

UST

Guía Laboratorios Bioquímica General

Primer Semestre 2006

Profesores Autores: Fuentes O & E Campos [®]

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Seminario 1: Equilibrio ácido-base y pH

INTRODUCCIÓN

Para comprender la importancia del pH en el funcionamiento normal de los seres vivos se requiere revisar los conceptos de equilibrio ácido-base y de pH o acidez.

Un buen número de intermediarios y productos metabólicos son ácidos orgánicos, considerados ácidos débiles. Ejemplos: ácido carbónico, ácido láctico, ácido hidroxibutírico, ácido cítrico, etc. Estos compuestos se disocian liberando H^+ al medio. Otros productos metabólicos como el amoníaco (NH_3), captan H^+ del medio y se comportan como bases. En último término tenemos compuestos biológicos como los aminoácidos y las proteínas que se pueden comportar como ácidos o como base liberando o captando H^+ del medio, fenómeno de gran importancia tanto en la estructura y función de las proteínas como en la regulación del pH del medio.

Mientras un ácido fuerte se disocia totalmente en solución acuosa, un ácido débil lo hace solo parcialmente. Si representamos a un ácido débil por RH y su base conjugada por R-, su disociación será $RH \rightleftharpoons H^+ + R^-$; el grado en que se disocia el ácido se representa por su constante de disociación o de acidez K_a , siendo $K_a = \frac{[H^+][R^-]}{[RH]}$

Ejemplo de algunos ácidos orgánicos y sus constantes de acidez

Ácido	K_a	pKa
Ácido acético	1.8×10^{-5}	4.75
Ácido láctico	1.38×10^{-4}	3.86
Ácido carbónico	7.94×10^{-7}	6.1
Ácido fosfórico	6.3×10^{-8} (pKa2)	7.2

Similar ecuación de equilibrio se puede escribir para el agua $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$ siendo la $K_a = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$, despejando K_a y considerando que $[H_2O]$ en agua Pura es constante, tenemos que

$$K_a [H_2O] = K_w = [H^+][OH^-] = 10^{-14}$$

Siendo K_w = producto iónico del agua, de acuerdo al cuál en toda solución acuosa se cumple que $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$

A partir del producto iónico del agua se pueden derivar los conceptos de pH y la escala de pH. Así, tomando logaritmos negativos de $K_w = [H^+][OH^-] = 10^{-14}$ nos da lo siguiente $-\log K_w = -\log H^+ - \log OH^- = -\log 10^{-14}$, si $-\log = p$,

Entonces

$$pK_w = pH + pOH.$$

Tenemos entonces que:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= -\log [\text{H}^+] \text{ o } \log 1/ [\text{H}^+], \\ \text{pOH} &= -\log [\text{OH}^-] \text{ y} \\ \text{pH} + \text{pOH} &= 14. \end{aligned}$$

Este valor de pK_w determina una escala de pH que va de 0 ([H⁺] = 10) a 14 ([H⁺] = 10⁻¹⁴). Se hace notar que la escala de pH es una escala de acidez, tal como el pH es una medida de acidez.

CUESTIONARIO

1. Calcular la [H⁺], la [OH⁻], el pH y el pOH de una solución de HNO₃
 2. Calcular la [H⁺] de una muestra de a) plasma pH 7.4 b) orina pH 5.2
 3. Calcular el pH de una solución de ácido acético 0.02 M
 4. Una solución 0.15 M de ácido ascórbico (vitamina C) tiene un pH = 5.4. Calcular su K_a.
 5. Los glóbulos rojos de un individuo en condiciones normales producen aproximadamente 0.35 moles de ácido láctico al día. Asumiendo un volumen sanguíneo (volemia) de 5 litros y que el ácido láctico se acumula en la sangre determine el cambio de pH sanguíneo producido en un día.
 6. Calcular el pH de 100 ml de ácido clorhídrico 0.1 M al cuál se adicionan 20 ml de NaOH 0.1 M
-
7. En la titulación de una muestra de 10 ml de jugo gástrico se gastaron 0.7 ml de NaOH 0.1 M. ¿Cuál es el pH de la muestra de jugo gástrico?
 8. Busque información con respecto a lo que se entiende por acidez valorable o titulable y acidez real. En base a esa información explique que significa que una muestra de orina de pH = 5.5, tenga una acidez valorable de fosfato igual a 6 mmol de NaOH.

