

**SUBMÓDULO 1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES  
TERCER PARCIAL  
COMPETENCIA: PREPARA REACTIVOS, COLORANTES Y MEDIOS DE CULTIVO.**

**ACTIVIDAD 1**

Indicación: Relaciona las filas dependiendo el tipo de sustancia.

								
<b>GHS01</b> Sustancias explosivas (EX)	<b>GHS02</b> Sustancias inflamables (IN)	<b>GHS03</b> Sustancias comburentes (CB)	<b>GHS04</b> Gas bajo presión (GZ)	<b>GHS05</b> Sustancias corrosivas (CR)	<b>GHS06</b> Toxicidad aguda categoría 1, 2, 3 (TD)	<b>GHS07</b> Toxicidad aguda categoría 4 (peligro al inhalar) (DA)	<b>GHS08</b> Cancerígeno, mutágeno (EX)	<b>GHS09</b> Dañino para medio acuático (EX)

**ACTIVIDAD 2**

**Reactivos Química Clínica**

- Solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%):

Cloruro de sodio	9.0 g
Agua destilada para aforar a:	1000.0 ml

Metabolismo de carbohidratos.

- Solución matriz de glucosa (10 mg/ml):

Dextrosa anhidra	1.0 g
Solución ácido benzoico al 0.25% para aforar a:	100.0 ml

- Solución patrón de glucosa (100 mg/100 ml = 1 mg/ml):

Solución matriz glucosa 10 mg/ml	10.0 ml
Solución ácido benzoico al 0.25% para aforar a:	100.0 ml

- Solución patrón de glucosa (10 mg/100 ml = 0.1 mg/ml):

Solución patrón glucosa (1 mg/ml)	10.0 ml
Solución ácido benzoico cuanto baste para (c.b.p.)	100.0 ml

- Ácido benzoico 0.25%:

Agua destilada	100 ml
Acido benzoico	0.5 g

Disolver el ácido benzoico en 50 ml de agua destilada en un vaso de precipitado, de ser necesario, utilizar calor. Pasar el contenido a un matraz aforado de 100 ml, enjuagar con 30 ml de agua destilada el vaso de precipitado y pasar al matraz, posteriormente aforar con el resto del agua destilada (20 ml).

- Reactivo O-toluidina al 5%:

Tiourea	3.0 g
Ácido acético glacial	1900.0 ml
O-TOLUIDINA	100.0 ml

Disolver hasta disolución la tiourea, conservar en frasco color ámbar a temperatura ambiente. Evitar el contacto con la piel.

### Compuestos nitrogenados

- Solución patrón de trabajo de nitrógeno ureico (20 mg N<sub>2</sub>/100 ml):

Agua destilada c.b.p.	500.0 ml
Urea	215.0 mg

Disolver la urea en agua y aforar a 500 ml, colocar en frasco de vidrio, agregar unas gotas de cloroformo para conservar y guardar en refrigeración.

- Solución fosfórica sulfúrica cúprica:

SOLUCIÓN A	
Ácido fosfórico al 85%	375.0 ml
Ácido sulfúrico concentrado	125.0 ml

Añadir lentamente y agitando el ácido sulfúrico concentrado.

SOLUCIÓN B	
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O)	6.0 g
Agua destilada	550.0 ml

Agregar la solución A lentamente y agitar a la solución B, dejar enfriar y guardar en frasco ámbar.

- Diacetilmonoxima (DAM) al 35%:

Diacetilmonoxima	3.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

Pesar 2.3 g y triturar en un vaso de precipitado con agitador de vidrio, ya pulverizado disolver en poca agua y pasar a un matraz para aforar a 100 ml. Guardar en frasco color ámbar en refrigeración.

- Solución matriz de creatinina (1 mg/ml):

Creatinina pura	100.0 mg
Ácido clorhídrico 0.1 N c.b.p.	100.0 ml

- Solución patrón de Creatinina (0.1 mg/ml):

Solución matriz de creatinina (1 mg/ml)	10.0 ml
Ácido clorhídrico 0.1 N o agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Solución patrón de Creatinina (0.01 mg/ml):

Solución matriz de creatinina 0.1 mg/ml	1.0 ml
Ácido clorhídrico 0.1 N o agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Ácido clorhídrico 0.1 N:

Acido clorhídrico concentrado	10.0 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Titular con solución valorada de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N y como indicador naranja de metilo.

- Indicador naranja de metilo:

Indicador anaranjado de metilo	0.050 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Solución acuosa saturada de ácido pícrico:

El ácido pícrico anhidro es muy explosivo y debe conservarse húmedo constantemente. Para preparar la solución saturada se debe colocar, en exceso, el ácido pícrico en un frasco de vidrio color ámbar que contenga agua destilada. Agitar de vez en cuando.

- Hidróxido de sodio (NaOH) al 10%:

Hidróxido de sodio	10.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Solución matriz de ácido úrico (1 mg/ml):

Colocar en un matraz volumétrico de 100 ml.

Acido úrico	100.0 mg
Carbonato de litio (Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	60.0 mg

Agregar 50.0 ml de agua destilada y calentar a 60 °C para disolver los reactivos, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar a 100.0 ml con agua destilada.

- Solución patrón de ácido úrico (0.015 mg/ml):

Solución matriz de ácido úrico (1 mg/ml)	3.0 ml
Agua destilada c.b.p.	200.0 ml

- Solución patrón de ácido úrico (0.01 mg/ml):

Solución matriz de ácido úrico (1 mg/ml)	1.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Solución patrón de ácido úrico (0.005 mg/ml):

Solución matriz de ácido úrico (1 mg/ml)	0.5 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Solución patrón de ácido úrico 0.004 mg/ml):

Solución matriz de ácido úrico (0.1 mg/ml)	0.1 ml
Agua destilada c.b.p.	25.0 ml

- Urea al 20%:

Urea	20.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

Conservar en refrigeración.

- Ácido tricloroacético al 5%:

Ácido tricloroacético	5.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Ácido tricloroacético al 10%:

Ácido tricloroacético	10.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Solución matriz de fósforo (0.08 mg/ml):

1. Disolver 0.3509 g de fosfato monopotásico anhidro en 500 ml de agua destilada, en un matraz aforado de 1000 ml.
2. Añadir 10.0 ml de ácido clorhídrico 10 N y diluir hasta la marca de aforo de 1000 ml.

- Solución matriz de fósforo (0.004 mg/ml):

Solución matriz de fósforo 0.08 mg/ml	5.0 ml
Ácido tricloroacético al 10% o al 5% c.b.p.	100.0 ml

- Reactivo de molibdato de amonio (fósforo inorgánico, método de Fiske y Subbarow):

Molibdato de amonio	12.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Disolver y agregar:

Ácido sulfúrico 10 N	150.0 ml
Agua destilada c.b.p.	500.0 ml

- Ácido sulfúrico 10 N:

A 130.0 ml de agua destilada se agregan con lentitud y agitando constantemente bajo chorro de agua 45.0 ml de ácido sulfúrico concentrado (densidad 1.84).

