

# Indice

## INTRODUCCION AL ANALISIS BIOQUIMICO

<b>Fundamentos del análisis bioquímico cuantitativo</b> .....	1
Comentarios generales; Instrucciones; Registro de datos; Estequiometría y concentración; Cálculos estequiométricos; Soluciones patrón; Dilución en serie; Parte alícuota; Técnicas de dilución y cálculos; Cambios de concentración; Principios de los logaritmos; Exactitud y precisión de las mediciones, y "cifras significativas"; Análisis de la fiabilidad estadística de los resultados; Problemas	
<b>Amortiguadores y pH</b> .....	13
Concepto de pH; Disociación del agua —escala de pH; Acción amortiguadora; Medición del pH de ácidos, bases y sales débiles; Ejemplos prácticos de laboratorio; Problemas	
<b>Bibliografía</b> .....	23

### Capítulo 1

## MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE IONES HIDROGENO EN SOLUCION ACUOSA

<b>Empleo de patrones amortiguadores y de indicadores</b> .....	24
<b>Empleo del medidor del pH</b> .....	26
<b>Experimento 1</b>	
Medición del pH .....	26
Titulación potenciométrica de ácidos débiles .....	28
<b>Bibliografía</b> .....	30

### Capítulo 2

## PROPIEDADES ANFOTERICAS DE LOS ACIDOS AMINADOS

<b>Concepto de ácidos aminados como iones anfóteros</b> .....	31
<b>Experimento 2</b>	
Titulación de ácidos aminados poliácidos .....	32
Titulación de la glicina en presencia de formol .....	32
Estudio de ácidos aminados por electroforesis en papel .....	34

Problemas .....	36
Bibliografía .....	36

### Capítulo 3

#### ABSORCION DE ESPECTROFOTOMETRIA

Fundamentos de espectrofotometría .....	37
Experimento 3	
Espectro de absorción del rojo de fenol .....	40
Medición espectrofotométrica del $pK'_n$ del rojo de fenol .....	42
Reducción del citocromo c .....	44
Problemas .....	44
Bibliografía .....	45

### Capítulo 4

#### ASLAMIENTO, PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS Y MEDICION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS

Estructuras elementales, función y nomenclatura de las proteínas .....	46
Propiedades de solubilidad de las proteínas .....	47
Experimento 4	
Separación de proteínas de diversos tejidos .....	50
Preparación de la miosina del músculo de conejo .....	50
Separación de la caseína .....	52
Preparación de la vitelina .....	53
Cristalización de la albúmina de huevo .....	54
Preparación de una globulina cristalina a partir de semillas de verduras .....	54
Propiedades de solubilidad de las proteínas .....	55
Precipitación isoelectrica de la caseína .....	56
Efecto del pH sobre la solubilidad de la miosina .....	57
Separación de las proteínas del plasma .....	57
Coagulación del fibrinógeno .....	59
Solubilidad de la albúmina sérica y efecto de la concentración de alcohol .....	59
Precipitación de las proteínas por metales .....	59
Precipitación de las proteínas por los ácidos .....	60
Reacciones coloreadas cualitativas (ejercicio) .....	60
Medición cuantitativa de las proteínas por la reacción del biuret .....	60
Comparación entre los diversos métodos .....	60
Base química de la medición del biuret .....	62
Preparación de la curva patrón para la reacción del biuret .....	63
Bibliografía .....	63

### Capítulo 5

#### SEPARACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS SERICAS

Introducción .....	64
--------------------	----

**Experimento 5**

Separación de proteínas séricas en tiras de acetato de celulosa .....	66
Separación de proteínas séricas mediante geles de acrilamida .....	67
Otros métodos simplificados en gel de acrilamida .....	71
<b>Bibliografía</b> .....	73

*Capítulo 6***IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS TERMINALES N DE LAS PROTEINAS POR EL METODO DE SANGER**

<b>Introducción</b> .....	74
<b>Experimento 6</b>	
Preparación de la proteína con DNP .....	75
Hidrólisis de la proteína con DNP y extracción de los ácidos aminados con DNP .....	76
Preparación de ácidos aminados con DNP como control .....	76
Identificación cromatográfica de los ácidos aminados con DNP .....	76
<b>Bibliografía</b> .....	79