Laboratorio N° 1: Soluciones Amortiguadoras y Capacidad Amortiguadora

INTRODUCCIÓN

Una solución amortiguadora (Buffer o Tampón) es capaz de resistir cambios de pH cuando pequeñas cantidades de ácido o base son agregadas a la solución. Por ejemplo, cuando 0,01 moles de ácido fuerte y base fuerte son adicionados a agua destilada, el pH desciende a 2 con el ácido y aumenta a 12 con la base. Si la misma cantidad de ácido o base son adicionados a una solución amortiguadora formada por ácido acético – acetato de sodio, el pH puede variar solamente en una fracción de unidad.

La regulación del pH es importante en muchas reacciones químicas, como así también en el control de procesos metabólicos dentro de nuestro organismo. Así encontramos que la sangre de nuestro organismo se encuentra regulada a un pH de 7,4. Notables variaciones de dicho valor pueden causar enfermedades e incluso la muerte, debido a que afecta los procesos bioquímicos que ocurren en dicho fluido.

Una solución amortiguadora requiere dos especies. Una es capaz de reaccionar exclusivamente con OH^- y la otra con H_3O^+ . Estas soluciones se forman por la combinación de un ácido débil y una sal derivada de éste (ácido acético/acetato de sodio) o por una base débil y una sal derivada de ésta (amoníaco/cloruro de amonio).

Debido a que las soluciones amortiguadoras presentan *efecto de ión común*, es posible aplicar la ecuación de Henderson – Hasselbalch con la finalidad de prepararlas:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{base conjugada(sal)}]}{[\text{ácido débil}]}$$

La **Capacidad Amortiguadora** (β) es una medida de la resistencia a los cambios de pH de una solución amortiguadora cuando un ácido o una base son agregados a ésta. Este parámetro es expresado como los moles de ácido o base necesarios para cambiar el pH de un litro de una solución reguladora en una unidad. Mientras más grande el valor de β , mayor la resistencia de la solución amortiguadora a cambios de pH.

$$\beta = \frac{(\text{moles de } \text{OH}^- \text{ o } \text{H}_3\text{O}^+ \text{ adicionados})}{(\text{cambio de pH})(\text{volumen de buffer en L})}$$

En este laboratorio, la ecuación de Henderson – Hasselbalch será usada para determinar la cantidad del par *base conjugada – ácido débil* necesario para producir una solución amortiguada a pH fisiológico.

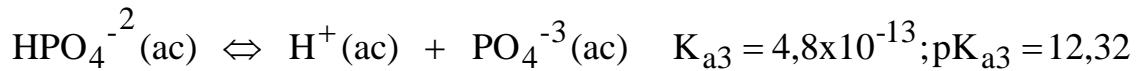
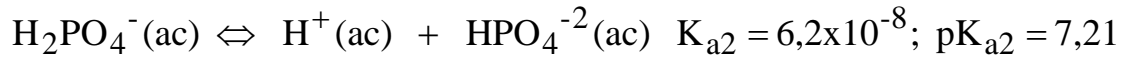
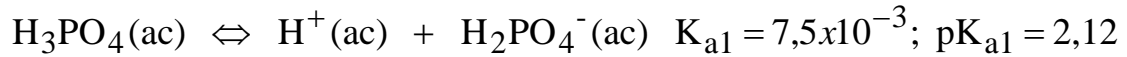
OBJETIVOS:

- Conocer el funcionamiento y preparación de soluciones reguladoras.
- Determinar la capacidad reguladora de una solución tampón.

Procedimiento

Preparación de solución reguladora.

1. En base a los siguientes equilibrios ácido-base determine que sistema *ácido débil – base conjugada* consideraría para preparar una solución amortiguadora que presente un pH aproximado de 7,40.