- Reactivo ácido aminonaftolsulfónico:

Solución de bisulfito sódico al 15%	195.0 ml
Ácido 1,2,4, aminonaftolsulfónico	0.5 g
Solución de sulfito sódico al 20%	5.0 ml

Agitar hasta que se disuelva el polvo, si la disolución no es completa se agrega sin dejar de agitar 1 ml de sulfito sódico cada vez hasta que la disolución sea completa. Se debe evitar el exceso de sulfito de sodio. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.

- Bisulfito sódico al 15%:

Bisulfito sódico	30.0 g
Agua destilada c.b.p.	200.0 ml

- Sulfito sódico al 20%:

Sulfito de sodio anhidro	20.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Sulfato sódico al 33.3% (también utilizado para flotación por Faust):

Sulfato de sodio	33.3 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Cloruro férrico al 5%:

Cloruro férrico	5.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

### Reactivos para hematología

- Solución de Hayem (diluyente eritrocitos):

Cloruro de sodio	1.0 g
Sulfato de sodio cristalizado	5.0 g
Cloruro mercúrico	0.5 g
Agua destilada c.b.p.	200.0 ml

- Solución de Gowers (diluyente eritrocitos):

Sulfato de sodio cristalizado	12.5 g
Acido acético glacial	33.3 ml
Agua destilada c.b.p.	200.0 ml

- Solución de formol y citrato trisódico (líquido de Dacie, diluyente eritrocitos):

Formaldehído al 40% (formaldehído comercial)	10.0 ml
Citrato trisódico	31.3 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

- Ácido clorhídrico al 1%:

Ácido clorhídrico	1.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Diluyente de Turck (diluyente de blancos):

Ácido acético glacial	2.0 ml
Cristal violeta solución 1%	1.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Ácido acético glacial al 2, 3, 5 o 30% (% v/v) (diluyente de blancos):

Ácido acético glacial	2.0, 3.0, 5.0 o 30 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Ácido clorhídrico al 1% (diluyente de blancos):

Ácido clorhídrico	6.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Oxalato de amonio al 1%:

Oxalato de amonio	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Líquido diluyente de Randolph para eosinófilos:

SOLUCIÓN MADRE 1	
Azul de metileno	0.1 g
Propilenglicol c.b.p.	100.0 ml

SOLUCIÓN MADRE 2	
Floxina (colorante ácido)	0.1 g
Propilenglicol c.b.p.	100.0 ml

- Líquido de Dunger:

Solución acuosa de eosina al 2% (p/v)	10.0 ml
Acetona	10.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

Estable en refrigeración de 2 a 3 semanas y debe filtrarse para su uso.

- Líquido de Hinkleman:

Amarillo de eosina	0.5 g
Formaldehído al 40% (formaldehído comercial)	0.5 ml
Fenol (solución acuosa al 95%)	0.5 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

Filtrar la solución después de preparada y guardar en refrigeración.

- Colorante de Giemsa:

Colorante de Giemsa en polvo	0.75 g
Alcohol metílico	75.0 ml
Glicerina Q.P.	25.0 ml

Disolver por calentamiento a 60 °C, filtrar y conservar en frasco bien tapado.

- Colorante de Wright:

Colorante de Wright en polvo	1.0 g
Alcohol metílico	600.0 ml

Dejar en reposo durante 15 días para desarrollar la policromía.

- Colorante de Leishman:

Colorante de Leishman en polvo	0.25 g
Alcohol metílico	100.0 ml

Se deja en reposo tres semanas.

- Colorante de May-Grunwald

Pesar 0.3 g de colorante en polvo y colocar en matraz de 250 ml, añadir 100.0 ml de metanol y calentar la mezcla a 50 °C, dejar enfriar a temperatura ambiente y agitar de vez en cuando. Después de 24 horas, filtrar la solución y colocar en frasco.

- Agua destilada tamponada de pH entre 6.40 y 6.50:

Fosfato disódico	4.539 g
Fosfato monopotásico	5.940 g
Agua destilada	100.0 ml

De esta solución tomar 9.54 ml y aforar a 2000 ml con agua destilada.

- Agua destilada tamponada (amortiguadores de fosfatos) para colorantes de Romanowsky:

AMORTIGUADORES		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 M (2.722% p/v)	NAOH 0.2 M (0.8% p/v)	
ml	ml	pH
50.0	17.8	6.6
50.0	21.0	6.7
50.0	23.7	6.8
50.0	26.5	6.9
50.0	29.6	7.0

- Solución de fosfato de Sörensen (solución stock 0.66 mol):

Solución A: PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	9.1 g/l
Solución B: PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	9.5 g/l
Cuando se usa PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	11.9 g/l

Para obtener una solución de pH requerido, añadir soluciones A y B en la proporción indicada.

EL pH DE DIVERSAS SOLUCIONES					
pH	SOL. A	SOL. B	pH	SOL. A	SOL. B
5.4	97.0	3.0	6.8	50.8	49.2
5.6	95.0	5.0	7.0	38.9	61.1
5.8	92.0	7.8	7.2	28.0	72.0
6.0	88.0	12.0	7.4	19.2	80.8
6.2	81.0	19.0	7.6	13.0	87.0
6.4	73.0	27.0	7.8	8.5	91.5
6.6	63.0	37.0	8.0	5.5	94.5

□ *Agua destilada tamponada*

Tomar 50.0 ml de tampón de Sörensen 0.066 mol y añadir agua destilada hasta 1000 ml.

□ Formol-etanol al 1%:

Etanol al 95%	90.0 ml
Formaldehido al 40% (formaldehido comercial)	10.0 ml

□ Hematoxilina de Mayer:

Hematoxilina de Mayer polvo	2.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

□ Reactivo de Drabkin:

Ferricianuro de potasio	0.200 g
Cianuro de potasio	0.050 g
Bicarbonato de sodio	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Conservar en frasco ámbar.

□ Carbonato de sodio al 1%:

Carbonato de sodio	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

□ Hidróxido de amonio al 0.4%:

Hidróxido de amonio (peso específico 0.88)	0.4 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

□ Colorante azul de cresilo brillante:

Azul de cresilo brillante, hidrosoluble	1.0 g
Citrato de sodio	0.4 g
Cloruro de sodio al 0.85%	100.0 ml

Disolver el colorante en la solución salina, añadir el citrato de sodio, mezclar y filtrar para su uso.

□ Formol-etanol al 1%:

Etanol al 95%	90.0 ml
Formaldehido al 40% (formaldehido comercial)	10.0 ml

□ Hematoxilina de Mayer:

Hematoxilina de Mayer polvo	2.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

□ Reactivo de Drabkin:

Ferricianuro de potasio	0.200 g
Cianuro de potasio	0.050 g
Bicarbonato de sodio	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Conservar en frasco ámbar.

□ Carbonato de sodio al 1%:

Carbonato de sodio	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

- Hidróxido de amonio al 0.4%:

Hidróxido de amonio (peso específico 0.88)	0.4 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

- Colorante azul de cresilo brillante:

Azul de cresilo brillante, hidrosoluble	1.0 g
Citrato de sodio	0.4 g
Cloruro de sodio al 0.85%	100.0 ml

Disolver el colorante en la solución salina, añadir el citrato de sodio, mezclar y filtrar para su uso.

