CUADERNO DE PRÁCTICAS

BIOQUÍMICA

1º Trimestre

09/12/2014

i. b. M.

CONTENIDO

[PRÁCTICA 1: DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE MnO4-. 20/09/2014. 2](#_Toc405990942)

[PRÁCTICA 2: DETERMINACIÓN CUANTITACIVA DE PROTEÍNAS TOTALES. MÉTODO DE BIURET.13/10/2014 7](#_Toc405990943)

[PRÁCTICA 3: DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA. MÉTODO DE TRINDER. 20/10/2014 10](#_Toc405990944)

[PRÁCTICA 4: ANÁLISIS DE ORINA. 12/11/2014 13](#_Toc405990945)

[PRÁCTICA 5: ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS: DÍA 1/12/2014 17](#_Toc405990946)

# PRÁCTICA 1: DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE MnO4-. 20/09/2014.

**FUNDAMENTO:**

 La determinación cuantitativa de la concentración de un analito en una muestra mediante espectrofotometría absorción molecular UV-VIS, está basada en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra, cuantificable a través de la Absorbancia, y la correlación de esta variable con la concentración de la especie o analito de interés en dicha muestra a través de la Ley de Beer.

**A=a.b.c**

Dónde A es la absorbancia del analito en la muestra, a es la constante de proporcionalidad denominada absortividad, b es la trayectoria óptica y c la concentración del analito en la muestra.

**OBJETIVO:**

1. Comprobar el cumplimiento de la Ley de Beer en una serie de disoluciones de una sustancia coloreada kMnO4.
2. Aprender a realizar mediciones de Absorbancia.
3. Determinar la concentración de una disolución a partir de una recta de calibrado obtenida previamente.

**MATERIAL Y REACTIVOS.**

3 matraces aforados de 25mL.

2 matraces aforados de 100mL.

2 pipetas graduadas de 1mL.

1 pipeta graduada de 5ml.

1 vaso de precipitados.

Cubetas para espetrofotómetro.

1 frasco lavador con agua destilada.

1 pipeta Pasteur.

Papel de film.

**REACTIVOS y MUESTRAS:**

Disolución de kMnO4 0,1M.

Muestra problema.

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:**

Para llevar acabo determinación cuantitativa de la disolución problema de KMnO4, seguiremos los siguientes pasos:

1. Obtención del Espectro de Absorción del kMnO4.
2. Preparación de la curva de calibrado.
3. Medición de la muestra problema.
4. Discusión de los resultados.

**Obtención del Espectro de Absorción del kMnO4:**

Para poder aplicar este método es necesario conocer previamente el espectro de absorción de la sustancia a determinar. Un espectro de absorción es una representación gráfica de la absorbancia de un analito en función de la longitud de onda de la radiacción, λ. El máximo de absorbancia obtenido en el espectro de absorción de un analito, nos dará la longitud de onda, λ, que proporciona la mayor sensibilidad posible, y por tanto será la que se utilizara en el análisis espectrofotométrico de dicho analito.

Todas las disoluciones que presentan color, absorben radiación electromagnética perteneciente al espectro visible, el cuál puede dividirse en varias zonas según la siguiente tabla:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Longitud de onda λ (nm)** | **Color** | **Color complementario** |
| 380-435 | Violeta | Verde-amarillo |
| 435-480 | Azul | amarillo |
| 480-490 | Azul-verdoso | Anaranjado |
| 490-500 | Verde-azulado | Rojo |
| 500-560 | Verde | Púrpura |
| 560-580 | Verde- Amarillo | Violeta |
| 580-595 | Amarillo | Azul |
| 595-650 | Anaranjado | Azul-verdoso |
| 650-780 | rojo | Verde-azulado |

El color de la disolución denominado “color complementario” indica la porción del espectro electromagnético que no es absorbida por el analito y que por tanto se transmite a través de ella y es captada por el ojo humano, mientras que la columna denominada “color” indica la porción del espectro electromagnético que es absorbida por el analito.

Como nuestra disolución es de color púrpura podemos predecir la zona de máxima absorbancia, mirando en la tabla, vemos que será entre 500 y 560 nm.

Para realizar el espectro de absorción del KMnO4 debemos realizar primero una disolución de éste:

1. Preparación de una disolución de 100mL de KMnO4 10-3M a partir de una disolución 0,1 M de KMnO4.

C1.V1=C2.V2

V2=(100.10-3)/10-1=100.10-2=1mL

Se coge un 1mL de la disolución 0,1M de KMn04 con una pipeta y se vierte en un matraz aforado de 100mL. Después se añade agua destilada con un frasco lavador hasta un poco por debajo de la línea de aforo. A continuación se enrasa con una pipeta Pasteur. Por último se tapa con su tapón y se voltea varias veces para homogenizar la disolución. Como la disolución de KMn04 no es estable a la luz envolvemos el matraz aforado con papel de aluminio.