2. Calcular la razón [base conjugada]/[ácido débil] empleando la ecuación de Henderson – Hasselbalch. Calcular la cantidad de base conjugada necesarios para preparar 250 mL de buffer, conociendo la concentración del ácido débil:

Grupo I. 0,1 M de ácido débil.

Grupo II. 0,5 M de ácido débil

Grupo III. 1,0 M de ácido débil

3. Chequear resultados con el profesor.
4. Preparar solución amortiguadora.

Determinación de capacidad amortiguadora

1. Calibrar pH-metro. *Seguir instrucciones del profesor para calibrar y limpiar pH-metro.*
2. Medir pH de solución amortiguadora preparada.
3. Llenar una bureta de 50 mL con solución amortiguadora y otra bureta de 50 mL con solución estandarizada de NaOH ($\approx 0,1$ M)
4. Transferir 50 mL de solución amortiguadora en un vaso de precipitado de 250 mL.
5. Adicionar alícuotas de solución de NaOH (10 mL) a la solución reguladora. Después de cada adición, anotar el volumen de NaOH adicionado y el pH de la solución. Completar Tabla I.
6. Continuar hasta adicionar 100 mL de solución de NaOH.
7. Completar Tabla II.
8. Graficar pH versus moles de NaOH adicionados.
9. Calcular el pH teórico de cada solución empleando la ecuación de Henderson – Hasselbalch, y compararlos con los valores experimentales.

Laboratorio N° 2: Reconocimiento de las proteínas

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son las biomoléculas más importantes de los seres vivos. Todas las estructuras celulares están formadas por proteínas y prácticamente todas las funciones celulares son realizadas por proteínas. Las enzimas, los transportadores, los anticuerpos, los receptores, los microtúbulos y los microfilamentos del citoesqueleto, etc, son todas proteínas. Aparte de sus funciones específicas, las proteínas participan en la regulación del equilibrio osmótico y tienen capacidad tamponante o reguladora del pH.

OBJETIVOS

Una vez desarrollada esta actividad práctica los alumnos conocerán algunos métodos de reconocimiento de las proteínas y sus fundamentos teóricos

ACTIVIDADES

1. Reconocimiento de proteínas plasmáticas

El plasma sanguíneo tiene un contenido de proteínas de aproximadamente 7 g /100 ml (g/dl), de los cuales aproximadamente 4 g corresponden a albúmina y el resto está constituido por anticuerpos, factores de coagulación, apoproteínas de las lipoproteínas, enzimas proteicas, etc. Este contenido de proteínas puede variar de acuerdo a las condiciones nutricionales o el estado de salud del individuo. [®]

a) Reconocimiento por absorbancia a 280 nm de luz ultravioleta (UV).

Las proteínas absorben luz ultravioleta a 280 nm, longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina) de las proteínas, especialmente el grupo indol de triptofano.

Esta propiedad se puede aprovechar para reconocer la presencia de proteínas. En esta actividad se utilizará plasma (u ovoalbúmina) diluido 1: 20 con suero fisiológico (NaCl 0.9 % p/v), una solución de seroalbúmina de bovino (SAB) 5 mg/ml y una solución de NaCl 0.9 % p/v, según el cuadro siguiente

Tubos	1	2	3
Na Cl 0,9 % p/v	-	-	3 ml
SAB 5mg / ml	-	3 ml	-
Plasma diluido	3 ml	-	-

Leer en el espectrofotómetro a 280 nm (UV) en cubetas de cuarzo. (El vidrio detiene la luz UV). Comparar resultados y discutir la utilización de tubos con SAB y con la solución de NaCl.

b.- Reconocimiento de proteínas con el reactivo de Biuret (método colorimétrico)

Este método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ión Cu^{++} del reactivo y los nitrógenos amídicos del enlace peptídico. Por lo tanto este reactivo reconoce específicamente la presencia de enlaces peptídicos. Se utiliza como blanco el reactivo de Biuret a la misma concentración de los tubos muestra y estándar.

Preparar los siguientes tubos.

