



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHÉ

Licenciatura en Gestión Ambiental

2016

Cátedra de Biología General



2016

Profesor: Dr. Eric D. Speranza

Jefe de Trabajos Prácticos: Dr. Lucas Garbin

T.P. 1

Muestreo y prácticas de laboratorio

Objetivos:

1. *Comprender las medidas de seguridad necesarias para el trabajo en el laboratorio.*
2. *Aprender los aspectos más importantes a tener en cuenta para planificar un muestreo.*
3. *Reconocer los materiales básicos de laboratorio, sus utilidades y su utilización.*
4. *Aprender a manipular apropiadamente drogas y solventes.*
5. *Entender la importancia del orden y la limpieza en las actividades de laboratorio.*
6. *Discutir los aspectos éticos acerca del uso de animales para experimentación.*










1- Normas de seguridad e higiene

El trabajo en laboratorio conlleva ciertos riesgos que minimizaremos observando rigurosamente las siguientes medidas:

1. Obedecer las instrucciones del personal de la cátedra y no realizar actividades sin el consentimiento de las mismas.
2. Mantener el orden y la limpieza del laboratorio todo el tiempo, poniendo especial énfasis en la limpieza y orden del material utilizado y las mesadas al término de cada práctica.
3. Lavarse las manos con jabón antes y después de cada actividad, y durante la misma cuantas veces sea necesario.
4. No fumar, comer ni beber dentro del laboratorio durante los T.P.
5. Utilizar los elementos de seguridad apropiados para cada manipulación (ej. guantes, antiparras, delantal) según las instrucciones del personal docente.
6. Previamente al uso de drogas, reactivos y solventes, verificar los medidas de seguridad que figuran en el envase.
7. Cuidar los rótulos de los envases y rotular apropiadamente todas las preparaciones que se realicen.
8. No usar JAMAS ninguna droga, reactivo o solvente (por inocua que pueda parecer) sin la autorización de la Cátedra.
9. Evitar toda exposición por ingestión, inhalación ó contacto dérmico con los productos químicos
10. Tratar con cuidado todo el material, especialmente los más delicados.
11. Realizar todas las manipulaciones con cuidado y suavidad. El manejo brusco de material de vidrio o de sustancias reactivas puede acarrear accidentes.
12. No devolver los excedentes de drogas, reactivos o ácidos a su envase original, salvo cuando sea determinado por el personal docente.

13. Cuidar la indumentaria. Varias sustancias producen un daño irreversible de la misma (ej. ácidos fuertes, álcalis, tinciones). Por razones de seguridad, el uso de delantal de laboratorio es OBLIGATORIO.
14. Jamás maltrate a un animal. No es éticamente correcto y puede acarrear accidentes.
15. En caso de accidente, dirigirse inmediatamente al personal de la Cátedra y seguir sus instrucciones.

2- Material básico de laboratorio:

	Erlenmeyer: Para preparar mezclas y disoluciones. Limita la evaporación. No permite medir volúmenes con precisión.
	Vaso de precipitado: Para preparar mezclas y disoluciones (revolviendo con cuchara o varilla). Permite una rápida liberación de calor. No permite medir volúmenes con precisión.
	Matraz: Para medir volúmenes fijos grandes (ml, l) con precisión, enrasando el límite inferior del menisco del líquido con el aforo del cuello.
	Probeta: Para medir volúmenes variables grandes, con menos precisión que los matraces.
	Tubos de ensayo: De fondo cónico o redondo. En varios volúmenes.
	Cápsula de Petri: Cultivos microbianos y usos diversos de laboratorio.
	Pipeta Pasteur: Sirve para dosificar líquidos gota a gota, usando una tetina de goma.
	Pipeta Pasteur de plástico: Ídem que la anterior, pero no requiere tetina.
	Pipeta aforada: Para medir volúmenes pequeños (μ l, ml) fijos con precisión. Pueden ser de simple o doble aforo.

	Pipeta graduada: Para medir volúmenes pequeños variables, con menos precisión que las aforadas.
	Propipeta: Para aspirar líquidos con pipetas.
	Pipeta automática y tips: Permiten medir con precisión y rapidez volúmenes pequeños variables.
	Gradilla: Soporte para tubos de ensayo.
	Cucharas-espátulas: Para tomar reactivos y drogas sólidas.
	Bisturí: Compuestos de una hoja descartable y un mango, ambos de varias dimensiones y formas estandarizadas.
	Tijeras de cirugía
	Jeringas y agujas descartables
	Pisetas: Para realizar enjuagues con solventes (ej. agua)
	Parafilm™: Film de laboratorio para tapar tubos y recipientes.
	Tubos Eppendorf™: Para reaccionar, centrifugar y almacenar pequeños volúmenes.