1. Con la disolución preparada se obtendrá el Espectro de Absorbancia, como sigue;
* Ponemos a punto el espectrofotómetro.
* Colocamos la disolución en una cubeta para espectrofotómetro y en otra cubeta agua destilada.
* Se hace el blanco para ello cogemos la cubeta de agua destilada y se coloca en el portacubetas el espectrofotómetro y se le da el valor de A=0, para la λ seleccionada.
* A continuación se coloca una cubeta negra y se le da el valor de %T=0, a esa λ.
* A continuación se mide la muestra esa λ.
* Se repite para cada, λ.
* Como ya hemos dicho la disolución es de color púrpura por lo que el intervalo en el que realizaremos las medidas será entre 500 y 560 nm.
* Empezaremos a medir 20nm por debajo del límite inferior y terminaremos 20nm por encima del límite y subiremos de 5 en 5 para asegurarnos que obtenemos el máximo.

|  |  |
| --- | --- |
|  **λ (nm)** | **Absorbancia** |
| 480 | 0,921 |
| 485 | 1,069 |
| 490 | 1,164 |
| 495 | 1,318 |
| 500 | 1,607 |
| 505 | 1,775 |
| 510 | 1,746 |
| 515 | 1,845 |
| 520 | 1,963 |
| 525 | 1,974 |
| 530 | 1,973 |
| 535 | 1,767 |
| 540 | 1,847 |
| 545 | 1,870 |
| 550 | 1,613 |
| 555 | 1,244 |
| 560 | 1,087 |
| 565 | 1,070 |
| 570 | 1,228 |
| 575 | 0,898 |
| 580 | 0,577 |

Por tanto el máximo de absorbancia es a 525 nm.

**Preparación de la curva de calibrado:**

* A partir de la disolución de KMnO4 10-3 M preparada antes, se preparan utilizado matraces aforados de 25mL, tres disoluciones patrón de KMnO4 de concentraciones 2.10-5, 6.10-5 y 1.10-4 M.
	+ C1=2.10-5 V1=25mL

V2=(2.10-5.25)/10-3=0.5mL

* + C1=6.10-5 V1=25mL

V2=(6.10-5.25)/10-3=1.5mL

* + C1=1.10-4 V1=25mL

V2=(1.10-4.25)/10-3=2.5mL

* Medir la absorbancia de las disoluciones patrón a la longitud de onda de máxima absorbancia 525nm. El procedimiento es similar al anterior. Se hace primero el blanco, después con la cubeta negra y después se mide la absorbancia de las disoluciones.

|  |  |
| --- | --- |
| Absorbancia | Concentración |
| 0.052 | 2.10-5 |
| 0.115 | 4.10-5 |
| 0.071\* | 6.10-5\* |
| 0.239 | 1.10-4 |
| 1.973 | 1.10-3 |

Rechazamos el dato de concentración 6.10-5 porque da fuera y realizamos otra disolución de concentración 4.10-5M, también añadimos el dato de la disolución de partida de 1.10-3M.

La ecuación de la recta de calibrado mediante ajuste por mínimos cuadrados es:

Y= 1942,9X + 0,0313 siendo R2=0,9998

Medición de la absorbancia de la muestra problema:

Se mide la absorbancia de la disolución problema, siguiendo el procedimiento ya conocido.

Ap=1,997

Calculo de la concentración de la muestra, Cp;

* + Gráficamente; Se interpola en la gráfica de la curva de calibrado.
	+ Matemáticamente, mediante la ecuación de la recta de calibrado:

Ap=1942,9Cp+0,0313

CP=(1,997-0,0313)/1942,9=0,00101M

**RESUMEN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES:**

Longitud de onda a la que la absorbancia es máxima; 525nm.

Ecuación de la recta de calibrado; A= 1942,9C+ 0,0313 siendo R2=0,9998

Concentración de la muestra problema; 0,00101M.

**RESULTADOS POR GRUPOS DE TRABAJO:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **MESA** | **[KMnO4]M** | **R2** |
| 1 | 0,00101 | 0,9998 |
| 2 | 0,00102 | 0,9994 |
| 3 | 0,00094 | 0,9989 |
| 4 | 0,00092 | 0,9971 |
| 5 | 0.00109 | 0,9998 |
| 6 | 0,00098 | 0,9999 |

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS:**

Teniendo en cuenta los valores obtenidos por los distintos grupos podemos decir que la [KMnO4]=0,001M.

# PRÁCTICA 2: DETERMINACIÓN CUANTITACIVA DE PROTEÍNAS TOTALES. MÉTODO DE BIURET.13/10/2014

**FUNDAMENTO:**

Toda disolución coloreada absorbe radiación electromagnética en la zona del espectro de radiación electromagnética perteneciente a la franja visible. En medio alcalino, las proteínas dan un color violeta azulado en presencia de sales de cobre. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra ensayada, (ley de Beer), pudiendo ser cuantificable mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS.

**OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:**

Determinación cuantitativa de proteínas totales mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS.

**MATERIAL Y REACTIVOS:**

**MATERIAL**

Espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 540nm.

Cubetas de 1,0cm de paso de luz para espectrofotómetro.

Pipetas graduadas de 2mL

Micropipetas y puntas de micropipetas desechables.

Frasco lavador con agua destilada.

**REACTIVOS y MUESTRAS**

Reactivo azul

Suero biocalibrador de [ ]=7,51g/dL.

Muestra paciente: suero control GERNORM de concentración media 5,8g/dL e intervalo (5,16-6,44)g/dL.

**PROCEDIMIENTO experimental:**

1. Preparación del blanco de reactivo, patrón y muestra: se pipetea en una cubeta para fotómetro;

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **BLANCO** | **PATRÓN O SUERO CALIBRADDOR** | **MUESTRA** |
| **REACTIVO (mL)** | 2 | 2 | 2 |
| **PATRÓN (µL)** |  | 50 |  |
| **MUESTRA (µL)** |  |  | 50 |

Cada mesa hace una muestra, el blanco de reactivo lo hace una persona y el biocalibrador otra.

1. Se tapa la cubeta con film y se voltea varias veces para homogenizar la mezcla y se deja incubar durante 10min a temperatura ambiente. El color es estable durante 30min.
2. Se programa el fotómetro para la realización de la práctica:

a. Se selecciona determinación de proteínas totales.

b. Longitud de onda de 540 (530-550).

c. Se introduce la concentración de suero biocalibrador que es 7,51g/dL.

d. Se asusta el fotómetro a cero frente al agua destilada.

1. Se lee la absorbancia del Blanco de reactivo, del patrón o suero biocalibrador y por último el de la muestra.

**VALORES DE REFERENCIA**

Adultos: 6,6-8,3g/dL.

Recién nacidos: 5,2-9,1g/dL.

**RESULTADOS**

Fotómetro 1: 3,75 g/dL.

Fotómetro 2: 3,51 g/dL.

**RESULTADOS POR GRUPOS DE TRABAJO:**

|  |  |
| --- | --- |
|  | **[PROTEINAS TOTALES] g/dL.** |
| **GRUPO** | **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** |
| **MESA 1** | 3,75 | 3,51 |
| **MESA 2** | 1,59 | 3,63 |
| **MESA 3** | 5,05 | 6,42\* |
| **MESA 4** | 5,16\* | 3,79 |
| **MESA 5** | 3,74 | 3,36 |
| **MESA 6** | 2,98 | 4,35 |

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS:**

1. La muestra utilizada como paciente es un suero control NORMAL GERNORM de concentración 5,8 (5,16-6,44) por lo que DEBE corresponder a un recién nacido porque para un adulto los valores de proteínas estarían por debajo de los valores de referencia por tanto el paciente tendría las proteínas séricas bajas SERÍA patológico.
2. Los valores obtenidos por todos grupos para el fotómetro uno no entran dentro del rango salvo el obtenido por la mesa 4.
3. Los valores obtenidos por todos los grupos para el fotómetro dos también están por debajo del rango salvo el de la mesa 3.
4. En general los valores obtenidos son muy dispares por lo que concluimos que se pudo producir algún fallo o error: operador, micropipetas no calibradas, utilizar distintas pipetas y micropipetas cada grupo así como cubetas, suero calibrador estropeado o suero control estropeado, que no presenten la concentración de proteínas totales que deberían, etc.

**REPETIMOS LA PRÁCTICA: 23/10/2014**

1. Preparación del blanco de reactivo, patrón y muestra. Se pipetea en una cubeta:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **BLANCO** | **BIOCALIBRADOR** | **MUESTRA** **SUERO CONTROL GERPATH** | **Suero control GERNORM** |
| **REACTIVO(mL)** | 2 | 2 | 2 | 2 |
| **PATRÓN (µL)** |  | 50 |  | 50 |
| **MUESTRA(µL)** |  |  | 50 |  |

Se realizará una muestra por cada operario de cada mesa utilizando todos la misma pipeta y la misma micropipeta. El blanco de reactivo lo realizará un solo operario, el biocalibrado otro y el suero control Gernorm otro distinto, en este último caso lo realicé yo.

Mi muestra es la que tiene un asterisco.