Tubos	1	2	3
NaCl 0,9 % p/v	1ml	1ml	2 ml
SAB 5 mg/ml	-	1 ml	-
Plasma diluído	1 ml	-	-
Reactivo de Biuret	4 ml	4ml	4ml

Mezclar bien, sin agitar, y leer después de 30 minutos a 540 nm (luz visible) en cubetas de vidrio. Como alternativa se puede calentar a 50°C en baño de agua por 5 minutos para desarrollar color y leer después de enfriar en corriente de agua.

Discuta sus resultados e identifique en el procedimiento los tubos con muestra y estándar

Compare y discuta los resultados obtenidos con ambos métodos (UV y colorimétrico)

Reactivos y Soluciones

1. Reactivo de Biuret
2. Solución NaCl 0.9 % p/v
3. Plasma diluido 1 : 20 v/v con NaCl 0.9 % p/v
4. Solución estándar de seroalbúmina de Bovino (SAB) 5 mg / ml en NaCl 0.9 % p/v

Equipo y materiales

1. Espectrofotómetro UV- Visible
2. Cubetas de cuarzo y de vidrio
3. Tubos de ensayo de 10 ml y gradillas
4. Matraces Erlenmeyer de 100 ml
5. Pipetas de 1, 5 y 10 ml
6. Baño de agua a 50°C
7. Balanza analítica

Laboratorio N° 3: Cuantificación de proteínas

INTRODUCCIÓN

La determinación colorimétrica cuantitativa de una sustancia se basa en la capacidad de ésta para absorber selectivamente ciertas longitudes de onda de la luz incidente. La cantidad de luz absorbida es directamente proporcional al espesor del medio y a la concentración de la sustancia presente. De esta manera, si se mantiene constante el espesor del medio, la absorción de luz por una sustancia disuelta en un medio transparente (Ej agua) será proporcional a su concentración molar.

Estos principios están contenidos en las leyes de Lambert – Beer y están expresadas en la siguiente ecuación: $\log I_0/I = E c l$ o **DO = E c l**, donde **DO** es la Densidad Óptica o Absorbancia de la sustancia, **E** es el coeficiente de extinción molar, **c** es la concentración e **l** es el espesor, siendo éste último igual a 1 cm. El coeficiente E se expresa en litros/M cm y es numéricamente igual a la DO de una solución 1M (1 Molar) de concentración.

Si las sustancias siguen la ley de Lambert-Beer, presentan una **relación lineal** entre DO y concentración. Por otro lado si la relación entre DO y concentración es lineal para dos soluciones de la misma sustancia a igual espesor y longitud de onda, entonces se puede usar una de ellas de concentración conocida (estándar) para determinar la concentración de la otra solución.

En la práctica para determinar espectrofotométricamente la concentración de una sustancia se requiere: a) una serie estándar de concentración conocida, en un rango de concentración que muestre absorción lineal y que permita expresar la concentración en DO por unidad de masa o concentración. b) un blanco que contiene todos los componentes del ensayo con excepción de la sustancia a medir y c) la muestra con la sustancia problema a una dilución tal que su lectura de DO este en el rango lineal de la curva de calibración.

OBJETIVOS

Una vez desarrollada esta actividad práctica los alumnos conocerán algunos métodos o procedimientos para determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica.

ACTIVIDADES

Determinación de la concentración total de proteínas plasmáticas de una muestra de sangre por el método de Biuret utilizando seroalbúmina de bovino (SAB, PM = 66.500) como estándar.

En esta actividad se utilizará plasma diluido 1:20 con NaCl 0.9 % p/v y solución de SAB 100 ug / ml (ug = microgramo) de acuerdo al siguiente cuadro

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl 0.9% p/v	-	-	1,8	1,5	1,0	0,5	-	2,0
SAB 100ug/m	-	-	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0	-
Plasma diluido	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-
Reactivo de Biuret	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Mezclar bien, sin agitar y leer después de 30 minutos a 540 nm en cubetas de vidrio. Se puede calentar en baño a 50°C por 5 minutos y leer después de enfriar en agua corriente.

