en su composición ácidos grasos (lípidos saponificables) o no los posean (lípidos insaponificables):

Lípidos saponificables

- **Simples.** Son los que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno.

- **Acilglicéridos.** Son ésteres de ácidos grasos con glicerol. Cuando son sólidos se les llama grasas y cuando son líquidos a temperatura ambiente se llaman aceites.

- **Céridos (ceras).**

- **Complejos.** Son los lípidos que, además de contener en su molécula carbono, hidrógeno y oxígeno, contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra biomolécula como un glúcido. A los lípidos complejos también se les llama lípidos de membrana pues son las principales moléculas que forman las membranas celulares.

- Fosfolípidos.

- Fosfoglicéridos.

- Fosfoesfingolípidos.

- Glucolípidos.

- Cerebrósidos.

- Gangliósidos.

Lípidos insaponificables

- Terpenoides.

- Esteroides.

- Prostaglandinas.

Funciones biológicas

- **Función de reserva energética.** Los triglicéridos son la principal reserva de energía de los animales ya que un gramo de grasa produce 9,4 kilocalorías en las reacciones metabólicas de oxidación, mientras que las proteínas y los glúcidos solo producen 4,1 kilocalorías por gramo.

- **Función estructural.** Los fosfolípidos, los glucolípidos y el colesterol forman las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Los triglicéridos del tejido adiposo recubren y proporcionan consistencia a los órganos y protegen mecánicamente estructuras o son aislantes térmicos.

- **Función reguladora, hormonal o de comunicación celular.** Las vitaminas liposolubles son de naturaleza lipídica (terpenos, esteroides); las hormonas esteroides regulan el metabolismo y las funciones de reproducción; los glucolípidos actúan como receptores de membrana; los eicosanoides poseen un papel destacado en la comunicación celular, inflamación, respuesta inmune, etc.

- **Función transportadora.** El transporte de lípidos desde el intestino hasta su lugar de destino se realiza mediante su emulsión gracias a los ácidos biliares y a las lipoproteínas.

La **Colesterol Esterasa (CHE)** y la **Colesterol Oxidasa (CHOD)** son enzimas presentes en el Reactivo A del kit, se utiliza acoplada a una reacción mediada por la **peroxidasa (POD)** (también presente en el Reactivo A del kit) para visualizar colorimétricamente el H₂O₂ formado.

Los ésteres de colesterol son degradados por la Colesterol Esterasa (CHE), dando como productos Colesterol libre y Acidos grasos. Este colesterol obtenido es oxidado por la Colesterol Oxidasa (CHOD) para formar Colesten-3-ona y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Finalmente es este H₂O₂ el que se detecta por acción de la Peroxidasa (POD) para formar un compuesto de color rojo, midiendo la absorbancia a 505 nm, siendo directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra. La reacción es lineal hasta 5 g/l de colesterol.

Importante

Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2 a 10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

MATERIAL REQUERIDO

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de Reactivo A: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

Los volúmenes de Muestra y de Reactivo A pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 20 ul Muestra + 2 ml Reactivo A).

• **Procedimiento:**

En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	X	10 µl	X
Muestra	X	x	10 µl
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Incubar 5 minutos en baño de agua a 37°C (Baño María) o 20 minutos a 25°C.

Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) **llevando el aparato a cero con el Blanco.**

Lecturas del Blanco superiores a 0,160 D.O. son indicio de deterioro de los reactivos. En tal caso desechar.

El color de reacción final es estable 30 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{Colesterol (g/l)} = D \times f \quad \gg \gg \quad f = \frac{2,00 \text{ g/l}}{S}$$

Standard: solución de colesterol 2 g/l

VALORES DE REFERENCIA

Deseable: < 2,00 g/l

Moderadamente alto: 2,00 - 2,39 g/l

Elevado: ≥ 2,40 g/l

Sustancias interferentes conocidas:

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 µl
- Volumen de Reactivo A: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

• Procedimiento:

En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	x	10 µl	X
Muestra	x	x	10 µl
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar, incubar 5 minutos a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Enfriar y leer en espectrofotómetro a 505 nm **llevando el aparato a cero con agua destilada**.

El color de reacción final es estable 60 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

- Corregir las lecturas con el Blanco de reactivos y usar las lecturas corregidas para los cálculos.

$$TG \text{ (g/l)} = D \times f \quad \gg \gg \quad f = \frac{2,00 \text{ g/l}}{S}$$

Standard: solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivalente a 2 g/l de trioleína).
La trioleína es un triglicérido simétrico derivado del glicerol y tres unidades del ácido oleico de ácidos grasos insaturados.

VALORES DE REFERENCIA

- Deseable: < 1,50 g/l
- Moderadamente alto: 1,50 - 1,99 g/l
- Elevado: 2,00 – 4,99 g/l
- Muy elevado: ≥ 5,00 g/l

Importante: los triglicéridos en suero son estables 3 días en refrigerador (2-10°C). No congelar.

Autoevaluación

1. ¿Cuáles son las diferencias y semejanzas en el fundamento del método utilizado para medir la concentración de colesterol y triglicéridos? ¿Y con el utilizado para medir la concentración de glucosa?
2. ¿Cuál es la diferencia entre llevar el aparato a cero utilizando agua destilada o utilizando el tubo denominado Blanco?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°6

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas formadas por unidades estructurales llamadas aminoácidos. Siempre contienen en su estructura carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y muchas veces también azufre.

Los aminoácidos son moléculas orgánicas compuestas por un grupo funcional amino(-NH₂) en un extremo y un grupo funcional carboxilo (-COOH) en el otro extremo. Existen veinte aminoácidos fundamentales, que, en distintas combinaciones, constituyen la base de las proteínas.

Para formar las proteínas, los aminoácidos se unen entre sí por enlaces peptídicos, es decir, la unión del extremo con el grupo funcional amino (-NH₂) de un aminoácido, con el extremo que contiene el grupo funcional carboxilo (-COOH) de otro aminoácido. Así, se van enlazando los aminoácidos en distintas combinaciones y tantas veces como sea necesario, hasta formar cada proteína específica.

Las proteínas son muy importantes para el organismo, ya que participan en todos los procesos que realiza. Se pueden clasificar según:

Su composición química:

Proteínas simples. También conocidas como holoproteínas, están conformadas solo por aminoácidos o sus derivados.

Proteínas conjugadas. También conocidas como heteroproteínas, su estructura está formada, además de por aminoácidos, por otras sustancias como metales, iones, entre otras.

Su forma tridimensional (distribución en el espacio de su estructura):

Proteínas fibrosas. Su estructura tiene forma de fibras largas y son insolubles en agua.

Proteínas globulares. Su estructura es enrollada y compacta, con casi forma esférica y suelen ser solubles en agua.

Las proteínas son imprescindibles para el cuerpo humano y su crecimiento. **Algunas de sus funciones son:**

Estructural. Muchas proteínas son las encargadas de dar forma, elasticidad y soporte a las células y, por tanto, a los tejidos. Por ejemplo: el colágeno, la elastina y la tubulina.

Inmunológica. Los anticuerpos son proteínas que actúan como defensa contra agentes externos o infecciones que afectan al organismo humano y de los animales.

Motora. La miosina y la actina son proteínas que permiten el movimiento. Además, la miosina forma parte del anillo contráctil en la división celular, permitiendo la citocinesis (separación de las células mediante estrangulación).

Enzimática. Algunas proteínas aceleran ciertos procesos metabólicos. Algunos ejemplos de proteínas enzimáticas son la pepsina y la sacarasa.

Homeostática. La homeostasia es el mantenimiento del equilibrio interno en los organismos. Las proteínas con función homeostática, junto a otros sistemas reguladores, mantienen la regulación del pH de estos organismos.

Reserva. Muchas proteínas son fuente de energía y carbono para muchos organismos. Por ejemplo: la caseína y la ovoalbúmina.

La estructura de una proteína se puede clasificar en varios niveles de organización y distribución de las unidades que la componen, según:

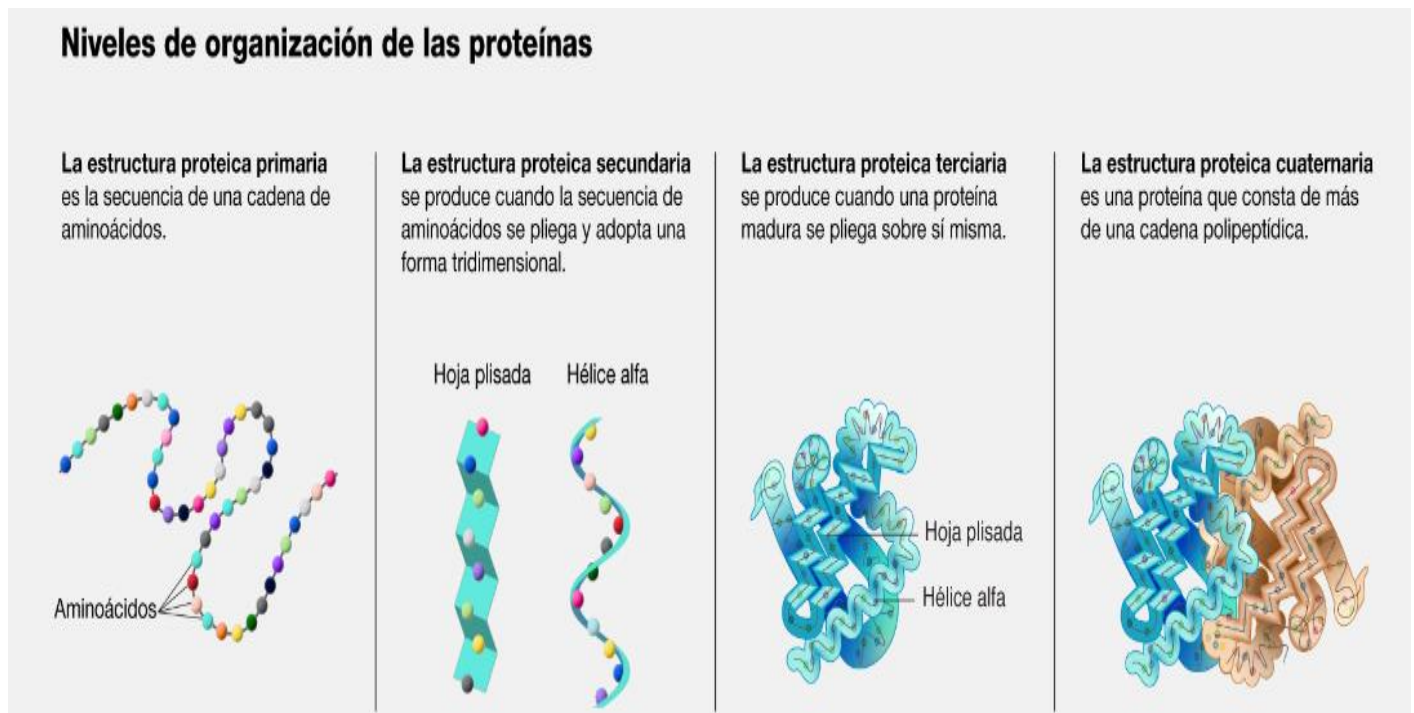
Estructura primaria. Es la secuencia de aminoácidos que componen una proteína (se refiere solo a los tipos de aminoácidos que forman su estructura y el orden en que están enlazados).