Solventes, drogas y reactivos de laboratorio:

Los solventes se presentan en frascos, generalmente de vidrio color caramelo, y se almacenan fuera de la exposición directa de la luz solar. La etiqueta del mismo indicará el nombre del producto, su grado de pureza, propiedades fisicoquímicas, instrucciones de almacenamiento e información para el manejo del mismo. Básicamente, se consideran cuatro factores de riesgo:

- **Riesgo para la salud:** Los solventes que emanen vapores tóxicos y/o asfixiantes deben manejarse bajo campana.
- **Inflamabilidad:** Los productos inflamables deben manejarse fuera del alcance de cualquier fuente de calor.
- **Reactividad:** Se debe prestar atención a posibles reacciones exotérmicas de los solventes con otras sustancias.
- **Corrosividad:** Los solventes corrosivos deben manejarse con guantes y minimizando toda posibilidad de contacto directo con ellos.

Previamente a cualquier manipulación en laboratorio, se debe preparar un Área de Trabajo, cubriendo la mesada con papel y acomodando el material apropiadamente.

Algunas sustancias liberan mucha energía al mezclarse con otras. Tal es el caso de los ácidos fuertes y el agua, por lo cual no se debe agregar agua bruscamente a los ácidos.

Las drogas suelen presentarse en pots plásticos, cuyas etiquetas indican la información ya mencionada para los solventes. Además el fabricante provee el MSDS (Material Safety Data Sheet), un folleto estandarizado con la información de seguridad del producto. En general se las almacena en lugares secos, frescos y oscuros, llamados drogueros. Dado que gran parte de los productos almacenados en un droguero suelen ser sales, el mismo se ordena según el catión. Siempre se debe usar una cuchara seca y limpia para tomar la sustancia a emplear, minimizando la exposición de la misma a la humedad del ambiente. Se debe evitar todo contacto con las drogas y reactivos de laboratorio, así como su ingesta o inhalación accidental.

Actividades:

2. *Identificar y clasificar los materiales de laboratorio.*
3. *Manejo de líquidos: Medir distintos volúmenes de agua destilada con probetas y matraces, trasvasarlos a vasos de precipitado y trasvasar luego volúmenes menores entre los vasos con pipetas.*

3- Preparación de soluciones:

Se forman por la dilución de sustancias sólidas o líquidas (solutos) en un líquido (solventes). En el área de la Biología, es frecuente el uso de soluciones fisiológicas, que permiten mantener células, tejidos y órganos in vitro por periodos más o menos prolongados. Preparar soluciones implica hacer mediciones, de tipo gravimétrica (de peso) y volumétrica (de volumen). Para esto, debemos conocer ciertos conceptos:

- Precisión: Numero de dígitos usado para expresar un valor.
- Exactitud: capacidad de medir un valor cercano al valor real.
- Reproducibilidad: Variabilidad de la medida en sucesivas mediciones.
- Calibración: Comparación y ajuste de la medida de un instrumento analítico con la de un estándar.
- Unidades de medida:
 - Peso:

Femto-	Pico-	Nano-	Micro-	Mili-	Gramo	Kilo-	Tonelada
fg	pg	ng	µg	mg	g	kg	Ton.
10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹²	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻³	1	10 ³	10 ⁶

- Volumen:

Femto-	Pico-	Nano-	Micro-	Mili-	Litro	Kilo-	Mega-
fl	pl	nl	µl	ml	l	kl	MI
10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹²	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻³	1	10 ³	10 ⁶

Actividades:

4. Ejercicios de cálculos de diluciones.
5. Preparación de soluciones.

4- Limpieza e higiene:

La limpieza es parte integral de todo procedimiento en el laboratorio, una etapa del trabajo de investigación que puede determinar el éxito o el fracaso del mismo. Es por otro lado, es uno de los factores que más contribuyen a la seguridad del laboratorio. Por ende, es importante estar comprometido con la planificación y realización de una limpieza meticulosa del material de trabajo y del área. Como otras actividades de laboratorio, la limpieza se efectúa siguiendo un protocolo, que varía según el material limpiar, el uso que se le dio, y el uso que se le va dar posteriormente.

Protocolo de limpieza general:

Materiales:

- Detergente.
- Bandeja de lavado.
- Cepillos
- Esponja
- Recipiente escurridor
- Bandeja de secado
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Agua destilada

Procedimientos de lavados más específicos podrían requerir de otros materiales, como se verá más adelante. Se recomienda vestir delantal, y disponer de guantes y antiparras para aquellas etapas de la limpieza que pudieran provocar algún riesgo.