Determinar el contenido de proteínas de la muestra a partir de la curva estándar y a partir de la DO promedio calculada por mg de estándar. Compare y discuta sus resultados.

Calcule la concentración total de proteínas del plasma en mg/dl.

¿Cómo determinaría usted la concentración de hemoglobina de una muestra de sangre? Infórmese al respecto.

Reactivos y Soluciones

1. Reactivo de Biuret
2. Solución NaCl 0.9 % p/v
3. Plasma diluido 1 : 20 v/v con NaCl 0.9 % p/v
4. Solución estándar de seroalbúmina de Bovino (SAB) 5 mg / ml en NaCl 0.9 % p/v

Equipo y materiales

1. Espectrofotómetro UV- Visible
2. Cubetas de cuarzo y de vidrio
3. Tubos de ensayo de 10 ml y gradillas
4. Matraces erlemeyer de 100 ml
5. Pipetas de 1, 5 y 10 ml
6. Baño de agua a 50°C
7. Balanza analítica

Seminario N° 2: Aminoácidos y Proteínas

INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de funciones biológicas realizadas por las proteínas implica una gran diversidad estructural. Aunque todas las proteínas están formadas por las mismas unidades monoméricas, es decir 20 diferentes aminoácidos, la secuencia de la cadena aminoacídica es específica de cada organismo y está determinada genéticamente.

La estructura espacial o conformación que la cadena de aminoácidos puede adoptar en el medio celular va a depender de las características de los aminoácidos constituyentes y de las características del medio (polaridad, pH, fuerza iónica o concentración de sales, etc).

La estructura molecular que adopte la proteína está estabilizada por uniones químicas predominantemente débiles o no-covalentes, las que sin embargo permiten cambios reversibles de la conformación proteica y de su actividad funcional en respuesta a cambios fisiológicos del medio ambiente. Además la proteína establece interacciones o enlaces químicos con agua, con iones y con otras moléculas, las que son determinantes para su actividad biológica. Las proteínas presentan múltiples grupos ionizables, los que son aportados por los radicales (grupo R) de los aminoácidos, por lo que en solución acuosa las proteínas son moléculas cargadas. Asimismo estos grupos ionizables le confieren a la proteína su capacidad de tampón biológico o amortiguador de los cambios de pH del organismo.

La alteración de la estructura molecular de las proteínas más allá de estos cambios conformacionales en un rango fisiológico, determina la pérdida de la actividad biológica de la proteína. La cual puede llegar a ser irreversible provocando graves daños celulares.

OBJETIVOS

1. El desarrollo de esta actividad persigue que los alumnos
2. Conozcan la estructura química y comprendan el comportamiento ácido-base de los aminoácidos y las proteínas
3. Conozcan la estructura molecular de las proteínas y comprendan su importancia en la diversas funciones biológicas que ellas realizan

CUESTIONARIO

1.
 - a) Determine el punto isoiónico de los siguientes aminoácidos: Arginina, tirosina e histidina. Escriba la estructura del zwitterión.
 - b) ¿Cuál será la carga neta de histidina, tirosina y fenilalanina a pH 7.0? Escriba la estructura del ión correspondiente.

- c) A un pH igual al pHi la carga neta de la lisina es 0. Determine cuál es este pH y escriba la estructura iónica correspondiente.

Nota: para los ejercicios 1, 2 y 3 utilice los valores de pK de la tabla al final de la guía.

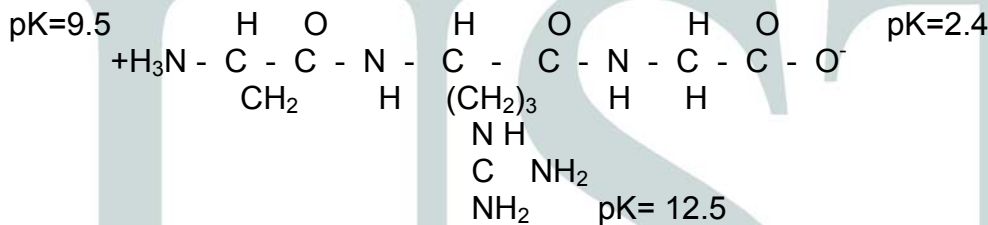
2.