Estructura secundaria. Describe la orientación local de los diferentes segmentos que componen una proteína. Por lo general, aunque existen otros tipos, los principales son: Hélice alfa (es un segmento con estructura en forma de espiral sobre sí misma) y Hoja beta plegada (es un segmento con forma estirada y plegada, similar a un acordeón). Las formas de ambos segmentos están generadas y estabilizadas principalmente por interacciones por puente de hidrógeno.

Estructura terciaria. Consiste en la disposición en el espacio de la estructura secundaria, que puede amoldarse para formar proteínas globulares o fibrosas. La estructura terciaria se estabiliza por interacciones de van der Waals, por puentes disulfuro entre los aminoácidos que contienen azufre, por fuerzas hidrófobas y por interacciones entre radicales de los aminoácidos.

Estructura cuaternaria. Se forma por la unión de varios segmentos peptídicos, es decir, está compuesta por la unión de varias proteínas. Las proteínas con estructura cuaternaria también son llamadas proteínas oligoméricas y no constituyen la mayoría de las proteínas. Esta estructura se estabiliza por el mismo tipo de interacciones que estabilizan a la estructura terciaria.

Cuando las proteínas son sometidas a altas temperaturas, a cambios drásticos de pH, a la acción de algunos solventes orgánicos, entre otros factores, se desnaturalizan. La desnaturalización es la pérdida de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, lo que hace que quede la cadena polipeptídica sin ninguna estructura tridimensional fija, podría decirse, queda reducida a su estructura primaria. Si la proteína recupera estas estructuras (regresa a su forma original) entonces se renaturaliza.



ACTIVIDAD PRÁCTICA

FUNDAMENTOS DEL METODO

Determinación de Proteínas Totales: Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Determinación de Albúmina: La albúmina reacciona específicamente -sin separación previa- con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCF), en presencia de un exceso de colorante, en medio tamponado a pH 3,8. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del Blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.

REACTIVOS PROVISTOS

Reactivo A: complejo EDTA/Cu 13 mmol/l en hidróxido de sodio 875 mmol/l y alquil aril poliéter (AAP).

Reactivo B: solución de 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (en polioxietilén lauril éter).

Standard (Suero Patrón): solución de albúmina y globulinas de origen bovino, con título conocido de proteínas y albúmina. Consultar los valores asignados en el rótulo, debido a que los mismos son lotes específicos.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo con la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables a temperatura ambiente (< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.
Standard: es estable a temperatura ambiente (no mayor de 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.
Una vez abierto, debe conservarse en refrigerador.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: debe obtenerse suero libre de hemólisis.

b) Sustancias interferentes conocidas:

- En la determinación de Proteínas Totales no se observa interferencia por bilirrubina hasta 100 mg/l, ni hemólisis ligera y en ningún caso se presenta turbiedad por quilomicrones.

- En la determinación de Albúmina, no se observan interferencias por hemólisis moderada, bilirrubina hasta 200 mg/l ni lipemia hasta 20 g/l. Debido a que no interfieren las globulinas, en esta determinación no se requiere desproteínización previa.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: si no se procesa inmediatamente el suero puede conservarse hasta 3 días en refrigerador (2-10 °C) o una semana en congelador.

- **DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES**

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 540 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm).

- Temperatura de reacción: 37 °C

- Tiempo de reacción: 15 minutos

- Volumen de muestra: 50 ul

- Volumen de Reactivo A: 3,5 ml

- Volumen final de reacción: 3,55 ml

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:			
	B	S	D
Agua destilada	50 ul	-	-
Standard	-	50 ul	-
Muestra	-	-	50 ul
Reactivo A	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Mezclar con varilla. Incubar 15 minutos a 37°C. Leer en espectrofotómetro a 540 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 12 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

- **DETERMINACION DE ALBUMINA**

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 625 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-650 nm).

- Temperatura de reacción: 15-28 °C

- Tiempo de reacción: 10 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de Reactivo B: 3,5 ml
- Volumen final de reacción: 3,51 ml

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color es estable 20 minutos por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

PROCEDIMIENTO

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Standard	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo B	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Mezclar con varilla. Mantener los tubos entre 15 y 28°C durante 10 minutos. Leer en espectrofotómetro a 625 nm o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-650 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Empleando el Standard tal como se indica en PROCEDIMIENTO, los cálculos se realizan como sigue:

Proteínas Totales (g/dl) = D x f	$f = \frac{P.T. (g/dl)}{S}$
Albúmina (g/dl) = D x f	$f = \frac{Alb. (g/dl)}{S}$

VALORES DE REFERENCIA

Proteínas totales: 6,1 a 7,9 g/dl

Albúmina: 3,5 a 4,8 g/dl

Relación A/G: 1,2 a 2,2

Autoevaluación

1. ¿Cuáles son las diferencias entre los métodos utilizados para medir la concentración de Proteínas totales y la concentración de Albúmina?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°7

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA

Las enzimas son proteínas globulares formadas por una o más cadenas polipeptídicas[74] plegadas, creando una “hondonada” donde encaja el sustrato y tiene lugar la reacción. Esta zona de la enzima se denomina centro activo y sólo unos pocos aminoácidos están implicados en él. La proximidad de los aminoácidos [75] en el centro activo está determinada por la estructura terciaria, aunque también pueden ocupar posiciones adyacentes en la estructura primaria. En una enzima con estructura cuaternaria, los aminoácidos del centro activo pueden encontrarse incluso en diferentes cadenas. La configuración tridimensional del centro activo es complementaria a la del sustrato y posee una distribución complementaria de sus cargas sobre la superficie de unión. Es decir, si una región del sustrato tiene una carga negativa, la zona correspondiente del centro activo tendrá una carga positiva y viceversa.

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas.

El estudio de la cinética y de la dinámica química de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por fármacos o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas.

Las dos propiedades cinéticas más importantes de una enzima son:

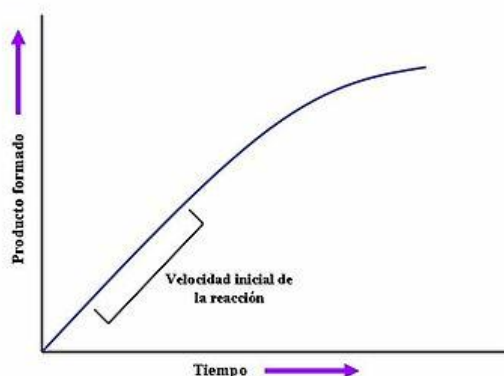
- El tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular.
- La máxima velocidad de reacción que pueda alcanzar.

El conocimiento de estas propiedades hace posible hipotetizar acerca del comportamiento de una enzima en el ambiente celular y predecir cómo responderá frente a un cambio de esas condiciones.

Ensayo enzimático

Un ensayo enzimático es un procedimiento, llevado a cabo en un laboratorio, mediante el cual se puede medir la velocidad de una reacción enzimática.

Como las enzimas no se consumen en la reacción que catalizan, los ensayos enzimáticos suelen medir los cambios experimentados bien en la concentración de sustrato (que va decreciendo), bien en la concentración de producto (que va aumentando).



En la figura se puede observar la típica evolución de una curva obtenida en un ensayo enzimático.

Inicialmente, la enzima transforma el sustrato en producto siguiendo un comportamiento lineal. A medida que avanza la reacción, se va agotando la cantidad de sustrato y va disminuyendo la cantidad de producto que se genera por unidad de tiempo (disminuye la velocidad de la reacción), lo que se manifiesta en forma de curva asintótica en la gráfica.

Dependiendo de las condiciones del ensayo y del tipo de enzima, el período inicial puede durar desde milisegundos hasta horas. Los ensayos enzimáticos suelen estar estandarizados para que el período inicial dure en torno a un minuto, para llevar a cabo las medidas más fácilmente.

Factores fisicoquímicos que pueden modificar la actividad enzimática

- **Temperatura:** las enzimas son sensibles a la temperatura pudiendo verse modificada su actividad por este factor. Los rangos de temperaturas óptimos pueden llegar a variar sustancialmente de unas enzimas a otras.