*Capítulo 7***PROPIEDADES CATALITICAS DE LA AMILASA, CATALASA Y UREASA**

<b>Introducción</b> .....	80
<b>Experimento 7</b>	
Amilasa .....	82
Catalasa .....	84
Ureasa .....	86
<b>Bibliografía</b> .....	88

*Capítulo 8***ASLAMIENTO DEL DNA Y DEL RNA**

<b>Desdoblamiento de los ácidos nucleicos</b> .....	89
<b>Aislamiento de los ácidos nucleicos</b> .....	90
<b>Experimento 8</b>	
Aislamiento de RNA de ribosomas y DNA nuclear puros del hígado de la rata .....	91
Aislamiento del DNA de bacterias o levaduras .....	92
<b>Bibliografía</b> .....	92

*Capítulo 9***DISTRIBUCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS EN PARTICULAS SUBCELULARES**

<b>Experimento 9</b>	
Preparación de componentes subcelulares .....	95
Métodos de extracción para el análisis de ácidos nucleicos totales de tejidos y fracciones tisulares .....	96

Medición del DNA y RNA en cada fracción .....	98
Ejemplos de cálculo .....	99
Bibliografía .....	100

### Capítulo 10

#### ESTUDIO DE LOS CAMBIOS HIPERCROMATICOS Y DE VISCOSIDAD EN EL DNA PURO

Estudio de los cambios hipercromáticos .....	102
Experimento 10	
Cambios hipercromáticos por alteraciones de pH, por calor o por acción de los detergentes .....	102
Cambios hipercromáticos producidos por acción enzimática .....	103
Propiedades de viscosidad del DNA .....	104
Cinética del desdoblamiento del ácido desoxirribonucleico por desoxirribonucleasa .....	107
Bibliografía .....	109

### Capítulo 11

#### PROPIEDADES QUIMICAS DE LOS CARBOHIDRATOS

Química básica de carbohidratos .....	110
Experimento 11	
Pruebas generales para los carbohidratos .....	113
Acción de los ácidos sobre los azúcares .....	114
Reacción del $I_2$ y falta de difusibilidad de los polisacáridos .....	115
Acción de las bases sobre los carbohidratos .....	116
Fermentación de los azúcares .....	116
Formación de osazonas (reacción de la fenilhidracina) .....	117
Cromatografía de carbohidratos en capa fina o en papel .....	118
Bibliografía .....	121

### Capítulo 12

#### ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE CARBOHIDRATOS POR POLARIMETRIA

Teoría .....	122
Estudio de la rotación específica, de la inversión y de la cinética de la mutarrotación de los azúcares .....	123
Experimento 12	
Rotación específica y mutarrotación de la glucosa: cálculo de la constante de mutarrotación .....	124
Rotación específica e inversión de la sacarosa .....	127
Aislamiento de identificación de la trehalosa por polarimetría .....	128
Bibliografía .....	129

*Capítulo 13***AISLAMIENTO DEL GLUCOGENO Y MEDICION DEL GRADO DE RAMIFICACION POR OXIDACION CON ACIDO PERYODICO**

Química .....	130
Experimento 13	
Aislamiento del glucógeno del hígado de rata .....	133
Análisis de glucógeno .....	134
Cálculos .....	135
Problemas .....	138
Bibliografía .....	138

*Capítulo 14***AISLAMIENTO Y PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LOS LIPIDOS**

Introducción .....	139
Experimento 14	
Extracción y cromatografía en columna de adsorción de pigmentos vegetales .....	139
Extracción de las hojas de espinaca .....	140
Extracción de los carotenos de las zanahorias .....	140
Preparación de la columna de adsorción .....	141
Propiedades físicas y químicas de los lípidos .....	142
Bibliografía .....	144

*Capítulo 15***PURIFICACION DE LA LISOZIMA DE CLARA DE HUEVO (MURAMIDASA)**

Principios experimentales .....	146
Purificación con cromatografía de intercambio iónico .....	147
Métodos de identificación y recolección .....	149
Experimento 15	
Preparación de las columnas .....	150
Preparación de la enzima .....	150
Medición de proteínas .....	152
Ensayo de enzimas .....	152
Purificación por filtración en gel —exclusión con gel Sephadex .....	153
Bibliografía .....	160