1. Resultados por grupos:

|  |
| --- |
| **[PROTEÍNAS TOTALES]g/dL para muestra paciente suero control GERPATH** |
| **MESA 1** | **MESA 2** |
| **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** | **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** |
| 3,42 | 3,98 | 3,49 | 3,72 |
| 2,97 | 3,29 | 3,27 | 3,52 |
| 2,91 | 3,51 | 3,23 | 3,49 |
| 2,70 | 3.37 | 2,87\* | 3,16\* |
| 4,31 | 5,18 | 3,06 | 3,65 |
| 3.17 | 3,66 |  |  |

**[PROTEÍNAS TOTALES]g/dL para suero control GERPATH: 6,38(5,63-7,03)**

|  |
| --- |
| **[PROTEÍNAS TOTALES]g/dL para suero control GERNORM** |
| **MESA 2** |
| **FOTÓMETRO 1** | **FOTÓMETRO 2** |
| 2,61 | 3,00 |

**[PROTEÍNAS TOTALES]g/dL para suero control GERNORM: 5,34 (4,75-5,93)**

1. Ajustamos los datos según los valores obtenidos para el suero control GERNORM en el fotómetro 1 y 2:

Si para el fotómetro 1 el suero control GERNORM da 2,61 y debería dar 5,34 corregimos los valores mediante una regla de tres. Lo mismo para el fotómetro 2 si el suero control GERNORM da 3,00 y debería dar 5,34, y se obtiene.

|  |
| --- |
| **[PROTEÍNAS TOTALES]g/dL para muestra paciente suero control GERPATH** |
| **MESA 1** | **MESA 2** |
| **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** | **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** |
| 6,99 | 7,08\*\* | 7,14\*\* | 6,62 |
| 6,07 | 5,85 | 6,69 | 6,37 |
| 5,95 | 6,24 | 6,61 | 6,21 |
| 5,52\*\* | 5,99 | 6,26\* | 6,50\* |
| 7,67\*\* | 8,81\*\* | 5,87 | 5,62\*\* |
| 6,48 | 6,51 |  |  |

1. **DISCUSIÓN DE RESULTADOS:**

[PROTEÍNAS TOTALES]g/dL para la muestra que es suero control GERPATH: 6,38(5,63-7,03)

Los marcados en rojo y dos asteriscos están fuera del rango, los que están en azul y un asterisco son los míos. Si hacemos la media sacando los que están fuera de rango da 6,33.

**Valores normales en adultos: 6,6-8,3 g/dL**

**Volores normales para recién nacidos: 5,2-9,1 g/dL.**

El paciente tendría los valores de proteínas séricas totales por debajo de los valores normales, sería lo esperado ya que utilizamos como muestra un suero control patológico.

# PRÁCTICA 3: DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA. MÉTODO DE TRINDER. 20/10/2014

**FUNDAMENTO:**

Se trata de un método enzimático colorimétrico por lo que se puede cuantificar mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS.

**OBJETIVO DE LA PRÁCTICA**

Determinación cuantitativa de glucosa sérica mediante el método de TRINDER.

**MATERIAL Y REACTIVOS**

**MATERIAL**

Cubetas para fotómetro

Pipeta graduada

Micropipeta y puntas de micropipeta desechable

Frasco lavador con agua destilada

Papel de film

Papel de aluminio.

**RECTIVOS Y MUESTRAS**

Reactivo: hay que reconstituirlo y mezclar el reactivo 1 con el reactivo 2.

Suero biocalibrador de concentración de glucosa 170mg/dL.

Muestras: suero control GERPATH [Glucosa]= 284(239-329)mg/dL y suero control GERNORM [Glucosa]=98(82,8-114)mg/dL.

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

1. Se debe reconstituir el reactivo como indica en el bote y mezclar el reactivo 1 con el reactivo 2. Se disuelve el contenido de un vial de reactivo 2 (enzimas) en el frasco de reactivo 1(tampón), y se hacen varios lavados para arrastrar todo.
2. Se pipetea en una cubeta para fotómetro:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **BLANCO** | **BIOCALIBRADOR** | **MUESTRA GERPATH** |
| **REACTIVO(mL)** | 2 | 2 | 2 |
| **PATRÓN (µL)** |  | 20 |  |
| **MUESTRA(µL)** |  |  | 20 |

Cada mesa hace una muestra de GERPATH, y un mesa hace el biocalibrador y otra el blanco de reactivo.

1. Se tapa la cubeta con papel de film, se voltea varias veces para homogenizar la mezcla y se deja incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente, envuelto en papel de aluminio. El color es estable durante mínimo 60 minutos al abrigo de la luz.
2. La reacción enzimática es a punto final.
3. Se programa el fotómetro para determinar glucosa sería, se introduce el dato de la longitud de onda requerida que es 505, y la concentración del biocalibrador que es 170mg/dL, y que se trata de una determinación enzimática a punto final.
4. Se ajusta el fotómetro frente al agua destilada.
5. Se mide la absorbancia del blanco, el patrón o biocalibrador y por último la muestra.
6. **Resultados:**

|  |
| --- |
|  |
| **[Glucosa sérica]mg/dL GERPATH** |
| **GRUPO** | **FOTOMETRO 1** |
| **MESA 1** | 263,89 |
| **MESA 2** | 262,52 |
| **MESA 3** | 209,20\*\* |
| **MESA 4** | 223,32\*\* |
| **MESA 5** | 216,49\*\* |
| **MESA 6** | 246,57 |

1. **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

La concentración del suero control GERPATH es 284(239-329)mg/dL por lo que tres mesas están fuera del intervalo y otras tres dentro.