Normalmente, a medida que aumente la temperatura, una enzima verá incrementada su actividad hasta el momento en que comience la desnaturalización de la misma, que dará lugar a una reducción progresiva de dicha actividad.

- **pH:** el rango de pH óptimo también es muy variable entre diferentes enzimas. Si el pH del medio se aleja del óptimo de la enzima, esta verá modificada su carga eléctrica al aceptar o donar protones, lo que modificará la estructura de los aminoácidos y por tanto la actividad enzimática.
- **Concentración salina:** al igual que en los casos anteriormente mencionados, la concentración de sales del medio es crucial para una óptima actividad enzimática. Una elevada concentración o una ausencia de sales en el medio pueden impedir la actividad enzimática, ya que las enzimas precisan de una adecuada concentración de iones para mantener su carga y su estructura.

Unidades enzimáticas

Las cantidades de enzima pueden ser expresadas en moles, como las de cualquier otro compuesto químico, o pueden ser cuantificadas en términos de actividad enzimática.

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones, que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad.

La actividad expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, teniendo en cuenta el volumen de reacción.

En el Sistema Internacional de Unidades la unidad para la actividad catalítica es el katal (kat), pero es una unidad demasiado grande y suele usarse la unidad de actividad enzimática (UI).

1 kat = 1 mol sustrato convertido $\times s^{-1} = 6 \times 10^7$ UI

1 UI = 1 μ mol sustrato convertido $\times \text{min}^{-1} = 16,67$ nkat

Según la fase de la reacción estudiada

Todos los ensayos enzimáticos miden el sustrato consumido o el producto generado en la reacción durante un tiempo. Existe un gran número de métodos diferentes para medir la concentración de sustratos y productos, y muchas enzimas pueden ser ensayadas de diferentes maneras.

En este práctico determinaremos la actividad enzimática de la enzima de origen pancreático Amilasa, que se encuentra presente en sangre.

La **amilasa**, producida principalmente en el páncreas exocrino y en las glándulas salivales, escinde los enlaces α -1-4 glucosídicos de los polisacáridos (almidón y glucógeno). En el suero se detectan 8 isoenzimas de α -amilasa, provenientes de páncreas, glándulas salivales, mucosa del intestino delgado, glándulas mamarias, ovarios y testículos. La amilasa presente en la sangre se elimina a través de la orina. Grandes cantidades de amilasa también se encuentran en los derrames pleurales y peritoneales que se producen en el curso de una pancreatitis aguda. Para fines de diagnóstico se determina la actividad total de amilasa o la actividad de su isoenzima pancreática.

Utilidad clínica

Causas de valores elevados

- 1) pancreatitis aguda y exacerbación de la pancreatitis crónica: el grado de aumento de la actividad de la amilasa no se correlaciona con la gravedad del daño pancreático
- 2) otras enfermedades agudas del abdomen: colecistitis, perforación de úlcera duodenal, obstrucción
- 3) enfermedades de las glándulas salivales
- 4) enfermedad renal crónica
- 5) enfermedades hepáticas
- 6) alcoholismo
- 7) algunas neoplasias malignas: cáncer de bronquio, tiroides, hígado, intestino grueso, ovario, próstata
- 8) macroamilasemia: presencia de amilasa en complejos macromoleculares (p. ej. formados con inmunoglobulinas) que reduce la eliminación renal de amilasa; puede acompañar, entre otros, a la enfermedad celíaca, las gammopatías monoclonales, o a los linfomas

Donde ΔA (Delta Absorbancia) es igual a la Absorbancia de la segunda lectura (a los 2 minutos de incubación) menos la Absorbancia de la primera lectura (al minuto de incubación).

$$\Delta A = Abs_{(2 \text{ minutos})} - Abs_{(1 \text{ minuto})}$$

Y el factor a utilizar depende de la temperatura en que realizamos la incubación y el volumen de Reactivo A y de muestra:

Temperatura	Reactivo A	Muestra	Factor
25-30°C	2 ml	100 ul	1.628
	1 ml	50 ul	1.628
37°C	2 ml	50 ul	3.178
	1 ml	20 ul	3.953

VALORES DE REFERENCIA

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Suero hasta	84 U/l	100 U/l	125 U/l

Autoevaluación

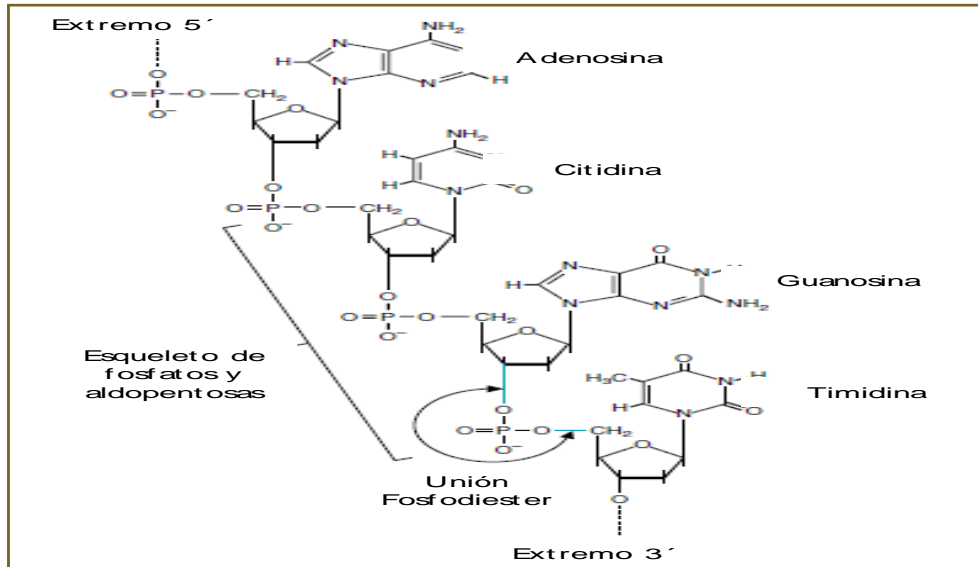
1. Dado que las enzimas no se consumen en la reacción que catalizan, ¿qué cambios se miden en los ensayos enzimáticos?
2. ¿Cuáles factores fisicoquímicos pueden modificar la actividad enzimática? ¿Cómo relacionamos esto con la cantidad de muestra a usar en nuestro protocolo si hacemos la reacción a 25-30°C o a 37°C?
3. ¿Cuál es el fundamento del método utilizado?
4. ¿Por qué no se podría pipetear el Reactivo A con la boca?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°8

EXTRACCIÓN DE ADN SALIVAL

El ADN (ácido desoxirribonucleico) se encuentra dentro del núcleo de las células eucariotas y contienen toda nuestra información genética. Cada célula de nuestro cuerpo (excepto los glóbulos rojos) tiene ADN. Salvo que sean gemelos idénticos, nadie en el mundo tiene la misma información genética.

La estructura del ADN es una doble hélice y está constituida por nucleótidos (desoxiribosa, base nitrogenada y fosfato) que se disponen en pares a lo largo de ambas hebras de la hélice. El orden de estos nucleótidos en la hebra de ADN constituye su secuencia.



Para estudiar el ADN los investigadores deben recoger muestras de las personas. Una de las mejores muestras de ADN es la saliva porque contiene células de la boca y mejillas. Existen muchas maneras de obtener saliva para estudiar el ADN (en teléfonos, sobres, cepillos de dientes, colillas de cigarrillos y todo aquello que pueda haber estado en contacto con la saliva o la boca).

El estudio del ADN permite localizar genes específicos que causan enfermedades y aprender como nuestro organismo funciona en base a nuestras características genéticas.

Actividad Práctica:

En este experimento, los estudiantes extraerán ADN de su saliva.

Fundamento del método

La sal en disolución actúa disminuyendo la solubilidad de las proteínas, lo que hace que precipiten y se separen más fácilmente del ADN para poder obtenerlo con una mayor pureza.

El detergente utilizado en el experimento tiene como función destruir las membranas celulares del tejido vivo que estamos utilizando. El detergente disuelve las grasas o lípidos, que es el componente principal de la membrana plasmática y nuclear de las células. Al romperse las membranas celulares se permite la salida del ADN al exterior.

El ADN es una molécula muy larga y tiende agruparse, de ahí la facilidad para retirarla. Para aislar el ADN hay que hacer que precipite en alcohol, ya que el ADN es soluble en agua, pero cuando se encuentra en alcohol precipita. Por este motivo, nuestras hebras de ADN comienzan a hacerse visibles en la interfase entre la mezcla y el alcohol.

Además de permitirnos distinguirlo, el alcohol separa el ADN de otros componentes celulares, los cuales quedan en la solución acuosa.

MATERIAL REQUERIDO

- Muestra de saliva recién recolectada.

- H₂O
- SDS al 10% (Dodecilsulfato sódico)
- NaCl 0,1 M
- Etanol frío

Importante: Coloque un recipiente con alcohol en el congelador al menos una hora antes del inicio del experimento. Mantenga el alcohol frío durante el experimento o el experimento no funcionará.

- **Procedimiento:**

- 1) En un vaso colocar 1 ml de NaCl + 4 ml de H₂O.
 - 2) Colocar la solución salina en la boca y realizar buches durante un minuto.
 - 3) Pasar la solución nuevamente de la boca al vaso.
 - 4) Agregar 0,5 ml de SDS al 10%.
 - 5) Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
 - 6) Pasar la mezcla a un tubo grande de vidrio.
 - 7) Agregar 15 ml de etanol frío por las paredes del tubo despacio (para que se forme una capa) y esperar hasta que se formen pequeñas burbujitas e hilos blancucinos.
- Podrá atrapar los hilos de ADN con un gancho sumergiéndolo con cuidado a través de las dos capas. Si no funciona, mueva suavemente el vaso varias veces hasta que se mezcle el alcohol. El ADN precipitado parecerá una pequeña bola de hilo blanco.
Una vez cogido el ADN trasládalo a un vaso con alcohol para verlo mejor y para mantenerlo.