- a) Escriba la estructura completa de los siguientes péptidos

- i. γ -glu- cis - gli
- ii. leu - met - ala
- iii. fen - tir - arg - trip

- b) ¿A qué polo migrará cada péptido en una electroforesis a pH 7.0?

3. Dada la siguiente secuencia de aminoácidos



- a) ¿Cuántos aminoácidos están representados?
- b) Encierre en un recuadro los enlaces peptídicos
- c) ¿Cuál será la carga neta de esta molécula a pH 7.0?

4. Que entiende por:

- a) Estructura primaria
- b) Estructura secundaria
- c) Estructura terciaria
- d) Estructura cuaternaria de una proteína

Indique en cada caso el (los) tipo (s) de enlace químico que estabilizan la estructura correspondiente y entre que grupos químicos se producen.

5.

- a) ¿Qué aminoácidos favorecen y cuales interrumpen la estructura de alfa hélice?
- b) ¿Qué tipo de estructura secundaria predomina en proteínas globulares y fibrilares?
- c) ¿Qué entiende por dominios de organización de las proteínas y cual es su rol funcional?

6. Una proteína globular contiene entre otros los siguientes aminoácidos: Metionina, aspartato, fenilalanina, tirosina, arginina y leucina. En un medio acuoso

- a) ¿Cuáles de estos aminoácidos estarán probablemente situados cerca de la superficie?
- b) ¿Cuáles de estos radicales podrían interactuar entre sí? Indique el tipo de interacción que presentarían.
7. ¿Cómo se puede determinar la composición aminoacídica de la oxitocina (un nonapéptido)? Explique brevemente.
8. ¿Cómo se explica el efecto tampón de las proteínas y en que rango de pH es más evidente?
- 9.
- a) ¿Cómo afectan a la solubilidad de las proteínas los cambios de pH y de concentración de sales? Explique considerando los diferentes tipos de proteínas.
- b) ¿Qué entiende por punto isoeléctrico de una proteína?
- c) ¿Qué entiende por denaturación de una proteína? ¿Qué agentes denaturantes físicos y químicos conoce y cómo afectan a la estructura de las proteínas?

Valores de pK de los aminoácidos más comunes

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Símbolo</u>	<u>pKCOOH</u>	<u>pKNH₂</u>	<u>pKR</u>
Glicina	(Gli)	G	2.34	9	-
Alanina	(Ala)	A	2.35	9.69	-
Leucina	(Leu)	L	2.36	9.60	-
Metionina	(Met)	M	2.28	9.21	-
Isoleucina	(Ileu)	I	2.36	9.68	-
Fenilalanina	(Fen)	F	1.83	9.13	-
Valina	(Val)	V	2,29	9.74	-
Serina	(Ser)	S	2.19	9.21	-
Prolina	(Pro)	P	2.95	10.65	-
Triptofano	(Trip)	W	2.38	9.38	-
Ac. Glutámico	(Glu)	G	2.13	9.76	4.31
Histidina	(His)	H	1.82	9.17	6.0
Arginina	(Arg)	R	2.17	9.04	12.48
Lisina	(Lis)	K	2.18	8.95	10.53
Tirosina	(Tir)	Y	2.20	9.11	10.07
Cisteína	(Cis)	C	1.92	10.78	8.33

BIBLIOGRAFIA

1. Lehninger A, Nelson D, & M Cox. 1995. Principios de bioquímica. Capítulos 5 y 6 Ed Omega.
2. Murray, Mayes, Granner y Rodwell. Bioquímica de Harper Appleton-Lange Eds. 22^a. Edición, Capítulos 4, 5 y 6.