Los valores normales son entre 60-100mg/dL.

Si descartamos los valores que se salen del intervalo de confianza la media dará 257,66 como se trata de un suero patológico, como es de esperar no está dentro de los valores normales de glucosa, en éste caso tendría una hiperglucemia.

**REPETICIÓN DE LA PRÁCTICA: 22/11/2014**

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:**

1. **Preparación del blanco, patrón y muestras.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **BLANCO** | **BIOCALIBRADOR** | **MUESTRA GERPATH** | **MUESTRA GERNORM** |
| **REACTIVO(mL)** | 2 | 2 | 2 | 2 |
| **PATRÓN (µL)** |  | 20 |  | 20 |
| **MUESTRA(µL)** |  |  | 20 |  |

En este caso se hacen dos muestras una de suero control GERPATH y otra de suero control GERNORM por cada alumno, como solo estamos 5 personas tendremos 5 de cada. El patrón lo hace un alumno y el blanco otro. Se deja incubar durante 20-25 minutos a temperatura ambiente, para que tenga lugar la reacción. El color es estable durante 60min al abrigo de la luz.

1. Mientras se programa el fotómetro.
2. Se ajusta el fotómetro a cero frente al agua destilada.
3. Se realiza la medida, primero el blanco de reactivo, después el patrón y por último la muestra.
4. Como el suero control de GERNORM no produjo reacción colorimétrica se descarta.
5. **RESULTADOS:**

|  |
| --- |
| **[Glucosa]mg/dL para muestra paciente suero control GERPATH** |
| **MESA 1** |
|  **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** |
| 302,83 | 339\*\* |
| 311,03 | 325 |
| 361,86 | 399\*\* |
| 280,96\* | 314\* |
| 209,21\*\* | 219\*\* |

Los valores en azul son los míos

1. **DISCUSIÓN DE RESULTADOS:**

La concentración de glucosa para el suero control GERPATH es 284(239-329) por tanto solo hay un valor(\*\*) que se sale del intervalo de confianza para el fotómetro 1, siendo el que más se acerca a la media el de 280,96. Por el contrario en el fotómetro 2, se salen más de la mitad por lo que procedemos a ajustar los datos tomando como referencia el que dio el valor más próximo a la media en los dos fotómetros, que es el de 280,96 y 314. Por tanto si 314 debería dar 284 por regla de tres se van corrigiendo los datos para el fotómetro 2. Quedando los resultados;

|  |
| --- |
| **[Glucosa]mg/dL para muestra paciente suero control GERPATH** |
| **MESA 1** |
|  **FOTOMETRO 1** | **FOTOMETRO 2** |
| 302,83 | 306,61 |
| 311,03 | 294 |
| 361,86 | 361\*\* |
| 280,96 | 284 |
| 209,21\*\* | 198\*\* |

La diferencia entre los distintos valores obtenidos por cada alumno lo relacionamos con la forma de operar de cada alumno y el uso de distintas cubetas para fotómetro, se cometería menos error si se usara la misma para hacer el blanco, el patrón y la muestra, entre otros posibles.

Los valores que están en rojo no están dentro del intervalo de confianza por lo que los descartamos y hacemos la media con el resto, obteniendo: 305,9mg/dL de glucosa.

Los valores normales de glucosa están entre 60-100mg/dL y como es de esperar en nuestro paciente el valor de glucosa sérica no está dentro de los valores normales ya que utilizamos como paciente un suero control patológico, el paciente tendría hiperglucemia.

# PRÁCTICA 4: ANÁLISIS DE ORINA. 12/11/2014

**FUNDAMENTO:**

El análisis de orina es uno de los exámenes de mayor utilidad como indicador de salud o enfermedad, especialmente en caso de trastornos renales. Comprende tres partes básicas:

1. Determinación de las características organolépticos y físicas de la orina.
2. Determinación de otros parámetros urinarios mediante tiras reactivas.
3. Estudio del sedimento urinario.

La determinación de las características organolépticas como el color, el olor, el aspecto y el sabor hoy en día ya no son parámetros que se determinen de forma rutinaria por su escasa significación clínica, no así como parámetros físicos como el volumen urinario o la osmolaridad urinaria.