*Capítulo 16***CINETICA DE LA LISOZIMA DE LA CLARA DE HUEVO Y LA HEXOCINASA**

Fundamentos de cinética enzimática .....	161
Inhibidores de la acción de las enzimas .....	165
Formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten .....	167

**Experimento 16**

Cinética de la lisozima de la clara de huevo .....	167
Desnaturalización y recuperación de la lisozima mediante intermediarios mixtos de disulfuro .....	171
Electroforesis de la lisozima y sus derivados en gel de poliacrilamida ....	173
Restauración de lisozima y derivado disulfuro mixto .....	174
<b>Bibliografía</b> .....	177

*Capítulo 17***MEDICION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS POR FILTRACION EN GEL**

Fundamentos .....	178
<b>Experimento 17</b>	
<b>Bibliografía</b> .....	180

*Capítulo 18***NUMERO DE REPOSICION DE LA TRIPSINA Y QUIMIOTRIPSINA**

Concepto del número de reposición (NRP) .....	181
<b>Experimento 18</b>	
Ensayo de proteólisis .....	182
Cálculo del NRP .....	182
<b>Bibliografía</b> .....	183

*Capítulo 19***NECESIDADES DE CATIONES PARA LAS FOSFOHIDROLASAS DE NUCLEOTIDOS**

Introducción .....	184
<b>Experimento 19</b>	
Preparación de las enzimas .....	185
Preparación de los reactivos .....	186
<b>Bibliografía</b> .....	189

*Capítulo 20***VELOCIDAD DE ABSORCION DE LA GLUCOSA POR EL INTESTINO DE RATA  
(MEDICION DEL COEFICIENTE DE CORI)**

Introducción .....	190
<b>Experimento 20</b> .....	190
<b>Bibliografía</b> .....	192

*Capítulo 21***GLUCOLISIS EN EXTRACTOS SIN CELULAS; CICLO DE EMBDEN-MEYERHOF**

Introducción .....	193
--------------------	-----

**Experimento 21**

Preparación de los componentes tisulares .....	194
Reacción de glucólisis .....	195
Análisis .....	197
<b>Bibliografía</b> .....	199

*Capítulo 22***SEPARACION DE LIPIDOS Y MEDICION CON ISOTOPOS DE LA REPOSICION DE LIPIDOS EN EL CEREBRO**

<b>Introducción</b> .....	200
Empleo de isótopos en investigación bioquímica .....	200
Isótopos de interés en biología .....	200
Rapidez de desintegración de isótopos y cálculos de vida media .....	202
Métodos de medición .....	204
Nomenclatura y unidades de medida .....	206
Causas de error y tratamiento de los resultados .....	207
Método de los isótopos radiactivos para establecer la reposición de metabolitos tisulares .....	212
Técnicas de dilución de isótopos .....	214
Técnicas para manejar y desechar isótopos .....	215
<b>Propiedades de solubilidad de los lípidos</b> .....	215
Métodos generales de extracción de los lípidos .....	216
<b>Experimento 22</b>	
Aislamiento y reposición del colesterol, los fosfolípidos y las glucoproteínas del cerebro .....	216
Extracción y separación preliminares de la fracción colesterólica de los fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos .....	217
Separación de los fosfolípidos de los glucolípidos y esfingomielinas en la fracción II .....	217
Purificación del colesterol .....	219
Medición de la radiactividad .....	219
<b>Ampliación de los fundamentos de cromatografía</b> .....	222
Cromatografía en capa fina y cromatografía en columna .....	222
Cromatografía en gas-líquido .....	222
<b>Cromatografía de gluco y fosfolípidos en columna de ácido silícico</b> .....	227
Propiedades cromatográficas .....	227
Absorción y elución preliminar de la esfingomielina y los cerebrósidos (fracción III) .....	228
Separación de la lecitina y cefalia (fracción II) por cromatografía en columna .....	228
<b>Separación por cromatografía en capa fina del colesterol, fosfolípidos y glucolípidos extraídos por solventes, o de las subfracciones obtenidas de columna de ácido silícico</b> .....	228
Cromatografía en capa fina de la fracción II o de las subfracciones CC de la fracción II .....	229
Cromatografía en capa fina de la fracción I .....	229