Autoevaluación

1. Si pudiera recolectar saliva pura de una persona, ¿podré extraer ADN?
2. ¿De qué otros lugares puedo realizar una extracción de ADN?
3. ¿Cuál es el objetivo de usar un detergente para la extracción de ADN de una célula?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°9

COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS

El sistema de coagulación junto con el sistema fibrinolítico y las plaquetas, sin olvidarnos del endotelio vascular, son los responsables de mantener la Homeostasis hemostática (mecanismo destinado a mantener la sangre en los vasos y la reparación rápida de cualquier ruptura vascular sin comprometer la fluidez de la sangre).

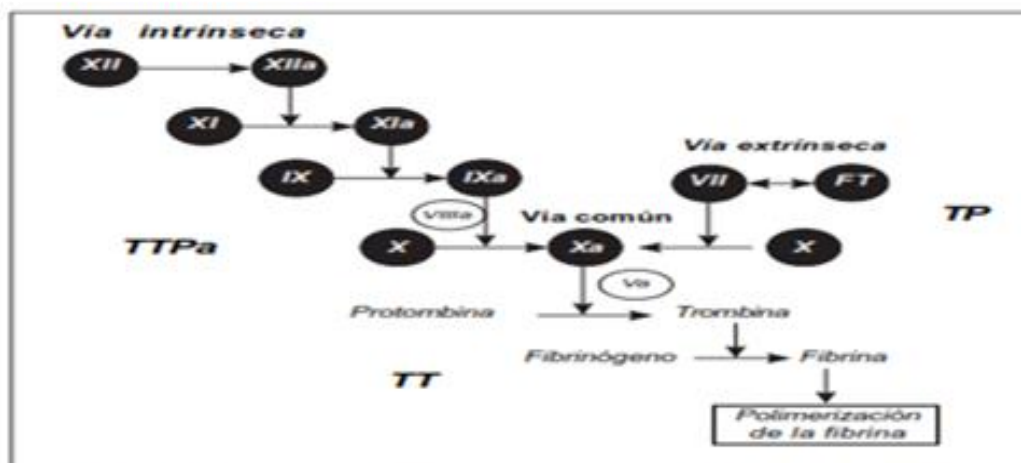
El desequilibrio producido en cualquier nivel de lo antes mencionado conduciría al desarrollo de enfermedades con sangrados excesivos y en otros casos a cuadros de trombosis. De este modo en aquellas personas que tengan algún tipo de manifestaciones clínicas o se sospeche de alguna alteración en la hemostasia, los especialistas solicitarán estudios de los mecanismos hemostáticos.

Se sabe ahora que las patologías de la hemostasia pueden ser adquiridas o hereditarias, y eso ha ampliado más el campo de análisis de las distintas sustancias y sus metabolitos que forman parte del mecanismo hemostático. Al respecto es importante conocer las bases del mecanismo de coagulación y fibrinólisis para poder saber que pruebas de laboratorio se deben aplicar en cada caso.

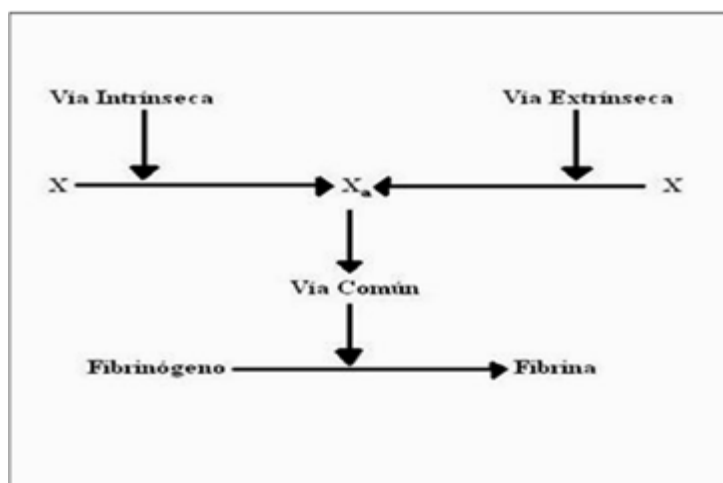
- La **cascada de coagulación** se divide para su estudio, clásicamente en tres vías: La **Vía Intrínseca**, la **Vía Extrínseca** y la **Vía Común**.

Las vías intrínseca y extrínseca son las vías de iniciación de la cascada, mientras que la vía común es hacia donde confluyen las otras dos desembocando en la conversión de fibrinógeno en fibrina.

Esta división es un tanto arbitraria y tiene más que ver con las deficiencias de las técnicas que en su momento se utilizaron para desentrañar los mecanismos implicados, que con lo que ocurre realmente en una lesión vascular; ya que en este último caso se establecen varias interrelaciones entre las vías de iniciación.



Esquema de la coagulación "en cascada". Se indican las fases de la hemostasia que evalúan las pruebas básicas de escrutinio: TP (vía extrínseca), TTPa (vía intrínseca) y TT (vía común).



Vía intrínseca

Recibe este nombre debido a que antiguamente se pensaba que la sangre era capaz de coagular "intrínsecamente" por esta vía sin necesidad de contar con la ayuda de factores externos.

Actualmente se sabe que esto no es exactamente así. De hecho la vía extrínseca es la que realmente inicia el proceso y la vía intrínseca sirve de amplificación y seguridad del proceso hemostático.

Vía extrínseca

Recibió este nombre debido a que fue posible notar desde un primer momento que la iniciación de esta vía requería de factores ajenos a la sangre.

Cuando la sangre entra en contacto con tejidos lesionados o se mezcla con extractos de tejidos, se genera muy rápidamente factor Xa. En este caso la activación de la proenzima X es mediada por un complejo formado por factor VII, Ca^{2+} y Factor Tisular (FT) unido a fosfolípidos provenientes de las membranas celulares rotas y de las plaquetas.

El factor tisular es una glicoproteína sintetizada en el endotelio de los vasos sanguíneos de todos los tejidos, aunque es especialmente abundante en pulmón, cerebro y placenta. El factor tisular se encuentra normalmente "secuestrado" en el interior de las células endoteliales y es secretado en respuesta a una lesión, o bajo el efecto de algunas citoquinas tales como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleucina 1 (IL-1); o por endotoxinas bacterianas.

La vía extrínseca es muy rápida, se cumple en apenas unos segundos y comprende dos pasos; mientras que la intrínseca insume varios minutos.

Vía común

Llegando al punto en que se activa el factor X, ambas vías confluyen en la llamada vía común.

La vía común termina con la conversión de fibrinógeno en fibrina, y el posterior entrecruzamiento de la misma estabilizando el coágulo.

La vía común implica tres etapas:

1) Formación de trombina

La trombina (también llamada factor IIa) es una proteasa generada por la ruptura de la cadena proteica de la proenzima protrombina (factor II).

2) Formación de fibrina

El fibrinógeno (factor I) es una glicoproteína compuesta por seis cadenas polipeptídicas: dos A-alfa, dos B-beta y dos gammas.

3) Entrecruzamiento de la fibrina

Los haces paralelos de fibrina polimerizada forman una asociación laxa, que se encuentra en equilibrio con la forma monomérica de la molécula; por lo que sería imposible que cumplieran su papel de formar un coágulo estable sin reforzar esta estructura por medio de enlaces covalentes entre hebras vecinas. La formación de estos "puentes" covalentes intercatenarios es catalizada por la enzima transglutaminasa (conocida también como factor XIIIa).

Varios mecanismos intervienen en la regulación de la cascada de reacciones

- El flujo sanguíneo normal, arrastra a los factores activados, diluyendo su acción e impidiéndoles acelerarse. Esta es una de las razones por las cuales cuando existe estasis del flujo sanguíneo se favorece la formación de trombos.
- El hígado actúa como un filtro quitando de la sangre en circulación los factores activados e inactivándolos.
- Existen además algunas proteasas que degradan específicamente a ciertos factores activados, y otras que ejercen acciones inhibitorias sobre factores activos.

- **Anticoagulantes**

Un anticoagulante es, como su nombre lo indica, una sustancia química que retrasa o impide la coagulación de la sangre, ya sea en el interior de un organismo (In Vivo) o en el exterior (In Vitro)

Existen dos tipos principales de anticoagulantes, los anticoagulantes para uso "In Vitro" y los que tienen empleo "In Vivo", entre estos últimos se encuentran los medicamentos con acción anticoagulante.

En general los anticoagulantes para uso In Vitro actúan como quelantes del ion Ca^{2+} , de manera tal que este no puede participar en la formación de los complejos que activan al factor X, y por lo tanto se interrumpe la cascada de coagulación casi en su inicio.