**Planteamientos de problemas:**

1. Plantear el problema para preparar 100 ml de una solución matriz de glucosa (dextrosa) 10 mg/ml.
2. Plantear el problema para preparar 100 ml de una solución patrón de glucosa 100 mg/100 ml.
3. Plantear el problema para preparar 100 ml de una solución de glucosa 10 mg/100 ml (= 0.1 mg/ml).
4. Plantear el problema para preparar 1000 ml de una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9 por ciento.
5. Plantear el problema para preparar 100 ml de una solución de ácido tricloroacético al 5 por ciento.

**AMORTIGUADORES ( BUFFERS)**

Mg.Sc. Dra. Bustamante Cabrera Gladys<sup>1</sup>  
Cordon Patiño Catherine<sup>2</sup>

**RESUMEN**

La capacidad de regulación del medio ácido o alcalino a través de sustancias denominadas amortiguadoras, es una propiedad bien definida del cuerpo humano, mediante la cual, se establecen relaciones de equilibrio entre elementos ácidos y básicos.

Es de esta forma que la homeostasis corporal, logra mantener las funciones vitales, ante cualquier cambio en el pH del medio, produciendo, excretando o reabsorbiendo sustancias, que se organizarán de dentro hacia fuera de la célula y en forma inversa, cuando los cambios sucedan en cualquier lado de la membrana.

De esta manera, las sustancias que se convierten en reguladoras del pH, reciben el nombre de sustancias "buffer" o "tampones fisiológicos", siendo el más importante, el sistema bicarbonato, al cual se unen con menor intensidad el sistema fosfato y la hemoglobina, así como los sistemas regulatorios pulmonares y renales a partir de la concentración de H<sup>+</sup>, de esta forma, la regulación sanguínea, intersticial y proteica, se entrelazan en una acción compleja, controlando y reponiendo el pH de la sangre, ante cualquier modificación que ponga en riesgo su estabilidad.

La necesidad del conocimiento sobre el tema, permite al clínico orientar su

manejo ante circunstancias que condicionan acidosis o alcalosis.

**PALABRAS CLAVE**

Sustancias buffer. Tampón fisiológico. Bicarbonato. Fosfato. Acido Carbónico. pH

**INTRODUCCION**

Todo organismo vivo produce en forma constante ácidos orgánicos resultantes de reacciones metabólicas, catabolismo proteico y otras moléculas activas, lo que genera un grado de acidez a los fluidos intra y extracelulares, que puede ser medido por el pH, el cual puede a su vez ser regulado a partir de los llamados " tampones fisiológicos" o sustancias "buffer", así como por la eliminación de ácidos o bases a través de los pulmones o riñones.<sup>1,2</sup> Los fluidos orgánicos, así como las sustancias que se encuentran disueltas en ellos, pueden tener cambios en el pH, en función al tipo de ingesta alimenticia y las reacciones metabólicas existentes, por lo que la falta de esta regulación, puede llevar a reacciones indeseables en el organismo. De esta manera la respuesta inmediata producida por las sustancias tampón o buffer (fosfato, bicarbonato y hemoglobina), ante variaciones del pH se constituyen en la primera barrera de defensa para la estabilización de dichos cambios.<sup>1,3-5</sup>

Los amortiguadores están formados por un ácido débil y su base conjugada o una base débil con su ácido conjugado, de manera que en caso de existir exceso de ácidos, sea la base que reacciona ante tal situación y viceversa.<sup>2,5</sup> Es así que la formación de aniones GAP (8-16 mEq/L) hacen que se mantenga la electroneutralidad de las soluciones, considerándose a este grupo de

<sup>1</sup> Médico Especialista en Medicina Interna. Docente Emérito UMSA. Mg.Sc. Psicopedagogía y Educación Superior. MBL. Dirección de desarrollo Local. Mg.Sc. Gestión, planificación y evaluación de proyectos. Miembro CNB.  
<sup>2</sup> Univ. Tercer Año Facultad de Odontología UMSA

elementos como la diferencia entre aniones plasmáticos que normalmente no se encuentran (catión más abundante) y los aniones medidos más abundantes. El valor esperado debe oscilar entre 10-14 Meq/L, valor que deberá ser corregido ante la presencia de bajos niveles de albumina.<sup>6</sup>

Tomando en cuenta que el plasma sanguíneo y el fluido intersticial e intracelular tienen composición diferente en la concentración de electrolitos, se comprenderá que cada célula del organismo tiene un sistema propio de regulación de estas concentraciones, donde los aniones bicarbonato, fosfato mono y dibásico y proteínas, se constituirán el sistema regulador más importante, estableciendo pH de 7.35 a 7.45 como valor normal.

Es así que los sistemas amortiguadores pueden ser:

- a) Sanguíneos: donde interviene proteínas como la hemoglobina (Hb), oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>), sistema bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sistema fosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).
- b) Plasmáticos e intersticiales: donde intervienen el sistema bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).
- c) Intracelulares: donde intervienen predominantemente el sistema fosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) y las proteínas (Hb/HbO<sub>2</sub>).<sup>3</sup>

### TEORIA DE ARRENIUS

El físico químico Svante August Arrhenius en 1884 planteó en su tesis doctoral que los iones, formados por carga eléctrica positiva, tenían movilidad en el agua, por lo que eran considerados como elementos conductores de electricidad, y que estos iones aumentan

su disociación mientras mayor sea la dilución de la disolución.

Según este científico las bases son sustancias que producen hidroxilo (OH<sup>-</sup>) cuando se disocian al disolverse en agua.

Esta teoría ha sido criticada por muchos estudiosos quienes aseguran que el concepto de ácido ha sido limitado a especies químicas que contienen hidrógeno, mientras que el concepto de bases, limitan a todas las especies que contienen hidroxilo, además que su referencia sobre la disociación de estas sustancias, se refiere a aquellas donde hay base acuosa, excluyendo a las reacciones que suceden en lugares donde hay ausencia de agua.<sup>6-7</sup>

### BICARBONATO

El bicarbonato es una sal ácida derivada del ácido carbónico, de sabor ácido y de color blanco amarillento y constituye el principal amortiguador ácido-básico del organismo.

Este elemento químico se origina del metabolismo del ácido carbónico cuando este pierde uno o dos protones y tiene la capacidad de alcalinizar el medio donde se encuentra disuelto.

### FOSFATOS

La vía de las pentosas fosfato, es una vía secundaria del metabolismo de la glucosa, con el fin de generar reducción de NADPH<sup>+</sup>H<sup>+</sup>, producir pentosas como la ribosas-5-P, para la formación de ácidos nucleicos y la formación de monosacárido fosfato, para la producción de CO<sub>2</sub>.

El HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> producido al interior de la célula, luego del proceso tampón de la hemoglobina difunde por la membrana del glóbulo rojo e intercambia con iones

cloro (Cl<sup>-</sup>) del plasma, mediante el mecanismo denominado "desplazamiento del cloruro"

### HEMOGLOBINA

Es una proteína globular que se encuentra en gran cantidad en los glóbulos rojos, siendo el transportador de O<sub>2</sub> desde los pulmones hacia todos los tejidos del cuerpo, así como del CO<sub>2</sub> y de H<sup>+</sup> de los tejidos hacia los pulmones.