Laboratorio N° 4: Enzimología I

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son biocatalizadores proteicos esenciales para mantener los procesos metabólicos a velocidades compatibles con la vida, contribuyendo además a su regulación. Debido a su naturaleza proteica las enzimas pueden modificar su actividad por cambios de temperatura y pH, factores que pueden alterar la estructura molecular de la enzima, provocando su desnaturalización. En general una reacción química aumenta su velocidad de reacción al aumentar la temperatura, pero en el caso de las reacciones catalizadas por enzimas, este efecto se observa sólo entre 0 y 40 °C, ya que a temperaturas mayores la enzima se desnaturaliza debido a la ruptura de enlaces débiles, principalmente puentes de hidrógeno y la pérdida de su conformación nativa.

Debido también a su naturaleza proteica la enzima presenta numerosos grupos ionizables, los que derivan de los radicales de sus aminoácidos constituyentes. Las alteraciones del pH pueden cambiar el grado de ionización de los grupos químicos involucrados en el sitio activo de la enzima, afectando su actividad catalítica.

Las enzimas son activas en un rango estrecho de pH, con una actividad máxima a un valor de pH denominado pH óptimo. Por tal motivo la actividad enzimática se mide en presencia de tampones o amortiguadores de pH.

OBJETIVOS

Estas actividades prácticas tienen como objetivo que los alumnos

1. Se familiaricen con los procedimientos de laboratorio para manipular muestras biológicas
2. Conozcan algunos procedimientos para determinar la actividad de una enzima en muestras biológicas
3. Comprueben el efecto que tiene en la actividad de una enzima las variaciones de pH y temperatura

ACTIVIDADES

Objetivo: Estudiar el efecto de las variaciones de pH y temperatura sobre la actividad de la amilasa salival.

La amilasa salival es una enzima que rompe específicamente los enlaces glicosídicos α 1-4 de los polisacáridos. La hidrólisis del almidón por amilasa salival da como producto una mezcla de maltosa, maltotriosa (dextrinas) y glucosa. El almidón es un polisacárido formado por 2 tipos de cadena: amilasa (lineal), que presenta sólo enlaces α 1-4 y amilopectina (ramificada), con enlaces α 1-4 y α 1-6 El almidón se reconoce químicamente por el color azul intenso que desarrolla en

presencia de yodo, por lo que la hidrólisis enzimática del almidón se puede determinar por la pérdida del color azul de una mezcla de reacción.

PROCEDIMIENTO

A.- Efecto de la Temperatura sobre la hidrólisis enzimática del almidón

Numere 4 tubos de ensayo y agregue a cada uno 2 ml de la preparación enzimática, 1 ml de la solución de cloruro de sodio, 1 ml de la solución tampón fosfato pH 7.0 y 2 ml de solución de almidón. Mezcle suavemente sin agitar e incube durante 15 minutos en las siguientes condiciones: tubo 1 a 0°C (sobre hielo), el tubo 2 a 37°C en un baño termorregulado, el tubo 3 a 100°C (baño maría) y el tubo 4 a temperatura ambiente. Incluya un quinto tubo sin cloruro de sodio en la mezcla de Reacción a temperatura ambiente. Al cabo de los 15 minutos agregue 1 gota de lugol, mezcle y observe. Anote y discuta sus resultados.

B.- Efecto del pH sobre la actividad de la amilasa salival

Numere 4 tubos de ensayo y agregue a cada uno 2 ml de preparación enzimática, 1 ml de solución de cloruro de sodio y 2 ml de solución de almidón. Posteriormente adicione 1 ml de tampón fosfato pH 4.0 al tubo 1, 1 ml bufer pH 5.0 al tubo 2, 1 ml buffer pH 6.0 al tubo 3 y 1 ml buffer pH 8.0 al tubo 4. Mezcle y deje incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Al cabo de ese tiempo agregue una gota de lugol, mezcle y observe. Anote y discuta sus resultados.

Reactivos y Materiales

1. Preparación enzimática: Lavado bucal con agua destilada, filtrado y mantenido en hielo.
2. Tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0, pH 5.0, pH 6.0 y pH 8.0
3. solución de Cloruro de sodio 0.03 M
4. solución de almidón 1% p/v
5. solución de lugol
6. Baño termoregulado y de agua hirviendo

Laboratorio N° 5: Enzimología II

INTRODUCCIÓN

La catalasa es una enzima tetramérica, de naturaleza hemoproteica, que contiene un grupo hem en el sitio catalítico de cada subunidad. La catalasa es una enzima universalmente presente en los organismos aeróbicos. Su presencia parece estar relacionada con un sistema de defensa contra los efectos tóxicos de la utilización de oxígeno por los organismos aeróbicos. En las células eucarióticas se encuentra asociada con los peroxisomas de células animales, glioxisomas de células vegetales y glóbulos rojos de organismos superiores.