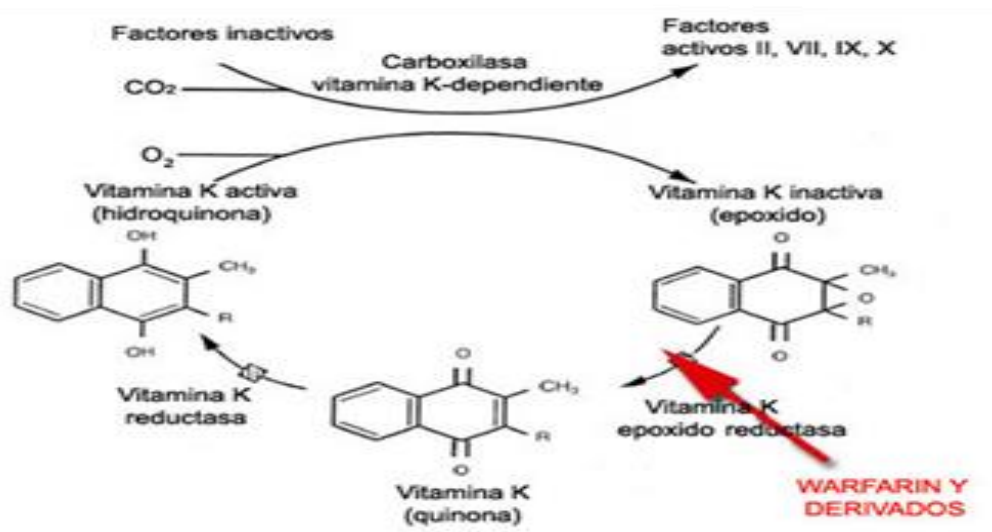
Para uso *In Vitro*

- **EDTA** (ácido etilendiaminotetraacético). Esta sustancia actúa mediante un efecto quelante sobre el ion calcio Ca^{2+} , lo que impide la formación de los complejos procoagulantes en los que este ion participa.
- **Heparina Sódica**. Es un anticoagulante fisiológico que actúa impidiendo que la protrombina se transforme en trombina.
- **Citrato Trisódico**. Actúa impidiendo que el calcio se ionice, evitando así la coagulación. Se utiliza principalmente para realizar pruebas de hemostasia; así como también para medir la velocidad de eritrosedimentación.

Para uso *In Vivo* (medicamentos anticoagulantes)

Este tipo de medicamentos tienen utilidad en aquellas patologías causadas por un trombo sanguíneo, ya sea para facilitar su disolución (trombolisis) o bien para prevenir que los trombos se repitan.

- La **heparina** alarga el tiempo de coagulación, se administra generalmente mediante inyección subcutánea o endovenosa. La Heparina se utiliza cuando se precisa de acción anticoagulante rápida y por poco tiempo. La acción de la antitrombina es notablemente aumentada por la heparina. La heparina se encuentra en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los gránulos de las células cebadas, tiene una poderosa acción anticoagulante ya que facilita la unión de la antitrombina III con los factores procoagulantes activos.
- **Anticoagulantes dicumarínicos**. Reciben este nombre genérico un grupo de compuestos derivados del Dicumarol (un compuesto extraído del trébol dulce) entre los que se encuentran el Acenocumarol y la Warfarina. Estos medicamentos presentan la ventaja de poder ser administrados por vía oral y de poseer un efecto prolongado en el tiempo, con gran variabilidad interindividual, por ello necesitan controles periódicos para su ajuste terapéutico. Todos ellos son inhibidores de la vitamina K (aVK). Debido a que la vitamina K interviene como cofactor enzimático en la síntesis de los factores II, VII, IX y X (concretamente en la gamma-carboxilación de estos)

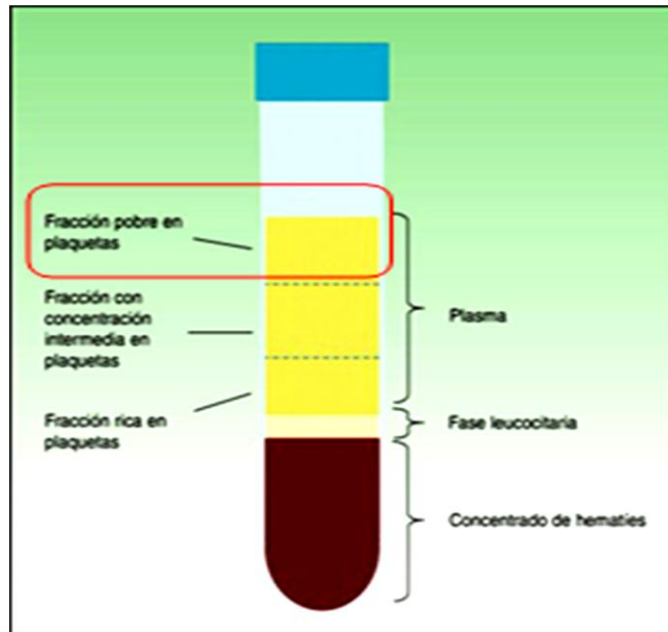


Actividad Práctica:

Existen diferentes pruebas que miden el estado general de la coagulación y de la actividad fibrinolítica.

❖ Pruebas de coagulación:

Importante: Todas las pruebas de coagulación se realizan con plasma "citratado" (utilizando citrato de sodio 0,1 M, en una proporción de 1/10 = 1 ml de anticoagulante y 9 ml de sangre).



- **Tiempo de coagulación con plasma pobre en plaquetas:**

Esta prueba mide globalmente la coagulación, en donde intervienen todos los factores plasmáticos y las plaquetas.

Se toma el plasma obtenido de sangre centrifugada a 3.000 rpm por 15 min.

Se coloca en un tubo de vidrio 0,1 ml de plasma y se agrega 0,1 ml de CaCl_2 0,025 M, en ese momento se pone en marcha el cronómetro y se toma el tiempo hasta que se observa un coágulo.

El valor normal es de 70 a 170 segundos.

- **Tiempo de retracción del coágulo:**

Esta prueba nos indica cómo está funcionando en general el sistema de coagulación incluida la mecánica plaquetaria. Para ello se saca sangre sin anticoagulante.

Se pone la sangre en un tubo y se deja coagular a 37°C, observando cómo se produce la retracción del coágulo, con la exudación del suero.

Lo normal es observar parte de los glóbulos rojos pegados sobre la pared del tubo.

- **Tiempo de coagulación activado:**

Esta prueba se realiza poniendo en contacto sangre con una superficie activa como tierra de diatomeas o caolín (el caolín es la arcilla en la que predomina el mineral caolinita; de color blanco). Estas sustancias hacen que los factores de coagulación se adhieran y desencadenen la hemostasia, actuando como superficies extrañas.

Se toman 0,2 ml de sangre y se le agrega la sustancia activante (caolín, una pequeña cantidad).

Se toma el tiempo que demora en coagular.

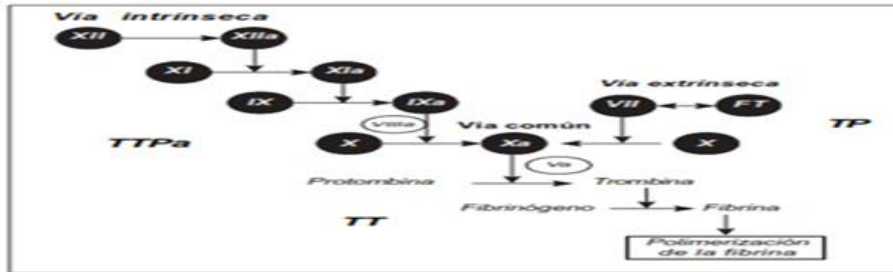
Valor normal 75 - 90 seg.

- **Tiempo de Tromboplastina parcial activada (TTPa) o KPTT (Kaolin activated Partial Tromboplastin Time):**

Esta prueba se realiza para observar la vía intrínseca de coagulación.

- La **tromboplastina** es una proteína que se forma en el plasma por la combinación del **factor tisular** con los **fosfolípidos de las membranas de las plaquetas**.
- La **tromboplastina parcial** es **solo la fracción fosfolipídica** de la tromboplastina, sin factor tisular.





El plasma sanguíneo se mezcla con un fosfolípido (tromboplastina parcial), un activador (como silicato, celite, caolín, ácido eláxico) y calcio (para revertir el efecto anticoagulante del citrato).

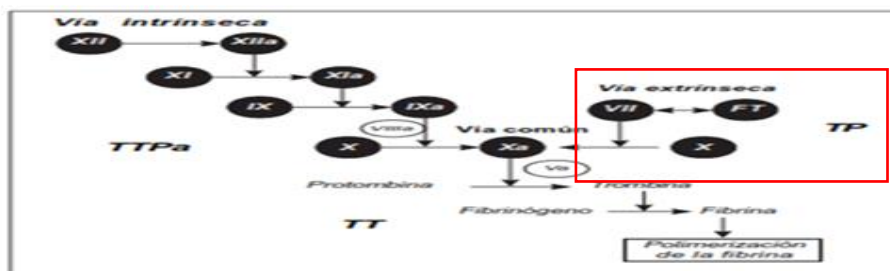
Se deja en un baño a 37 °C y se toma el tiempo que demora en coagular.

Valor Normal: 26 - 39 seg.

- **TP (tiempo de protrombina):**

Esta prueba se realiza para evaluar la vía extrínseca de coagulación.

El método mide el tiempo que tarda en coagular el plasma citratado, *in vitro*, después de agregarle un extracto de **tromboplastina completa** (factor tisular y fosfolípidos).



Se toma 0,2 ml de tromboplastina completa en un tubo de vidrio y se le agrega 0,1 ml de plasma.

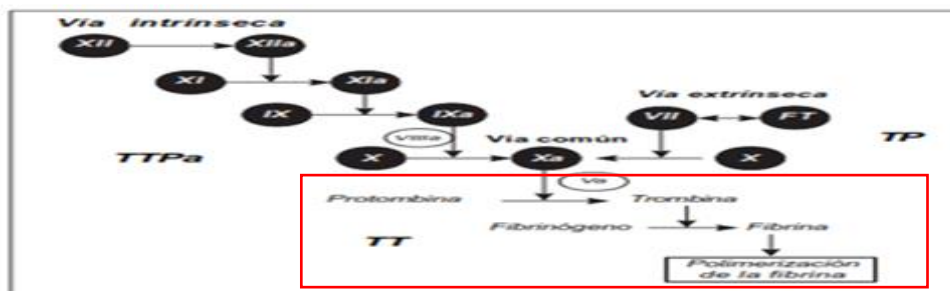
Se toma el tiempo que demora en coagular.