Procedimiento:

1. Eliminar el material descartable (ej. Hojas de bisturí, agujas, tips, etc.)
2. Enjuagar el material con agua corriente.
3. Retirar etiquetas y rótulos (utilizar un papel embebido en alcohol o acetona para limpiar rótulos escritos con marcadores).
4. Sumergir el material en un baño de agua con detergente.
5. Sobre una batea de agua corriente, limpiar meticulosamente el material con cepillo (tubos, erlenmeyers, matraces) o esponja (vasos de precipitado grandes, cucharas, mangos de bisturí, cápsulas de Petri, superficies planas en general). Asegurarse de repasar toda la superficie interna y externa del elemento.
6. Enjuagar con agua corriente hasta eliminar la espuma.
7. Una vez enjuagada la espuma del detergente realizar 5 enjuagues con agua corriente y disponer el material sobre un escurridor en una batea aparte (o sobre una bandeja).
8. Enjuagar el material 2 veces con agua destilada y disponerlo en el escurridor.
9. Acomodar el material sobre una bandeja de secado con el fondo cubierto por papel absorbente limpio, Los elementos deben disponerse en forma vertical con la boca hacia abajo.

10. Una vez seco, guardar el material en el lugar correcto. Los vasos, erlenmeyers, matraces y todo otro recipiente con boca sin tapa que no sea guardado en cajas plásticas, deberá taparse con papel aluminio.

La mesada de trabajo del laboratorio debe limpiarse con una esponja con detergente, y luego debe aplicarse un desinfectante o alcohol.

El material metálico puede oxidarse si permanece húmedo mucho tiempo. Por ende, conviene enjuagarlo con acetona y dejarlo sobre una superficie limpia hasta que la misma se evapore. El material también puede ser secado en una estufa.

Para aquellas aplicaciones que requieran limpieza absoluta de materia orgánica, se suele utilizar un baño en solución sulfocromica (dicromato de potasio en ácido sulfúrico), que se torna verde cuando hay restos de materia orgánicas, o la pirolisis (combustión y volatilización de la materia orgánica a alta temperatura) del material de vidrio en una mufla (el material graduado o aforado puede perder exactitud al ser sometido a altas temperaturas). Suele ser conveniente enjuagar el material con solventes orgánicos volátiles, tales como éter de petróleo o diclorometano, para el arrastre de restos de compuestos orgánicos.

Para aplicaciones que requieran eliminación de completa de gérmenes, el material debe ser esterilizado. Para esto, el procedimiento más frecuente es el autoclavado (que actúa con presión y temperatura del vapor de agua), si bien hay procedimientos basados en la irradiación de alta frecuencia (UV o rayos gamma).

Actividades:

6. *Lavar el material utilizado siguiendo el protocolo de limpieza.*

5- Animales de laboratorio:

Animal de laboratorio: es por definición cualquier animal utilizado en laboratorio con fines de investigación o docencia. Entre los animales de experimentación más utilizados, podemos citar a ratones, ratas, conejos, perros, monos, hamsters, anfibios anuros, insectos, etc, debido principalmente a sus ciclos de vida cortos y fácil reproducción. Las instituciones organizan un Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL), el cual revisa todos los protocolos para trabajar con ellos.

Principio de las 3 R

Es una estrategia racional para reducir el número de animales utilizados y disminuir el sufrimiento ocasionado sin comprometer la calidad científica del trabajo realizado

Reemplazo: Sustitución del uso de animales vivos por técnicas in vitro, modelos en PC, videos, etc. Ej: bioensayos con técnicas inmunoquímicas, test toxicológicos con formas de vida inferiores, etc.

Reducción: disminución del uso de animales que se necesitan para un ensayo. Requiere de:

- Escoger procedimientos experimentales adecuados
- Controlar los factores ambientales
- Estandarizar la población animal
- Mejorar el diseño experimental
- Reutilizar animales. Por ej: cuando se estudia comportamiento

Hay organismos modelos, ampliamente usados en investigación, cuyo cultivo/cría y linajes están estandarizados (ej. Escherichia coli, lenteja de agua (Lemna minor), Drosophila melanogaster, pez cebra (Brachidanio rerio), rata Wistar)

Refinamiento: Disminución de la incidencia o intensidad de los procedimientos dolorosos aplicados a los animales. Implica la regulación del ambiente del animal, el mejoramiento de los procedimientos experimentales y el uso adecuado de anestésicos y analgésicos.

Anestesia:

Procedimientos fisicoquímicos que reducen la sensibilidad del organismo de forma reversible. La elección del método de anestesia más apropiado depende de la especie a utilizar, su peso, edad, el tipo de intervención a realizar sobre la misma y el tiempo disponible, entre otros factores. El anestésico puede actuar sobre todo el cuerpo (general), sobre una región del mismo (regional) o limitarse a un sitio puntual del organismo (local). Pueden ser administradas por vías inhalatorias, tópicas, de inmersión o inyectables. Como ejemplo de anestésicos podemos citar el éter etílico (inhalación, en roedores), el MS222 (inmersión, en peces), y el frío.