<b>Análisis por cromatografía en gas-líquido de las fracciones I, II y III y de las subfracciones procedentes de las columnas de ácido silícico</b> .....	229
Descripción general del aparato de cromatografía de gases .....	229
Preparación del material de relleno .....	231
Preparación de la columna .....	231
Manejo del aparato .....	232
Aplicación de la muestra por la técnica del lavado de solvente .....	233
Preparación de las fracciones I, II y III o de las subfracciones para la técnica de cromatografía de gas-líquido .....	233
<b>Bibliografía</b> .....	234

### Capítulo 23

#### ENZIMAS DE OXIDORREDUCCION EN TEJIDOS DE MAMIFERO

<b>Ecuaciones de oxidorreducción y cambios de energía libre</b> .....	235
<b>Situación intracelular de las deshidrogenasas y las enzimas respiratorias</b> .....	238
<b>Experimento 23</b>	
Preparación de mitocondrias de hígado y de una fracción soluble enzimática .....	240
Localización e inhibición de la deshidrogenasa succínica .....	240
Deshidrogenasas dependientes de NAD en la mitocondria .....	240
Localización de la deshidrogenasa láctica, y necesidades de coenzimas .....	241
Localización de la deshidrogenación isocítrica y necesidades de coenzimas .....	242
Localización del sistema citocromo-oxidasa de citocromo .....	242
Demostración del sistema de citocromos .....	243
Medición de la oxidación del nucleótido de piridina reducido .....	244
Medición de la actividad de la deshidrogenasa succínica con cloruro de trifeniltetrazolio y 2,6-diclorofenolindofenol .....	245
<b>Problema</b> .....	248
<b>Bibliografía</b> .....	249

### Capítulo 24

#### FOSFORILACION OXIDATIVA EN HIGADO DE RATA

<b>Fundamentos</b> .....	250
<b>Experimento 24</b> .....	251
Preparación de mitocondrias de hígado de rata .....	251
Técnica de incubación .....	252
Medición del fosfato .....	253
Medición del acetoacetato .....	253
Cálculo de la relación P/O .....	254
<b>Preguntas</b> .....	255
<b>Bibliografía</b> .....	255

### Capítulo 25

#### EL SISTEMA AMORTIGUADOR ACIDO CARBONICO-BICARBONATO Y LA REGULACION DEL pH EN LOS LIQUIDOS TISULARES

<b>Fundamentos</b> .....	256
--------------------------	-----

**Experimento 25**

Papel del $\text{CO}_2$ del plasma en la regulación del pH .....	259
Regulación renal del pH del plasma .....	259
Medición de una presión parcial simulada de $\text{CO}_2$ pulmonar alveolar ....	259
Medición de la presión parcial de $\text{CO}_2$ en el aire del laboratorio .....	259
Efecto de la concentración de $\text{HCO}_3$ sobre el pH a una presión constante de $\text{CO}_2$ .....	260
Transporte de ion hidrógeno y oxígeno por la hemoglobina en la regulación del pH .....	260
<b>Bibliografía</b> .....	263

*Capítulo 26***DEMOSTRACION DE LA TRANSAMINACION EN EXTRACTOS DE HIGADO**

<b>Fundamentos</b> .....	264
<b>Experimento 26</b>	
Identificación de ácidos aminados .....	266
Identificación de cetoácidos .....	266
Nebulizaciones .....	266
<b>Bibliografía</b> .....	266

*Capítulo 27***BIOSINTESIS DE LA UREA (EL CICLO DE LA UREA DE KREBS-HENSELEIT EN EL HIGADO)**

<b>Fundamentos</b> .....	267
<b>Experimento 27</b> .....	268
<b>Bibliografía</b> .....	270

*Capítulo 28***LA ASOCIACION DE LA TIROSINA  $\text{U}^{14}\text{C}$  EN LAS PROTEINAS DE MICROSOMAS DE TEJIDO NERVIOSO**

<b>Experimento 28</b> .....	271
Preparación de homogeneizados de cerebro .....	271
<b>Bibliografía</b> .....	273
<b>TABLA DE LOGARITMOS DE CUATRO DECIMALES</b> .....	274
<b>INDICE ALFABETICO</b> .....	276