Su anillo imidazólico, fijado con una histidina proximal, le permite tener el efecto tampón. Es decir que la oxigenación de la Hb aumenta la acidez del medio, al intervenir el H<sup>+</sup> en dicha fijación, mientras que la desoxigenación aumenta su capacidad de base.

El momento en el que el CO<sub>2</sub> llega al eritrocito reacciona con el H<sub>2</sub>O, por acción de la anhidrasa carbónica, produciendo (90%) y carbamino Hb (7%). El H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pasa directamente a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, liberando un H<sup>+</sup>, que se une a la desoxi Hb, produciendo desoxi Hb<sup>+</sup>, reteniendo dos hidrogeniones por cada O<sub>2</sub> que pierde. De esta forma la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> es transportado, produciéndose un proceso inverso a nivel pulmonar.

### MECANISMO DE REGULACION DE LOS AMORTIGUADORES BICARBONATO

Normalmente, el producto del metabolismo de las células, es la producción de protones, que son sustancias ácidas, que de no ser eliminadas, aumentarían la acidez del espacio intersticial y del plasma. Así producidos los ácidos, el primer sistema en intervenir es el del bicarbonato que usa su base conjugada logrando la formación de ácido carbónico, el que circula por el torrente circulatorio,

llegando a los pulmones, donde se descompone por acción de la anhidrasa carbónica, en agua y dióxido de carbono (H<sub>2</sub>O + CO<sub>2</sub>), siendo este último eliminado por los pulmones.

Se comprende entonces que el CO<sub>2</sub> formado en los tejidos corporales, es arrastrado por el sistema bicarbonato en forma de ácido carbónico, y que la reacción enzimática en la que interviene la anhidrasa carbónica en el glóbulo rojo, cuenta además con la participación de la hemoglobina en su forma básica y ácida, facilitando la conversión del CO<sub>2</sub>, expelido en la respiración.

Este sistema amortiguador bicarbonato, básico e importante, puede en algún momento, ser superado por la producción de ácidos, y el consumo de toda la fuente de bicarbonato, activando de esta manera la reposición de dicho anión a nivel renal, sistema fisiológico que empieza a extraer del cuerpo el bicarbonato en forma de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el que por acción de la misma anhidrasa carbónica, disocia a esta molécula, convirtiéndola en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> más hidrogeniones (H<sup>+</sup>), esta última sustancia se intercambia por sodio (Na), de forma tal, que por cada molécula de Na filtrada, se elimina un hidrogenión por la orina, acidificando de esta forma, este fluido orgánico, el cual deberá de igual forma que todos los fluidos del cuerpo, mantener un pH óptimo, que en su caso es de aproximadamente 6, el que puede sin embargo, ser modificado en caso de excreciones exageradas o insuficientes de hidrogeniones, lo que producirá cambios en la fisiología renal.

Como se ha visto hasta el momento, la regulación del pH en los sistemas orgánicos es importante, de tal forma que se debe mantener un pH sanguíneo de 7,4 y una proporción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> /H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 20:1.<sup>2</sup>

### MECANISMO DE REGULACION DE LOS AMORTIGUADORES FOSFATO

Si bien el pH corporal, permite la vida mientras se encuentre entre 7,00 y 7,80, los procesos relacionados a acidosis se encuentran con un pH menor a 7,35, mientras que la alcalosis se presenta cuando el pH supera los 7,45, con las consiguientes alteraciones respiratorias y metabólicas.

El sistema de amortiguación de los fosfatos, permite de igual forma, pero con menor participación, la regulación del pH sanguíneo, a través de la formación del fosfato monoácido ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) en fosfato diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) que será excretado por la orina, el protón eliminado será intercambiado de la misma manera como se explicó anteriormente, por un ión  $\text{Na}^+$ .<sup>9-10</sup>

### MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA REGULADOR DE LAS PROTEINAS

Las proteínas involucradas en la formación y transporte del ácido carbónico, se orientan principalmente a la hemoglobina, elemento que participa en forma importante en la amortiguación de las sustancias. Es de esta forma, que la desoxihemoglobina se convierte en un regulador de mejor calidad que la oxihemoglobina, en el sentido que la capacidad de captación de oxígeno por los tejidos mejora la capacidad de regulación de la Hb, constituyéndose en la proteína de mejor y mayor capacidad de tampón, en relación a otras proteínas plasmáticas.

La capacidad de amortiguación de las proteínas se debe a la presencia de:

- a) Grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos (AA): aspartato (Asp), glucosa (Glu), lisina (Lys),

- arginina (Arg), histamina (His), tirosina (Tyr), cisteína (Cys).
- b) Grupos  $\text{COOH}$  y  $\text{NH}_2$  terminales.

El grupo imidazólico de la histidina será el principal responsable del poder de amortiguación de las proteínas ante cambios del pH, debido a que su pK está cerca a 7. Es así que cuando se encuentra un pH bajo, los grupos ionizables se protonan y su carga es positiva, mientras que si el pH es alto, los grupos se desprotonan y su carga se hace negativa.<sup>9-10</sup>

La hemoglobina al ser una proteína globular, que tiene la capacidad de transportar oxígeno, regula la producción de  $\text{H}^+$ , de dos formas:

- a) mediante un efecto amortiguador, combinándose con  $\text{H}^+$ , en este caso su capacidad procede de los grupos ionizables, con un pK cercano al pH dentro del eritrocito, pero no puede amortiguar la cantidad total de  $\text{H}^+$  que fue generado por el transporte de  $\text{CO}_2$  y eso explica la pequeña diferencia del  $\pi$  que existe entre la sangre arterial y venosa.
- b) mediante un mecanismo izohídrico, denominado efecto de Bohr, el que consiste en la disminución de la afinidad de la hemoglobina por el  $\text{O}_2$ , cuando el pH disminuye.

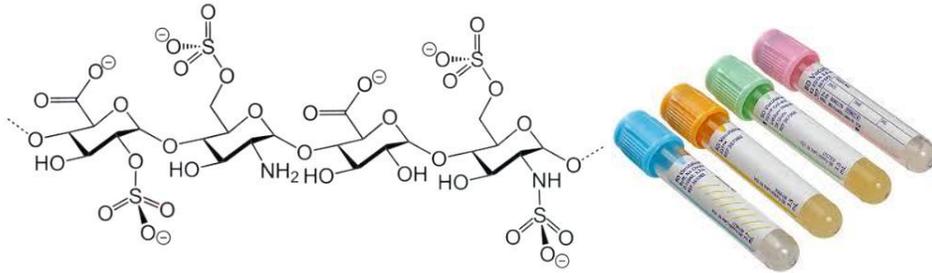
### BIBLIOGRAFIA

1. Túnez Fiñana I., Galván Cejudo A., Fernández Reyes E. pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. URL disponible en : <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/06%20pH%20AMORTIGUADORES.pdf> Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013