Valor normal: 12-13 seg.

- **TT (Tiempo de trombina):**

Evalúa la última fase de la coagulación, la función y calidad del fibrinógeno.

Se mide el tiempo durante el cual el fibrinógeno presente en el plasma *in vitro* se transforma en fibrina, por la acción de una cantidad estandarizada de **trombina** (Factor IIa).



Se toma 0,2 ml de trombina en un tubo de vidrio y se le agrega 0,2 ml de plasma.

Se toma el tiempo que demora en coagular.

Valor normal: 15-20 seg.

- **Determinación de fibrinógeno:**

Esta prueba se realiza para poder determinar los niveles de fibrinógeno en forma cuantitativa al precipitarlo por acción de sales como sulfato de amonio y su concentración se determina a una longitud de onda determinada, tras comparar con el grado de turbidez producida por un patrón de fibrinógeno de concentración conocida tratado en iguales condiciones.

Se toman 0,25 ml plasma citratado y se le agrega 2,25 ml de Sulfato de Amonio.

Se deja en reposo 15 minutos y se lee la turbidez a 540 nm.

El resultado se lo obtiene extrapolando de una **curva de calibración** el valor de la densidad óptica.

Valor normal: 150 - 350 mg%

❖ Sistema Fibrinolítico:

La fibrinólisis consiste en la degradación de las redes de fibrina formadas en el proceso de coagulación sanguínea, evitando la formación de trombos.

El **plasminógeno** es una glucoproteína sintetizada por el hígado, es una molécula enzimáticamente inactiva y circula por el cuerpo de esa manera hasta que es activado por activadores que rompen al plasminógeno convirtiéndolo en plasmina

La **plasmina** en su forma activa es la encargada de la degradación de las redes de fibrina, que pasarán a ser fibrinopéptidos solubles tras la fibrinólisis.

La activación de plasmina a partir de plasminógeno ocurre a través de dos vías, la extrínseca y la intrínseca:

- En la **Vía Extrínseca**, que es estimulada por situaciones como el descenso de la presión parcial, de oxígeno en sangre o las infecciones bacterianas, se produce una segregación de diversas sustancias que posibilitarán la activación del plasminógeno para convertirse en plasmina. Dichas sustancias, segregadas por el endotelio, son la **uroquinasa** y el **activador tisular del plasminógeno o tPA**.
- En la **Vía Intrínseca** es la **calicreína (KK)** la encargada de mediar la activación del plasminógeno.

• **Test de lisis de Euglobulinas:**

En esta prueba se evalúa la presencia del plasminógeno y de activadores del plasminógeno, así como también la función de los mismos. Normalmente en esta fracción de euglobulinas se encuentran todos los componentes del sistema fibrinolítico, y la alteración de alguno de sus integrantes se traduce en un alargamiento o acortamiento del tiempo de lisis de esa fracción.

Metodología:

Se toman 0,5 ml de plasma citratado y se le agregan 0,1 ml de ácido acético al 1 % y agua destilada hasta un volumen de 12 ml. Esta acidificación provoca la precipitación de ciertos factores de coagulación en un complejo llamado **fracción de euglobulina**.

Posteriormente se centrifuga a 3.000 rpm 5 minutos y se descarta el sobrenadante.

Al precipitado se le agrega 0,5 ml de una solución de borato de sodio 0,01 M.

Se resuspende y se le agrega 0,5 ml de cloruro de calcio 0,025 M. (**Se activa la coagulación**)

Una vez obtenido el coágulo se incuba en un baño a 37°C y se observa el tiempo de disolución del coágulo.

Normalmente el tiempo es de no menos de 1 hora 30 min.

Tiempos cortos indican una actividad fibrinolítica aumentada y tiempos largos señalan defectos en alguno de los componentes del sistema fibrinolítico (descenso de los activadores del plasminógeno o un plasminógeno anormal).

Autoevaluación

1. Defina la Vía Común de la coagulación.
2. ¿Qué mecanismos intervienen en la regulación de la cascada de reacciones de la coagulación?
3. ¿Qué es un anticoagulante y cómo se pueden clasificar?
4. ¿Qué prueba se utiliza para evaluar la vía de coagulación intrínseca y cuál para evaluar la vía de coagulación extrínseca?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°10

METABOLISMO FOSFOCÁLCICO

El calcio (Ca) y el fósforo (P) suponen el 65% del peso del hueso, siendo este el principal reservorio de Ca. El Ca, además, es un cofactor imprescindible en distintos procesos enzimáticos y el P está ampliamente distribuido por los tejidos,

formando parte de: ácidos nucleicos, fosfolípidos, enzimas, proteína G, ATP y segundos mensajeros. Ambos cationes se obtienen fundamentalmente con la alimentación. Los niveles de Ca y P en sangre deben mantenerse en un rango estrecho y lo hacen gracias a un complejo mecanismo regulador, siendo fundamentales la paratohormona (PTH) y la vitamina D. La PTH favorece la reabsorción activa de Ca y reduce la del P. El calcitriol [1,25(OH)2D3], que es la forma activa de la vitamina D, favorece tanto la absorción de Ca como la de P. La calcemia considerada normal varía dependiendo de los laboratorios y de la edad del paciente, siendo más preciso referirnos al Ca iónico. Los valores normales de P permanecen más constantes a lo largo de la vida.

La homeostasis del Ca tiene lugar en tres órganos diana: intestino, hueso y riñón. El 99% del Ca corporal está fijado al hueso y un 1% circula en sangre (50% en forma libre o activa, Ca iónico). La absorción de Ca se produce de forma activa y pasiva a nivel intestinal. El glomérulo renal filtra aproximadamente el 50% del Ca iónico y, posteriormente, se reabsorbe un 85% a nivel tubular, mediante un proceso pasivo. La vitamina D se genera en la piel por la acción de la luz solar, posteriormente a nivel hepático se transforma en 25 hidroxivitamina D3 [25(OH)D3] y, finalmente en el riñón, mediante la 1 alfa hidroxilasa, pasa a su forma activa, la 1,25(OH)2D3 o calcitriol. Esta enzima renal es activada por la PTH y regulada por los niveles de P (la depleción de P estimula su formación y el aumento de P la disminuye). La 1,25(OH)2D3 estimula la absorción intestinal de Ca y, en menor medida, de P. La PTH favorece: la salida de Ca del hueso, su absorción intestinal y disminuye su excreción urinaria. La secreción de PTH es regulada por el receptor sensor del Ca (CaSR) localizado en paratiroides y túbulo renal. El FGF23 actúa a nivel renal, regulando el manejo tubular del P y el metabolismo de la vitamina D. Ejerce una función fosfatúrica y protege al organismo de los excesivos niveles de [1,25(OH)2D3], mediante la inhibición de su producción renal y el aumento de su catabolismo. El exceso de FGF23 produciría: hipofosfatemia, alteración de la vitamina D, defectos de crecimiento y osteomalacia/raquitismo, y su defecto daría como resultado hiperfosfatemia y calcificaciones en tejidos blandos. Las hormonas principales que regulan el manejo renal de P son: la PTH y el FGF23. La PTH aumenta los niveles de P al estimular la resorción ósea y la síntesis de [1,25(OH)2D3](1), frena la absorción intestinal de fósforo. El FGF23, como ya se ha mencionado, reduce el P sérico.

ALTERACIONES DEL CALCIO

HIPOCALCEMIA

Se considera hipocalcemia, de forma general, a la concentración de Ca total < 8,5 mg/dl o de Ca iónico < 4,4 mg/dl. Los síntomas de la hipocalcemia se deben a un aumento de la excitabilidad neuromuscular y son variables, dependiendo de la edad del paciente y de la rapidez de su instauración. La crisis de tetania es la manifestación habitual en los casos agudos e incluye: parestesias, temblores, hiperreflexia, calambres y convulsiones. Si la hipocalcemia es crónica, la clínica es muy variada: afectación ectodérmica (sequedad de la piel, fragilidad ungueal, alteración del esmalte), ocular (edema de papila, cataratas subcapsulares), pérdida de memoria, alteraciones psiquiátricas, alteración del ritmo cardiaco.

La **hipocalcemia** se asocia con desórdenes tales como hipoparatiroidismo, deficiencia de vitamina D, malabsorción.

HIPERCALCEMIA

La hipercalcemia se sospecha ante una concentración plasmática de Ca total > 10,5 mg/dL o de Ca iónico > 5,2 mg/dL. Este hecho debe confirmarse en una segunda determinación, incluyendo el Ca iónico o valorando la calcemia corregida. La severidad clínica de la hipercalcemia dependerá del nivel del Ca y de la velocidad de instauración de esta. Se clasifican en: leve (Ca <12 mg/dl), moderada (12-14 mg/dl) y severa (Ca >14 mg/dl). La hipercalcemia puede ser un hallazgo incidental; pero, en ocasiones, se refieren síntomas como: letargia, hipotonía, anorexia, estancamiento ponderal, poliuria y polidipsia, vómitos, dolor abdominal y estreñimiento. En los casos de larga evolución y/o severos, nos podemos encontrar ante: fallo renal (por hipercalcemia y nefrolitiasis), pancreatitis (por depósitos de Ca y activación de tripsinógeno a nivel pancreático), arritmias (por acortamiento del QT), deterioro del nivel de conciencia y/o convulsiones. En el adolescente puede originar un cuadro psiquiátrico (ansiedad, depresión y/o psicosis).

La **hipercalcemia** está relacionada con distintas patologías: hiperparatiroidismo, neoplasias óseas, intoxicaciones con vitamina D.