Para la determinación de parámetros urinarios mediante la utilización de tiras reactivas, se basa en el uso de reactivos químicos deshidratados unidad, es decir, preparados previamente para la determinación de un único parámetro. Las tiras reactivas tienen una estructura básica formando una serie de capas: una de soporte, otra reflectante y otra reactiva, que es la que contiene los reactivos deshidratados que darán la reacción colorimétrica. Para su lectura se puede usar:

1. La inspección visual mediante la comparación con una escala de colores.
2. La espectrometría de reflectancia.

El estudio del sedimento urinario se lleva a cabo mediante la inspección visual al microscopio y debe ser realizado lo más rápido posible, es decir, en orina reciente, ya que con el paso del tiempo desaparecen los eritrocitos y los cilindros. El examen microscópico del sedimento urinario es una prueba rutinaria en el laboratorio de diagnóstico clínico y es especialmente útil para evaluar el curso de las patologías renales pero también para otras.

Una vez recogida la orina los análisis deben ser realizados en el menor tiempo posible, si se va a tardas más de una hora en la realización de las analíticas, la orina deberá ser guardada en el frigorífico a unos 4-5 ºC lo que evita el deterioro de determinados elementos celulares, evita o ralentiza determinados procesos químicos y previene la multiplicación bacteriana.

**OBJETIVO DE LA PRÁCTICA**

Aprender a realizar e interpretar un análisis de orina.

**MATERIAL Y REACTIVOS**

**MATERIAL**

Tubos de ensayo graduados

Papel de film

Pipeta Pasteur

Gradilla

Centrifuga

Microscopio de campo claro

Porta objetos

Cubre objetos

Alcohol de 70º

Papel absorbente

Papel de filtro

**REACTIVOS**

Tiras reactivas.

Papel indicador de PH

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:**

**DÍA 12/11/2014**

El procedimiento general consta de las siguientes partes;

1. Inspección visual de la orina: color, aspecto, formación de espuma, etc.
2. Realización de análisis de la orina con tira reactiva: Para el que se introduce la tira reactiva en la orina y se compara con una escala de colores. Pudiendo determinar los siguientes parámetros:
	1. Urobilinógeno
	2. Glucosa
	3. Bilirrubina
	4. Cetona
	5. Presencia de sangre
	6. pH
	7. proteínas totales
	8. test de nitritos para presencia de bacterias.
	9. Leucoticos.
3. Estudio del sedimento urinario: se introducen 10 mL de orina en un tubo de ensayo graduado, después se tapa con papel de film y se centrifuga, recordando que hay que colocar bien los tubos dentro de los portatubos o contenedores, de forma que la carga quede compensada y la centrifuga correctamente equilibrada. Como nuestra centrifuga consta de unos contenedores para varias muestras, se debe colocar el mismo número de muestras en contenedores enfrentados para equilibrar. Se centrifuga durante 10min a 1500 rpm. Obteniendo el sedimento y un sobrenadante, los cuales se separan por decantación. Por último se recoge una gota de sedimento con una pipeta Pasteur y se coloca sobre un porta objetos, se cubre con un cubre objetos y se procede a observar al microscopio.
4. Una vez hecho el análisis de orina se tira la orina por el fregadero diluyendo con abundante agua y se limpia el fregadero con lejía, los portaobjetos con las muestras, la pipeta Pasteur y el papel de filtro utilizado se tiran a la papelera del autoclave para su esterilización. El microscopio se limpia con papel absorbente con un poco alcohol de 70 y después con agua destilada y se seca y se guarda.

Las muestras proporcionadas para el análisis son sedimentos urinarios procedentes del Hospital del Barbanza. Por tanto no podemos seguir el procedimiento general ya que partimos de sedimento, lo que haremos es:

**A partir de sedimento:**

Se debe mirar el PH antes con un papel indicador de PH ya que es importante para conocer la naturaleza de los cristales en el caso de haberlos así como otros parámetros y después, se recoge una gota de sedimento con una pipeta Pasteur y se coloca sobre un portaobjetos, se cubre con un cubreobjetos y se procede a observar al microscopio.

**Muestra 1**: Sedimento urinario de mujer.

El PH del sedimento mediante el uso de papel indicador (color azul) es alcalino. Al microscopio se observan muchísimas bacterias, lo que coincide con el PH urinario obtenido, bastantes leucos, leucos conglomerados, algunos eritrocitos y algunas células epiteliales escamosas.

Conclusión: Tiene una infección aguda de orina.

Además de esta muestra se observó al microscópico las muestras de otros compañeros, pudiendo ver: cándida, espermatozoide, uratos amorfos y cristales de fosfato triple.

**RETETICIÓN DE LA PRÁCTICA: DÍA 18/11/2014**

**Muestra 2:** Se trata de un sedimento urinario de una mujer procedente del Hospital del Barbanza. El PH es básico determinado mediante papel indicador (color azul). Al microscopio se observan bacterias, lo que coincide con el PH urinario básico obtenido, bastantes leucos, y eritrocitos.