2. Vega Avila E., Konigsberg Fainstein M., La importancia biológica de los sistemas amortiguadores. URL disponible en: <http://www.izt.uam.mx/newpage/cont actos/anterior/n42ne/sistam.pdf> Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013
3. Martin A. M. Soluciones reguladoras de pH. URL disponible en: <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/SOLUCIONES%20REGULADORAS%20DE%20pH.pdf> Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013.
4. Hidrólisis y soluciones buffer. URL disponible en: [http://www.qui.utfsm.cl/~qui010/docs/Acidos\\_y\\_Bases\\_III\\_Hidrolisis\\_y\\_Soluciones\\_Buffer.pdf](http://www.qui.utfsm.cl/~qui010/docs/Acidos_y_Bases_III_Hidrolisis_y_Soluciones_Buffer.pdf) Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013.
5. Ruiz Márquez M.J., Ortiz García C., Sánchez Luque J.J. Trastornos del equilibrio ácido base.
6. Medicina Interna División Clínica . Hospital General de Agudos Dr. Cosme Argerich. Acidosis metabólica. URL disponible en: [http://www.intramed.net/sitios/libro\\_virtual/pdf/41.pdf](http://www.intramed.net/sitios/libro_virtual/pdf/41.pdf) Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013
7. Reacciones Acido base. Cap 3. URL disponible en: [http://www.geocities.ws/iq\\_comision1/apuntes/problemas/Cap3\\_1.pdf](http://www.geocities.ws/iq_comision1/apuntes/problemas/Cap3_1.pdf) Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013
8. Lehninger, Mathews, Stryer, Voet. Tema 22 Ruta de las pentosas fosfato. URL disponible en: [http://www2.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica/Farmacologia/R-T22-pentosas-11.pdf](http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica/Farmacologia/R-T22-pentosas-11.pdf) Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013
9. Curso de biomoléculas. Universidad del país Vasco. URL disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/index.htm> Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013
10. Capítulo 8. Los amortiguadores fisiológicos. URL disponible: <http://www.fundabiomed.fcs.uc.edu.ve/cap82.pdf> Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013.
11. Brandan N., Aguirre M.V. Cátedra de Bioquímica Hemoglobina 2008: 1-10. URL disponible en: <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hemoglobina.pdf> Fecha de acceso: 26 de octubre del 2013.



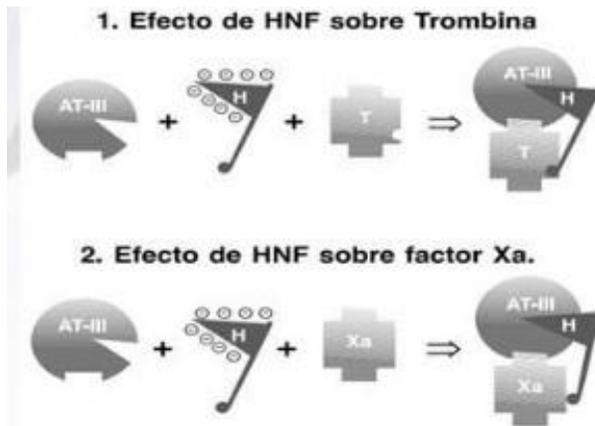
**Heparina:** la heparina es un anticoagulante utilizado para diversas determinaciones dentro del laboratorio clínico. Se trata de una molécula con varios grupos sulfato (los cuales proveen a la molécula con varias cargas negativas) además de estar compuesta por una cadena muy larga de azúcares, (los cuales dan la capacidad de interactuar con las proteínas que se asocian al proceso de coagulación).



Se puede encontrar en 2 formas:

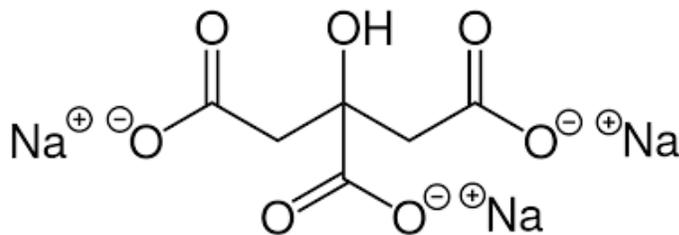
1. Heparina de sodio (aplicado por aspersión en las paredes de los tubos)
2. Heparina de Litio (aplicado por aspersión en las paredes de los tubos)

Ambas presentaciones de Heparina se pueden utilizar para realizar determinaciones en la cuales se requiere plasma. Por otro lado, la Heparina de Litio también se puede utilizar para procesar muestras de química clínica, electrolitos y amonio.



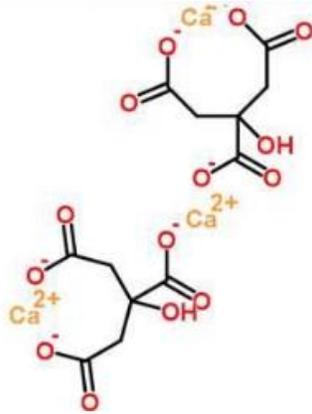
**Fundamentos de la Heparina:** La heparina potencializa la formación de complejos entre la antitrombina III y proteasas de serina: Ixa, IXa y Xia (sustancias que desempeñan un papel muy importante en la formación de coagulo) evitando así la formación del coagulo.

**Citrato de Sodio:** La solución de citrato trisódicodihidratado, se utiliza para la obtención de "plasma citratado" el cual es utilizado en pruebas de coagulación sanguínea.



Tapón azul.

Es posible encontrar citrato de sodio al 3.2 % y 3.8%. El citrato de sodio al 3.2% ha sido usado en varios estudios de elaboración de calibradores internacionales de referencia por lo que, a dicho porcentaje, es de utilidad para obtener valores de INR (International Normalized Ratio por sus siglas en inglés) más confiables comparados con los tubos de citrato de sodio 3.8%, ya que estos últimos presentan valores alto de INR en muestras de pacientes que reciben terapia oral de anticoagulantes. **Fundamento del citrato de sodio:** El citrato de sodio se une al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) presente en la sangre, provocando que desaparezcan los iones de calcio del plasma y evitando así la coagulación sanguínea.



□ EDTA al 5%:

EDTA (sal dipotásica o disódica)	5.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

□ Dextrosa citrato ácida (ACD):

Anticoagulante utilizado anteriormente en transfusiones de sangre porque ayuda a conservar los eritrocitos.

Citrato disódico (monoácido)	2.0 g
Dextrosa	3.0 g
Agua destilada (sin pirógenos)	120.0 ml

Se utiliza 1 ml de ACD por 4 ml de sangre y debe conservarse en refrigeración.

□ Citrato de sodio 0.1 M:

Citrato trisódico	3.13 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

□ Citrato de sodio al 3.8%:

Citrato trisódico	3.8 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

□ Oxalato de amonio y potasio:

Oxalato de amonio	1.2 g
Oxalato de potasio	0.8 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Oxalato de potasio al 10%:

Oxalato de potasio	10.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

- Heparina, 1000 UI/ml (10 mg/ml):

Heparina en concentración de 100 UI/ ml equivalente a: 100 000 UI/g	10.0 mg
Agua destilada	1.0 ml

- Heparina, 20 unidades USP/ml (0.20 mg/ml):

Heparina en concentración de 100 UI/ ml equivalente a: 100 000 UI/g	0.20 mg
Agua destilada	1.0 ml

## ACTIVIDAD 4

# Colorante

**Colorantes** Los colorantes son sustancias de origen químico o biológico, generalmente tintes, pigmentos, reactivos u otros compuestos, empleados en la coloración de tejidos microorganismos para exámenes microscópicos, debiendo tener al menos, un grupo cromóforo que le proporcione la propiedad de teñir.