ALTERACIONES DEL FÓSFORO

HIPOFOSFATEMIA

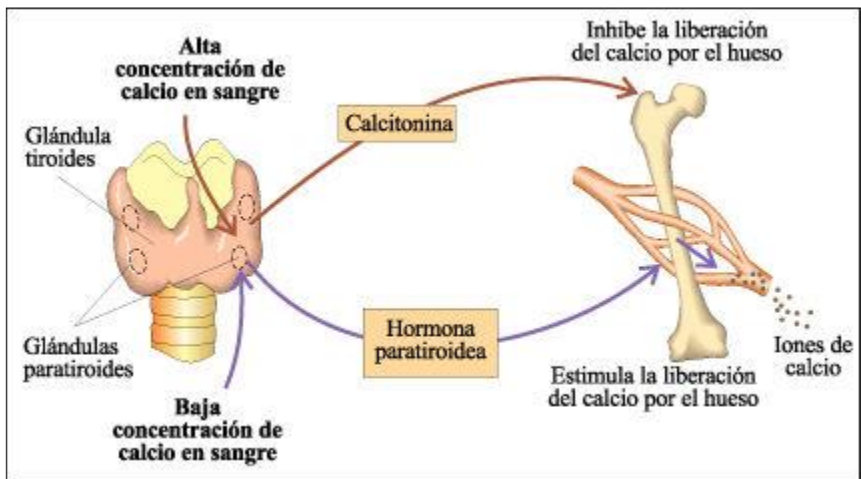
La hipofosfatemia se define por una concentración de fósforo sérica $< 2,5$ mg/dl, y se considera grave si es $< 1,5$ mg/dl. Los síntomas serán fundamentalmente neurológicos (encefalopatía) y osteomusculares (debilidad, mialgias, rabdomiólisis e insuficiencia cardíaca y respiratoria).

La **hipofosfatemia** se relaciona con deficiencias de vitamina D y defectos en la reabsorción de fósforo a nivel renal y en el hiperparatiroidismo.

HIPERFOSFATEMIA

La hiperfosfatemia se define por una concentración de fósforo sérica $> 6,5$ mg/dl. Es rara, salvo en niños con insuficiencia renal crónica (70% casos), en los que conlleva la aparición de un hiperparatiroidismo secundario y osteodistrofia renal. En el resto de las situaciones suele ser asintomática.

Niveles elevados de fósforo sérico son encontrados en el hipoparatiroidismo. También puede encontrarse hiperfosfatemia por hipervitaminosis D y diversos trastornos renales.



Fuente: Kiela 2009 y Berndt 2007

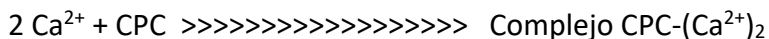
Determinación de calcio

Se utilizará el kit diagnóstico comercial "Ca-Color" de la empresa Wiener.

Método colorimétrico para la determinación de calcio en suero, plasma heparinizado y orina.

- Recuerde que puede acceder al protocolo del kit por internet (https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20ingles/ca_color_aa_en.pdf).

Fundamentos del Método



El calcio de la muestra a analizar reacciona con la **o-cresoltaleín complexona (o-CPC)** presente en el Reactivo A del kit a pH alcalino, dando un complejo de color magenta que se mide fotocolorimétricamente a **570 nm**.

La interferencia por el magnesio es minimizada por la adición de 8-hidroxiquinoleína (presente en el Reactivo A).

Importante

Los reactivos provistos son estables a temperatura ambiente (menor a 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Aditivos: en caso de utilizar plasma, se debe usar heparina como anticoagulante. Si la muestra a emplear es orina, se debe acidificar con ácido clorhídrico al 50% durante su recolección.

Sustancias interferentes conocidas: los anticoagulantes distintos de la heparina, acomplejan al calcio produciendo resultados erróneos.

MATERIAL REQUERIDO

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 570 nm en espectrofotómetro o 560-590 nm en fotocolorímetro con filtro rojo.
- Temperatura de reacción: temperatura ambiente (15-25°C).
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 50 µl
- Volumen final de reacción: 2,05 ml

- **Procedimiento:**

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Agua destilada	50 µl	x	x
Standard	x	50 µl	x
Muestra	x	x	50 µl
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml
Reactivo B	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar, incubar 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) y leer la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm o en fotocolorímetro con filtro rojo (560-590 nm).

El color de reacción final es estable 20 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{Calcio sérico (mg/dl)} = D \times f \quad f = \frac{10 \text{ mg/dl}}{S}$$

Standard: solución de calcio 10 mg/dl
--

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocados en baño de agua a 37°C, agregar:

	B	S	D
Standard	x	20 µl	X
Muestra	x	x	20 µl
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Nota: al agregar Reactivo A se produce turbiedad por precipitación proteica. Los agentes tensioactivos del Reactivo C provocan su redisolución total, obteniéndose una solución perfectamente límpida.

Mezclar por agitación suave. Esperar por lo menos 30 segundos y no más de 2 minutos.

Luego agregar:

	B	S	D
Reactivo B	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar por agitación suave. Esperar por lo menos 30 segundos y no más de 2 minutos.

Luego agregar:

	B	S	D
Reactivo C	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

Mezclar por inversión. A los 10 minutos retirar del baño y leer en espectrofotómetro entre 620 y 650 nm o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-700 nm), llevando el aparato a cero con el Blanco.

El color de reacción final es estable 3 horas por lo que la absorbancia debe ser leída en ese lapso.

Valores de absorbancia del Blanco superiores a 0,050 D.O. indican contaminación de los reactivos. En tal caso deben desecharse.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Suero o plasma

$$Pi \text{ (mg/dl)} = \frac{D}{S} \times 4 \text{ mg/dl}$$

Standard: solución estabilizada de fosfatos que equivale a 4 mg/dl de fósforo inorgánico.

VALORES DE REFERENCIA

Suero

Adultos: 2,50 a 4,50 mg/dl

Niños: 4,00 a 6,50 mg/dl

Autoevaluación

1. ¿Qué hormonas actúan en la regulación del calcio? ¿En qué casos lo hacen cada una?
2. ¿Cuál es el fundamento de la técnica para la determinación del calcio?
3. ¿Por qué solo se puede utilizar plasma anticoagulado con heparina y no con otros anticoagulantes?
4. ¿Cómo está determinada la concentración de fósforo en la sangre?
5. ¿Cuál es el fundamento de la técnica para la determinación del fósforo inorgánico?
6. ¿Por qué hay que desechar el tubo Blanco si su valor de absorbancia es superior a 0,050?

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°11

DETERMINACIÓN DE BICARBONATO

El bicarbonato es un tampón fundamental en el organismo y normalmente está presente en los fluidos biológicos como bicarbonato sódico (siendo el sodio el principal ion positivo en los fluidos extracelulares).

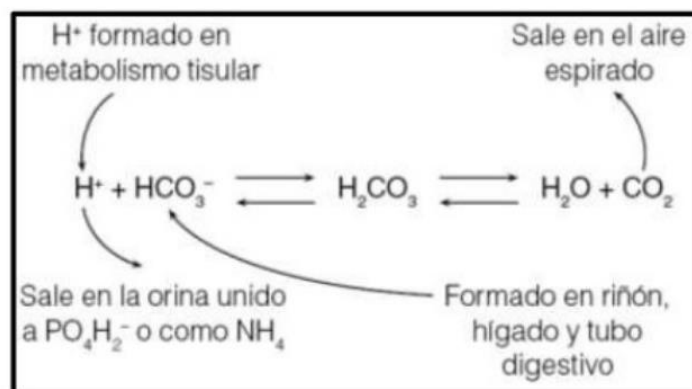
Características del bicarbonato sódico que contribuyen a su eficacia como tampón biológico:

A. El ion bicarbonato (HCO_3^-) se puede combinar con un protón (H^+) para formar ácido carbónico (H_2CO_3), absorbiendo así protones de la disolución y elevando el pH sanguíneo.

B. El ácido carbónico, que se puede formar a partir de CO_2 y agua, puede disociarse en H^+ y HCO_3^- para proporcionar H^+ y bajar el pH sanguíneo.

C. El ácido carbónico, que se puede formar a partir del bicarbonato, se convierte en CO_2 y agua mediante una reacción enzimática muy rápida.

D. El CO_2 , por ser volátil, puede ser rápidamente eliminado del organismo en cantidades variables mediante la respiración.



Como señalado en el práctico de pH y Capacidad Buffer, la saliva cumple funciones buffer principalmente gracias a la presencia de bicarbonato.

La concentración de bicarbonato aumenta al aumentar el flujo salival, así como también su capacidad de neutralizar ácidos, por lo tanto la presencia de bicarbonato logra disminuir el nivel ácido de los gérmenes cariogénicos, también la capacidad de desmineralización de la placa bacteriana será menor y sus efectos dañinos se minimizan.

El sistema bicarbonato es bajo en la saliva no estimulada y aumenta a medida que la saliva es estimulada.

Actividad Práctica

Material a utilizar: muestra de Saliva Estimulada recolectada durante el práctico.

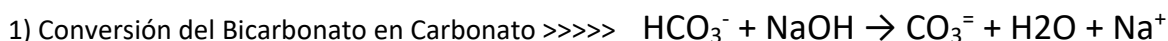
- Para recolectar la **Saliva Estimulada** el alumno escogido de cada grupo deberá masticar un chicle (preferentemente aquellos sin azúcar, ej.: TopLine) como forma de estímulo. Se comienza a contar el tiempo y a medida que se va generando saliva se la va recolectando en un tubo o frasco de plástico limpio durante un total de **5 minutos**. Al finalizar los 5 minutos se detiene la recolección de saliva.

Fundamento del método

El objetivo de esta práctica es realizar la determinación de bicarbonato en una muestra de saliva mediante un **método de valoración por retroceso** [que es cuando, sobre el analito (bicarbonato presente en saliva) se adiciona un reactivo en exceso (NaOH) en una cantidad conocida, y luego se pasa a valorar el reactivo (NaOH) que no se haya consumido con un segundo reactivo de concentración conocida (HCl)].