Conclusión: posible infección de orina.

**Muestra 3:** Se trata de un sedimento urinario de un varón procedente del Hospital del Barbanza. El PH es básico determinado mediante papel indicador (color azul). Al microscopio se observan eritrocitos, leucos y bacterias.

Conclusión: posible infección de orina.

**REPETICIÓN DE LA PRÁCTICA: DÍA 25/11/2014**

**Muestra 4:** Se trata de orina de una compañera de clase, por lo que se puede llevar a cabo el procedimiento general:

1. Inspección visual: aspecto claro, color amarillo, formación de espuma normal.
2. Análisis con tira reactiva:
	1. Urobilinógeno: normal
	2. Glucosa: negativo
	3. Bilirrubina: negativo
	4. Cetonas: ++40(3.9)
	5. Peso específico (densidad urinaria): 1.015
	6. Presencia de sangre: negativo
	7. pH: 7
	8. proteínas: trazas
	9. Nitritos: trazas
	10. Leucos: negativo
3. Obtención del sedimento y observación al microscopio de campo claro:
	1. Se observan algunas células epiteliales escamosas y algunas bacterias.
4. Conclusión: La alumna se encuentra bien, no tiene antecedentes de diabetes, anemia ni enfermedades renales, por lo que el dato de las cetonas y las proteínas puede deberse a que las tiras están caducadas. Aparecen algunas bacterias, da positivo en el test de nitritos, PH=7 pero no aparecen leucocitos por lo que puede que comience una infección o que se haya guardado mal la muestra y se hayan generado, se recogió la muestra por la mañana y se guardó en el frigorífico y el análisis fue por la tarde.

**Muestra 5:** Se trata de un sedimento urinario perteneciente a una mujer, la muestra proviene del Hospital del Barbanza, el PH es ácido (no cambio el color del papel indicador), la observación al microscopio revela la presencia de muchísimos uratos amorfos, bacterias y células epiteliales escamosas.

**Muestra 6:** Se trata de un sedimento de un varón, procedente del Hospital del Barbanza. No se pudo ver el PH ya que no quedaba papel indicador. La observación al microscopio reveló presencia de bacterias.

**Muestra7:** Se trata de un sedimento de un varón, procedente del Hospital del Barbanza. No se pudo ver el PH ya que no quedaba papel indicador. La observación al microscopio reveló presencia de bacterias, leucos, moco, células epiteliales escamosas y 2 espermatozoides.

# PRÁCTICA 5: ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS: DÍA 1/12/2014

**FUNDAMENTO:**

La electroforesis es una técnica basada en la separación de partículas con carga por medio de un campo eléctrico.

Hay distintos tipos de electroforesis, la que utilizamos en esta práctica se trata de una electroforesis, que consiste en una cubeta o cámara de electroforesis que contiene dos electrodos de carga opuesta situados en dos compartimentos conectados mediante un puente salino. Este puente salino tiene como objetivo permitir el paso de la corriente eléctrica. La función de puente salino la realiza el soporte de electroforesis que en el caso de análisis de proteínas son tiras de cellogel, que se empapan en el tampón de electroforesis. Se trata de un soporte no restrictivo en el que las partículas son separadas fundamentalmente en función de su carga eléctrica. El tampón utilizado tiene un PH de 9,5 por tanto alcalino por lo que las proteínas tendrán carga negativa y serán colocadas cerca del cátodo para que migren hacia el ánodo. La cámara de electroforesis debe estar tapada durante la electroforesis para minimizar la evaporización del tampón y evitar su concentración, ya que la fuerza iónica del medio es un factor determinante en la separación por electroforesis ya que cuanto más concentrado esté el BUFFER mayor será la proporción de corriente eléctrica transportada por el mismo y menor por las proteínas lo que implica que estas últimas migrarán más lentamente y la separación será peor o en un caso extremo no tendrá lugar. El potencial aplicado también es importante, cuanto mayor sea más rápido migran las partículas, el problema es que si se aumenta mucho el voltaje aumenta la temperatura y se pueden desnaturalizar las proteínas. Si se necesitará trabajar a potenciales mayores la cubeta debe tener un sistema de refrigeración.

**MATERIAL, REACTIVOS y MUESTRAS:**

**MATERIAL**

Vaso de precipitados

Varilla agitadora de vidrio

Botella de plástico.

Probeta de 1000mL.

Tiras de cellogel

Aplicador para electroforesis

Pipeta Parteur.

Cámara de electroforesis

Cristalizador

Fotodensitómetro.

**REACTIVOS:**

Buffer (triglicina de PH=9,5).

Colorante rojo de Ponceau.

Solución decolorante-transparentadora para rojo de Ponceau.