Fuente de obtención de los colorantes.

---

Atendiendo a la fuente de obtención, los colorantes se clasifican en naturales y sintéticos.

**Colorantes naturales.** Los colorantes naturales son básicamente histológicos, encontrándose entre los empleados con mayor frecuencia, los siguientes:

- Índigo: Se obtiene de diversas especies de plantas del género indigófera que contiene indican, el cual se fermenta para producir el colorante.
- Carmín: Se produce, mediante el tratamiento con alumbre y otras sales metálicas a hembras del insecto cochinilla "Coccus castis".
- Orceína y Tornasol: Se obtiene mediante el procesamiento industrial de líquenes de los géneros: Le canora tinctoria y Rosella tinctoria.
- Hematoxilina: Este colorante se extrae con éter de la madera de un árbol oriundo de México y de algunos países suramericanos denominados Hematoxylum campechianum.

**Colorantes sintéticos.** Se obtiene de la anilina, o es más exactamente del alquitrán de hulla siendo todos derivados del benceno.

### Clasificación

---

Los colorantes se clasifican, teniendo en cuenta si la propiedad tintorial se encuentra en el anión o el catión de su estructura química. Sobre esta base se pueden dividir en tres grupos: básicos, ácidos y neutros.

- **Colorantes básicos:** La acción colorante está a cargo del catión, mientras que el anión no tiene esa propiedad, por ejemplo: - cloruro de azul de metileno+.
- **Colorante ácido:** Sucede todo lo contrario, la sustancia colorante está a cargo del anión, mientras que el catión no tiene propiedad, por ejemplo: eosinato- de sodio+
- **Colorantes neutros:** Están formados simultáneamente por soluciones acuosas de colorantes ácido y básicos, donde el precipitado resultante, soluble exclusivamente en alcohol, constituye el colorante neutro, que tiene la propiedad tintorial de sus componentes ácidos y básicos, por ejemplo: la giemsa.

## **Afinidades tintoriales.**

---

En el proceso de la coloración, ocurre una combinación de reacciones físicas y químicas.

- Reacción física.

Ocurre un fenómeno de absorción similar al que tiene lugar en las materias porosas, considerando que el colorante penetra en los intersticios del cuerpo coloreable y se mantiene allí por la cohesión molecular.

- Reacción química

Las células microbianas son ricas en ácidos nucleicos que portan cargas negativas en formas de grupos fósforo combinándose como colorante básicos cargados positivamente. Los colorantes ácidos que tienen la acción colorante en el anión no tiñen la célula, empleándose como colorante de contraste para colorear su entorno, como por ejemplo: la tinta china o la eosina que no colorea al microorganismo, pero si el fondo del campo microscópico.

## **Toxicidad de los colorantes. Ventajas y Desventajas.**

---

Los colorantes son sustancias tóxicas, por lo tanto el proceso de la tinción generalmente resulta letal para los microorganismos, provocando su inmovilización, lo cual puede significar una ventaja o desventaja para el investigador según sean los objetivos con la sustancia colorante. Veamos algunos Ejemplos:

1. Al ocasionar la muerte de los microorganismos sometidos al proceso de tinción se reducen las posibilidades de contaminación para el manipulador.
2. Los colorantes pueden ser tóxicos para el manipulador, algunos incluso han resultado cancerígenos por lo que ha habido la necesidad de retirarlos del mercado.
3. Algunos colorantes solo tienen efecto letal para determinadas especies o géneros bacterianos, siendo utilizados como constituyentes de medios de cultivo selectivo para impedir el desarrollo de microorganismos indeseables y favorecer el desarrollo de las especies que nos interesa estudiar. Por ejemplo: el verde de malaquita.
4. Otros se emplean como desinfectantes microbianos, más que para teñir, con fines de microscopía, por sus propiedades bacterianas o bacteriostáticas.
5. Algunos tipos de colorantes son empleados no para teñir, sino como indicadores de pH, formando parte de la composición de los medios de cultivo para indicar los cambios de basicidad o acidez que se vayan produciendo en el medio como consecuencia de su actividad metabólica. Ejemplo: rojo fenol, azul de bromotimol, etc.

## **Métodos de coloración**

---

Atendiendo a los objetivos que se persigan, los métodos de coloración se clasifican en: Tinción simple, tinción compuesta y tinción especial.

- Tinción simple: En la tinción simple se utiliza un solo colorante con el que se tiñe rápidamente el microorganismo, utilizándose fundamentalmente para observar su morfología y tamaño. Los colorantes empleados con mayor frecuencia para este tipo de tinción son los siguientes: azul de metileno, violeta cristal y fucsina fenicada, entre otros.
- Tinción compuesta: En este tipo de tinción, se utiliza más de una sustancia tintórea. Los colorantes se aplican, a la preparación, separados o juntos, formando parte de una solución. En consecuencia se puede determinar algunas características propias de diversos géneros que permiten diferenciarlo de los demás, por lo que reciben también el nombre de coloraciones diferenciales. Entre los métodos más utilizados se encuentran: La coloración de Gram. y la de Ziehl Neelsen.

### **Coloración de Gram.**

En 1884, el danés Hans Christian Gram, ideó un método de coloración, que es en la actualidad, el más empleado en los laboratorios de bacteriología, mediante el cual, la bacteria sometida a esta tinción, en dependencia de la composición química de la especie, queda teñida de color violeta o de color rojo.

**Principios.** A pesar de que esta técnica de coloración se ha venido empleando desde hace más de un siglo, aún no se ha podido determinar con exactitud la base molecular de la reacción, existiendo controversias al respecto. El criterio más generalizado es que la violeta y el lugol forman un complejo que reacciona con los componentes bioquímicos de la pared celular deshidratada, fijándose en esta. Teniendo en cuenta que la composición química de la pared, no es igual en todos los géneros, la reacción resultante será obviamente diferente, lo que da lugar, que mientras algunos géneros retienen firmemente el colorante al resultar el complejo impenetrable para el decolorante, en otros géneros la barrera que se produce es más permeable, lo que permite al solvente penetrar y extraer el complejo violeta-lugol, dejando a la bacteria nuevamente incolora.

**Fundamento técnico** En el primer paso de la coloración, cuando los microorganismos presentes en el frotis son expuestos a la acción colorante de la violeta de genciana, todos los géneros que se encuentran en el frotis se tiñen de color violeta. Al adicionar el lugol, no se produce ningún cambio de color, ya que el lugol no es un colorante, sino un mordiente, que se adiciona con el objetivo de formar un complejo violeta-lugol, para fijar el color en la bacteria. Al adicionar el decolorante (alcohol etílico o alcohol acetona) algunos géneros no son afectados por estos solventes, reteniendo por consiguiente el color violeta aplicado inicialmente, en tanto que otros son decolorados quedando la bacteria nuevamente incolora. Al echar finalmente la solución de safranina (que es de color rojo) las especies que no fueron decoloradas, mantienen la coloración violeta ya que la safranina es un colorante más débil que la violeta y su adición no influye significativamente en cambio de color, en tanto que los géneros que fueron decolorados por el alcohol, se tiñen con la safranina, adquiriendo un color de 199.