En nuestro caso, una alícuota de la muestra (Saliva Estimulada) se trata con un exceso de NaOH para convertir el bicarbonato a carbonato. A continuación, la totalidad del carbonato formado se precipita con cloruro de bario. El exceso de NaOH (no utilizado para transformar bicarbonato a carbonato), se valora de inmediato con disolución patrón de HCl y fenolftaleína como indicador de pH, y así se podrá determinar la cantidad de bicarbonato presente.

Fenolftaleína: es un indicador de pH que en disoluciones ácidas permanece incoloro, pero en disoluciones básicas toma un color rosado.



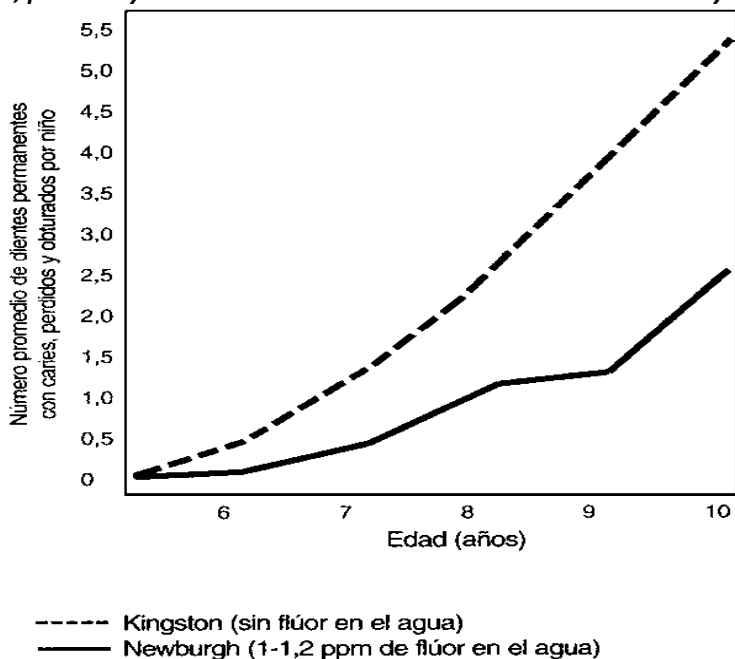
Participa en los procesos de desmineralización y remineralización que naturalmente ocurren en la boca. Cuando el flúor está presente, los minerales depositados son más duros y ayudan a fortalecer los dientes, así se evita la disolución que se produciría en la próxima fase de desmineralización.

El flúor está presente en muy bajas concentraciones en la saliva (VN: 0.006-0.016 ppm), pero desempeña un importante papel en la remineralización, ya que, al combinarse con los cristales del esmalte, forma el fluorapatita, que es mucho más resistente al ataque ácido. El fluoruro es la medida más importante de prevención de caries en salud pública; presenta un efecto antimicrobiano sobre las bacterias presentes en la placa bacteriana que causan caries dentales y juega un papel muy importante, inclinando el proceso hacia la remineralización y desarrollo de una estructura dental más resistente al ataque de los ácidos.

En la década de 1930 se observó que las personas con acceso a agua potable que contenía una a dos partes por millón (ppm) de flúor presentaban considerablemente menos caries dentales que aquéllas cuyos suministros de agua contenían cantidades menores de flúor. Posteriormente se encontró que en las áreas donde el agua presentaba muy poco flúor, era posible reducir la incidencia de caries dentales en un 60 a 70 por ciento si se ajustaba el nivel de flúor en el agua a aproximadamente una parte por millón.

La figura siguiente compara el índice CPO (Caries – Perdidos – Obturados) en dos ciudades del estado de Nueva York, en los Estados Unidos: Kingston, donde no había flúor en el agua municipal y Newburgh que tenía cantidades óptimas de flúor. Se puede observar que a la edad de 10 años, los niños que no recibían flúor en el agua potable tenían un CPO de 5,5 en sus dientes en comparación con 2,5 en los que recibían flúor. Otros estudios han demostrado una reducción inclusive mayor como resultado de la fluoración.

Dientes con caries, perdidos y obturados en niños de 6 a 10 años en ciudades con y sin agua fluorada



Por lo tanto los humanos recibimos flúor mediante la ingesta. La principal fuente que se ha observado a través de los años es el agua potable, otras son los alimentos, suplementos fluorados, fórmulas para niños y, de manera indirecta, la pasta dental. Ahora se acepta que, en general, la cantidad adecuada de flúor que se requiere en los suministros urbanos de agua es de aproximadamente 1 parte por millón (ppm).

Actualmente se sabe que el principal uso benéfico del flúor en contra de la caries recae en su acción tópica, en la desmineralización y remineralización que toma lugar en la interfase entre la superficie del diente y los fluidos orales.

Fluorosis

La fluorosis dental es una alteración en la formación del esmalte debida a una exposición desmedida al flúor en la etapa de desarrollo de los dientes.

Su principal signo es la aparición de unas pequeñas manchas de color blanco en la superficie de las piezas definitivas, pero en los casos más severos puede suponer rugosidades en el esmalte o manchas en tonalidades más oscuras, como amarillas o marrones.

En función de la severidad de las manchas que presente el paciente en su esmalte, podemos distinguir tres tipos diferentes de fluorosis dental:

- La **fluorosis dental leve** se traduce en la aparición de unas ligeras líneas o estrías en la superficie dental.
- La **fluorosis dental moderada** se caracteriza por la presencia de manchas de tonalidades blancas en el esmalte de la pieza. Ante estos signos no debes alarmarte, ya que no vuelven al diente más sensible al ataque de caries.
- Por último, la **fluorosis dental severa** origina manchas que ocupan la mayor parte de la pieza y puede provocar rugosidades en el esmalte o modificaciones en la forma del diente. En este caso, los pacientes son más proclives a padecer caries o sensibilidad dental.

Es por esto que la fluorosis tiene consecuencias para los dientes en una doble vertiente:

- En primer lugar, afecta a la estética de la sonrisa de la persona que la padece.
- Por otro, en los casos más severos supone una mayor predisposición a la formación de lesiones cariosas y, por ello, puede ser un factor que tenga cierta incidencia en la estabilidad de las piezas dentales.

¿qué factores pueden ser el origen de dicha ingesta excesiva a edades tempranas?

- En primer lugar, se ha constatado que existe una relación directa entre la afección de fluorosis y la ingesta en la etapa de desarrollo de agua en aquellas zonas en las que la misma contiene una cantidad de flúor superior a la recomendada. Un contenido cercano a 4 ppm dará por resultado una amplia fluorosis dental en la población.
- La incorporación a la dieta de alimentos procesados con agua fluorada o la ingesta de suplementos nutricionales que contengan fluoruro.
- Por último, el empleo de pasta de dientes o enjuagues bucales no indicados para niños que tienen una concentración o cantidad de flúor superior a la indicada.



Actividad Práctica

Material a utilizar: muestra de Saliva Estimulada recolectada durante el práctico.

- Para recolectar la **Saliva Estimulada** el alumno escogido de cada grupo deberá masticar un chicle (preferentemente aquellos sin azúcar, ej.: TopLine) como forma de estímulo. Se comienza a contar el tiempo y a medida que se va generando saliva se la va recolectando en un tubo o frasco de plástico limpio durante un total de **5 minutos**. Al finalizar los 5 minutos se detiene la recolección de saliva.

Fundamento del método

Se utilizan dos reactivos llamados Zirconio y Alizarina, que al reaccionar entre ellos se produce una laca o complejo de color rojo. La formación de esta laca se mide a 535 nm utilizando un espectrofotómetro.

Zirconio + Alizarina >>>>>>>>>> Laca color rojo

Como el flúor reacciona también con el Zirconio, elimina parte del mismo de la reacción evitando que se forme algo de la laca y como resultado disminuye la intensidad del color rojo.

Por lo tanto lo que se determina aquí es cuánto disminuye la absorción de la laca color rojo por la presencia de flúor en la muestra de saliva a analizar.

La reacción no es instantánea, sino que progresa con el tiempo. Por esta razón las muestras se incuban durante una hora luego del agregado de los reactivos.

MATERIAL REQUERIDO

- Solución de alizarina.
- Reactivo de zirconio.
- Solución estándar de fluoruros.

- **Procedimiento:**

- 1) Se utilizará una curva de calibración de flúor. Esta se prepara con diferentes diluciones de fluoruros de concentración conocida a las cuales se les mide la absorbancia a 535 nm luego del agregado de la alizarina y el zirconio.

Los valores obtenidos se grafican y esta curva se utiliza para determinar la concentración de flúor en la muestra de saliva.

- 2) Muestra incógnita: en un tubo limpio colocar 1 ml de saliva estimulada y 9 ml de agua destilada. Luego agregar 0,5 ml de la solución de alizarina y se mezcla. Luego se agrega 0,5 ml del reactivo de zirconio y se mezcla. Dejar reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
→ Leer la absorbancia a 535 nm utilizando un espectrofotómetro.

Con la lectura obtenida, se utiliza la curva de calibración mencionada antes para extrapolar y así obtener los mg/l de fluoruros presentes en la muestra incógnita (Saliva).

Autoevaluación

1. ¿Considera que el consumo de flúor por la población debe ser ilimitado? ¿Por qué?
2. ¿Por qué es importante la utilización de una curva de calibración de flúor?
3. Si al analizar dos muestras problema por este método obtengo con la muestra A el doble de absorbancia a 535 nm comparado con la muestra B, ¿qué puedo decir de la cantidad de fluoruros en esa muestra A respecto a la muestra B?