**MUESTRAS:**

Suero control patológico GERPATH

Suero calibrador GERNORM.

Tiras de cellogel con las proteínas ya separadas.

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:**

El análisis de proteínas séricas mediante electroforesis se divide en los siguientes pasos:

1. Separación de las proteínas mediante electroforesis.
2. Revelado.
3. Lectura y evaluación de las tiras electroforéticas de proteínas mediante un fotodensitómetro.

**Separación de las proteínas séricas mediante electroforesis:**

1. En primer lugar se debe proceder a la reconstrucción del BUFFER como indica en el sobre: se disuelve el contenido del sobre en un litro de agua destilada, para ello medimos 1000mL de agua destilada en una probeta, cogemos un vaso de precipitados, echamos un poco de esa agua destilada volcamos el contenido del sobre agitando con una varilla de vidrio y vamos echando el resto del agua destilada. Con un embudo lo introducimos en una botella la cual rotulamos con fecha, tipo de BUFFER (triglicina de pH=9,5).
2. Humedecemos cuatro tiras de cellogel en el BUFFER en un cristalizador durante 10min (11:25 a11:35).
3. Echamos el BUFFER en la cámara de electroforesis asegurándonos de que haya la misma cantidad en ambos compartimentos.
4. Se seca un poco las tiras antes de colocarlas, sacudiéndolas.
5. Se colocan las tiras en los puentes de la cámara, para lo que se sacan de la cámara y una vez colocadas las tiras se vuelve a poner en la cámara.
6. Las tiras se colocan con la parte brillante cara arriba y con la zona marcada con un corte en el lado del cátodo, para saber después al quitar la tira donde hemos aplicado la muestra.
7. Se procede a la dispensación de las muestras, en nuestro caso utilizaremos como muestras un suero control patológico GERPATH y un suero calibrador GERNORM. Se aplica con la ayuda de un aplicador. Colocamos las muestras en la primera ranura y en la cuarta, de la base del aplicador y se coloca la muestra en las ranuras con ayuda de una pipeta Pasteur. Se coge la otra parte del aplicador con forma de peine se mojan las púas en las ranuras de la base y se lleva el aplicador hasta la tira ya colocada en el puente con suavidad durante 10s. Debe dispensarse la muestra cerca del cátodo.
8. Se tapa la cámara y por último se enciende.
9. La migración se realiza durante unos 40min. (12:00 a 12:45).

**REVELADO:**

1. Apagar la cámara y abrir la tapa.
2. Se cogen las tiras y se colocan en un cristalizador con un poco de colorante en este caso usaremos rojo de Ponceau, suficiente para cubrirlas por completo. Se deja actuar 10min. (12:55 a 13:05).

**DECOLORADO Y TRANSPARENTADO:**

1. Se cogen las tiras y se colocan en un cristalizador con solución decolorante-transparentadora para rojo Ponceau, se agita suavemente se cambia la solución decolorante hasta que no sea capaz de eliminar más colorante.
2. Se saca y se coloca sobre un vidrio y se deja secar en la campana extractora de gases.

**OBSERVACIÓNES:**

No se produjo la separación, hay que ver si es problema de las tiras o de los sueros que están en mal estado.

Al día siguiente se observó que las tiras quedaron totalmente transparentes por lo que debe ser problema de los sueros utilizados y no de las tiras.

**LECTURAS DE LAS TIRAS**

Como salió mal la separación electroforética de las proteínas séricas hecha por nosotros, utilizaremos unas ya hechas en las que utilizaron como colorante negro de amido.

La lectura se hace mediante un fotodensitómetro:

Primero programamos el fotodensitómetro para determinación de proteínas séricas totales, y como colorante negro de Amido, se introduce el intervalo de normalidad que es el porcentaje mínimo y máximo para cada tipo de proteína y para obtener también concentraciones introducimos el dato de la concentración de proteínas totales determinado en la práctica 2 por espectrofotometría de absorción molecular UV-ViS. En caso de un paciente de verdad habría que determinar este parámetro previamente, en nuestro caso, para realizar la práctica utilizamos el dato de la práctica 2 por poner algo.

[proteínas séricas totales]= 3,7g/dL.

Le damos a imprimir, obteniendo la siguiente gráfica página 21:

**CONCLUSIONES:**

Si nos fijamos en la gráfica nos da valores normales para albúmina, alfa 2, beta y ganma pero no para alfa1 que esta aumentada. Se buscó en bibliografía y:

El aumento de las proteínas alpha-1 globulina puede deberse a:

* Enfermedad inflamatoria aguda
* Cáncer
* Enfermedad inflamatoria crónica (por ejemplo [artritis reumatoidea](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000431.htm), [LES](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000435.htm))

La disminución de las proteínas alfa-1 globulinas puede ser un signo de:

* [Deficiencia de alfa-1 antitripsina](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000120.htm)