### **Coloración de "Ziehl Neelsen.**

Algunos géneros microbianos dentro de los que se incluyen las microbacterias, tienen la propiedad de retener el colorante con que han sido teñidas, aunque sean sometidos a la acción de solventes tan fuertes como los ácidos para su decoloración, el primer método de coloración para este tipo de microorganismo, fue concebido y aplicado por Robert Koch, descubridor del agente causal de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* o Bacilo de Koch. Fue modificada y perfeccionada posteriormente por Ziehl y Neelsen. Este método se utiliza hoy en día, con alguna que otra modificación en función de las particularidades de la especie en estudio.

**Principio** Las microbacterias, como el *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies susceptibles de ser coloreadas por esta técnica, se caracterizan por tener una alta proporción de ácido micólico (lípidos) en su pared celular. La acción del calor, introducido en este método, hace que la misma se permeabilice y haga accesible la penetración de la fucsina, tiñéndose la pared celular. Al normalizarse la temperatura de la preparación, el compuesto lipídico impermeabiliza la pared a la acción del decolorante ácido, con lo cual el microorganismo se mantiene teñido. El resto de las especies, así como las células epiteliales y otros artefactos, que no disponen de ácido micólico en su pared o membrana, son decolorados, después de teñidos por la fucsina.

**Fundamento técnico** Al someter el frotis a la acción de la Fucsina, todos los microorganismos, independientemente de que dispongan o no de ácido micólico en sus respectivas paredes celulares serán coloreados de rojo. Al aplicar el decolorante ácido, las especies que posean el ácido micólico en la pared, resisten la acción decolorante y se mantienen teñidas de rojo, en tanto que las demás se quedan incoloras. Al aplicar la coloración de contraste (azul de metileno) las bacterias que retuvieron el color proporcionado por la fucsina, no sufren ninguna alteración permaneciendo de color rojo, pero las especies que si fueron decoloradas, se tiñen de azul, al igual que las células epiteliales y otros artefactos presentes en la preparación.

### **Coloración Fragar de Leifson (modificación de Clark)**

Los flagelos son estructuras, cuyo diámetro no excede de los 30nm, lo cual está muy por debajo del poder de resolución del microscopio óptico. Para hacer visibles a los flagelos se requiere aumentar su grosor, para lo cual se emplea una suspensión de ácido tánico que al precipitarse sobre su cubierta forman una capa que aumenta aparentemente su diámetro. Lo que propicia que al ser posteriormente coloreado, tanto los flagelos como su disposición con respecto al bacilo se hagan visibles al microscopista.

### **Coloración de cápsula.**

La cápsula es una sustancia viscosa producida por algunas especies que la sintetizan a partir de polipéptidos, polímeros de glucosa u otros amino azúcares que contienen nitrógeno, que después de combinarse con el agua es segregada por

todo el contorno de la pared celular como un moco gelatinoso. Cuando la cápsula ha sido producida puede observarse en los frotis coloreado por el método de Gram como un halo incoloro alrededor de la bacteria. Cuando se requiere ver la cápsula con más detalle o inducir su producción se recurre a coloraciones especiales.

## Preparación de colorantes

1. **Acido-Alcohol:** (decolorante para tinción Ziehl-Neelsen)
  - o Ácido clorhídrico concentrado .....3 ml
  - o Etanol 95% .....97 ml
2. **Azul de metileno:** Colorante de contraste para tinción de flagelos.
  - o Azul de metileno.....1 g
  - o Agua destilada.....100 ml
3. **Azul de metileno de Loeffler:** Tinciones simples.
  - o Solución de hidróxido potásico al 1%.....1 ml
  - o Azul de metileno, sol. saturada en etanol al 95%.....30 ml
  - o Agua destilada.....100 ml
4. **Colorante para esporas:**
  - o Solución acuosa saturada de verde malaquita
5. **Colorante para flagelos de Leifson:**
  - o Solución A
    - Fucsina básica .....1,2 g
    - Etanol 95%.....100 ml
  - o Solución B
    - Ácido tánico.....3 g
    - Agua destilada.....100 ml
  - o Solución C
    - Cloruro sódico.....1,5 g
    - Agua destilada.....100 ml

Para preparar la solución de uso, se mezclan cantidades iguales de las soluciones A, B y C y se guarda en frasco cerrado herméticamente en la nevera donde es estable durante varias semanas.
6. **Cristal violeta:** Para tinción Gram y tinción simple.
  - o Cristal violeta (violeta de genciana).....0,5 g
  - o Agua destilada.....100 ml
7. **Eosina:** Para observación de células sanguíneas.
  - o Eosina.....0,3 g
  - o Ácido acético glacial.....0,025 ml
  - o Agua destilada.....100 ml
8. **Fucsina diluida:** Para tinción Gram y tinción simple.
  - o Fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen.....10 ml
  - o Agua destilada.....100 ml
9. **Fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen:** Para tinción ácido-alcohol resistente.
  - o Fucsina básica.....1 g
  - o Etanol 95%.....10 ml
  - o Fenol 5% en solución acuosa.....100 ml
10. **Hematoxilina:** Para observación de células sanguíneas.
  - o Hematoxilina.....2 g
  - o Agua destilada.....1 l
11. **Lactofenol:** Para preparaciones microscópicas en fresco de mohos.

- o Ácido láctico..... 100 ml
  - o Fenol..... 100 g
  - o Glicerol..... 200 ml
  - o Agua..... 100 ml
- 12. Lactofenol al Azul Algodón:** Para preparaciones en fresco y tinciones de mohos.
- o Solución de azul algodón
    - Sol. saturada de azul algodón (azul anilina soluble)..... 10 ml
    - Glicerol..... 10 ml
    - Agua..... 80 ml

Mezclar esta solución con lactofenol a partes iguales
- 13. Lugol:** Solución de yodo para tinción Gram.
- o Yodo..... 1 g
  - o Yoduro potásico..... 2 g
  - o Agua destilada..... 300 ml
- 14. Orceína A:** Tinción de cromosomas.
- o Orceína..... 2 g
  - o Ácido acético..... 45,8 ml
  - o Ácido clorhídrico 1 mol/l..... 8,3 ml
  - o Agua..... 45,8 ml
- 15. Orceína B:** Tinción de cromosomas.
- o Orceína..... 2 g
  - o Ácido acético..... 55 ml
  - o Agua..... 55 ml
- 16. Safranina:** Colorante de contraste para tinción Gram (preferible a la fucsina) y esporas.
- o Safranina..... 0,25 g
  - o Agua destilada..... 100 ml
- 17. Sudán III:** Tinción específica de grasas.
- o Alcohol etílico..... 100 ml
  - o Sudán III..... hasta saturación
- 18. Verde de metilo acético:** Igual composición que la eosina (num. 7)

### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad.

#### CONSTITUYENTES HABITUALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se da una idea general sobre algunos de los constituyentes habituales de los medios de cultivo.

- **AGAR.** Se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo. En el agar bacteriológico el componente dominante es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas y que presenta la indudable ventaja de que a excepción de algunos microorganismos marinos, no es utilizado como nutriente. Un gel de agar al 1-2% se licua alrededor de los 100°C y se gelifica alrededor de los 40°C, dependiendo de su grado de pureza.
- **EXTRACTOS.** Su preparación consiste en que ciertos órganos o tejidos animales o vegetales (p.e. carne, hígado, cerebro, semillas, etc.) son extraídos con agua y calor y posteriormente concentrados hasta la forma final de pasta o polvo. Estos preparados deshidratados son a menudo empleados en la elaboración de los medios de cultivo. Los más utilizados son el extracto de carne, de levadura y el de malta.
- **PEPTONAS.** Son mezclas complejas de compuestos orgánicos, nitrogenados y sales minerales, que se obtienen por digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales (soja caseína carne, etc.). Las peptonas son muy ricas en pépticos y aminoácidos, pero pueden ser deficientes en determinadas vitaminas y sales minerales.
- **FLUIDOS CORPORALES.** Con frecuencia es necesario añadir a los medios de cultivo de algunos patógenos sustancias como sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo, sobre todo para conseguir el primer aislamiento a partir del hospedador. La sangre no puede ser esterilizada, y por tanto debe de ser obtenida en condiciones asépticas directamente de un animal sano, y adicionada al medio de cultivo después de que este haya sido auto clavado. Los fluidos corporales no solo aportan factores de crecimiento sino que también aportan sustancias que neutralizan a

inhibidores del crecimiento de algunas bacterias. Un ejemplo podría ser la catalasa presente en las células sanguíneas destruye el peróxido de hidrógeno que algunas bacterias que no poseen este enzima acumulan como producto del metabolismo del oxígeno.

- **SISTEMAS AMORTIGUADORES.** Para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano a veces, es necesario añadir algunos componentes al medio de cultivo. Debido a que la mayoría de las bacterias son neutrófilas, se suelen emplear sales del tipo de los fosfatos bisódicos o bipotásicos u otras sustancias como las peptonas para prevenir la desviación del pH. **INDICADORES DE PH.** Con el objeto de poder detectar variaciones en el pH debido a fermentaciones u otros procesos, se hace necesario a veces añadir indicadores acido-base que nos lo indiquen.
- **AGENTES REDUCTORES.** Con el objetivo de crear en los medios de cultivo condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerófilos o anaerobios se añaden estos agentes reductores siendo, los más empleados la cisteína y el tioglicolato entre otros.
- **AGENTES SELECTIVOS.** La adición de determinadas sustancias a un medio de cultivo puede convertirlo en selectivo. Así, por ejemplo, la adición de cristal violeta, sales biliares, azida sodica, telurito potasico, antibióticos, etc., a la concentración adecuada hará que actúen como agentes selectivos frene a determinados microorganismos.

#### TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO MEDIOS GENERALES

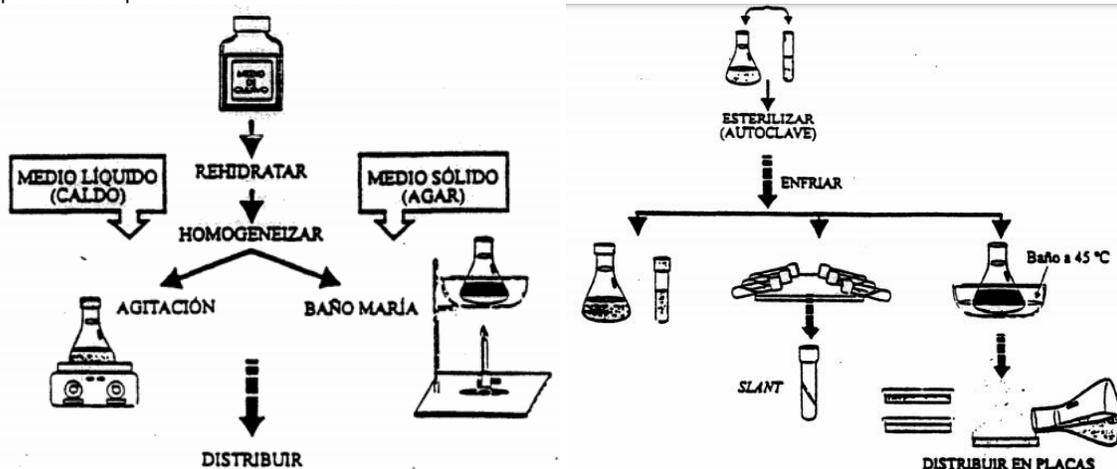
Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

- **MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO.** Son aquellos que favorecen el crecimiento de u determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás.
- **MEDIOS SELECTIVOS.** Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.
- **MEDIOS DIFERENCIALES.** Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee.

#### PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar. En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente ó a 40-50°C si se trata de medios con agar. Antes de su esterilización los medios líquidos se reparten en los recipientes adecuados (tubos, matraces, etc.). Si es un medio sólido y se ha de distribuir en tubos ó en matraces será necesario fundir el agar en baño María u horno microondas, una vez fundido y homogenizado, se distribuye en caliente a los tubos ó matraces (no en placas Petri) se tapa y se esteriliza en el autoclave. Una vez finalizada la esterilización los medios se dejaran enfriar a temperatura ambiente y en el caso de medios sólidos contenidos en tubos deberán, en su caso, inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado ó pico de flauta (slant) si tal es su finalidad.

Las placas de Petri se preparan vertiendo el medio fundido y estéril dentro de ellas y en un ambiente aséptico (por ejemplo en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen) es conveniente homogenizar el medio en el transcurso de la operación para evitar que el agar sedimente en el fondo del recipiente y no se distribuya por igual en todas las placas. También es posible conservar el medio destinado a preparar placas Petri solidificado y estéril en tubos que se fundirán al baño María en el momento de la preparación de las mismas. Los caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente pero para reducir su deshidratación y el consiguiente cambio en las concentraciones de sus componentes es preferible conservarlos a 4°C.



## FUENTES CONSULTADAS:

- Olvera, J. (2018). *Módulo I Auxilia en los procesos básicos de laboratorio clínico*. MÉXICO: FCE, SEP, UEMSTIS.
- Bustamante, G. (2014). Amortiguadores (Buffers). *Revista de actualización clínica investiga*, 40 (40): 2087-2091. Recuperado 17 de enero de 2021 de [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=s2304-37682014000100003&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=s2304-37682014000100003&script=sci_arttext)
- Anticoagulantes usados en el laboratorio clínico (agosto 2017). Recuperado 17 de enero de 2021 de <https://edulabc.com.mx/anticoagulantes-utilizados-en-el-laboratorio-clinico/>
- González, J. (2004). Colorantes. *Laboratorio de Microbiología: Instrumentación y principios básicos*. Recuperado 17 de enero de 2021 de <https://www.ecured.cu/Colorante>
- Preparación de colorantes (s.f). Recuperado 17 de enero de <https://fraybio.files.wordpress.com/2011/01/preparacion-de-colorantes.pdf>
- Preparación de medios de cultivo (s.f.). Recuperado 17 de enero de <https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>