La catalasa cataliza la degradación del H_2O_2 , producto tóxico del metabolismo aeróbico, mediante dos formas de reacción: catalítica y peroxidativa, según las siguientes reacciones

- 1) catalasa + H_2O_2 ----- catalasa- H_2O_2 (compuesto I)
- 2) catalasa- H_2O_2 + H_2O_2 ----- catalasa + 2 H_2O + O_2
- 3) catalasa- H_2O_2 + RCH_2OH ----- catalasa + $RCOH$ + 2 H_2O

Las reacciones 1 y 2 corresponden a la reacción catalítica y las reacciones 1 y 3 corresponden a la reacción peroxidativa. En la célula intacta la catalasa funciona en forma peroxidativa, mientras que en condiciones de ensayo de laboratorio lo hace en forma catalítica. La reacción catalítica presenta cinética de primer orden, tal que $V = k [H_2O_2]$. Se puede seguir la reacción determinando el consumo de H_2O_2 en el tiempo y calculando el valor de la constante de primer orden k a partir de la siguiente fórmula $k = \log C_0 / C_t \times 2.3/\Delta t$, donde C_0 y C_t son las concentraciones de H_2O_2 al tiempo 0 y al tiempo t (seg) respectivamente, en tanto que Δt es la variación en el tiempo en segundos.

Ensayo enzimático de catalasa

La actividad de catalasa se puede determinar en muestras biológicas midiendo la disminución en el tiempo de la concentración de H_2O_2 mediante absorción de luz UV a 240 nm (espectrofotometría UV) o por titulación del H_2O_2 remanente con $KmnO_4$ (permanganometría). En este trabajo práctico se determinará la actividad de muestras de hígado y hemolizados, determinando la concentración de H_2O_2 por absorción UV.

OBJETIVOS

Esta actividad práctica tiene como objetivos que los alumnos:

1. Conozcan algunos procedimientos clásicos para determinar la actividad de la enzima catalasa en muestras hepáticas y sanguíneas

2. Observen la variación de la concentración de sustrato en el tiempo, determinen la constante de velocidad de primer orden de la reacción catalizada y sean capaces de expresar gráficamente sus resultados

A. Muestras, Reactivos y Materiales

1. Muestras

- a) Se utilizarán sobrenadantes de homogenizados de hígado al 10% p/v en buffer fosfato pH 7.0, 50 mM, tratados con Triton X-100 y conservados a 4°C (refrigerado) hasta las determinaciones.
- b) Los hemolizados se preparan a partir de glóbulos rojo lavados 3 veces con NaCl isotónico y hemolizados con 4 volúmenes de agua destilada (hemolizado Stock) y se conservan a 4°C hasta las mediciones.

En caso de guardar para otro día se deben congelar las muestras (sin diluir)

2. Soluciones

- a) Tampón fosfato pH 7.0, 50 mM. Se preparan soluciones de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 0.2 M se mezclan 122 ml de Na_2HPO_4 y 78 ml de NaH_2PO_4 y se completan a 1 L con agua destilada en un matraz aforado, conservándose en frío.
- b) Solución de H_2O_2 300 mM (Stock). 3.4 ml de H_2O_2 30 % se diluyen a 100 ml con tampón fosfato. Conservar en frío. O bien usar H_2O_2 comercial de 10 volúmenes como stock.

Materiales

- a) Tubos de ensayo de 20 ml
- b) Pipetas de 1, 2 y 5 ml
- c) Vasos de precipitado de 50 ml
- d) Matraces Erlenmeyer de 50 ml y 100 ml
- e) Propipetas
- f) Papel absorbente (toallas de papel)
- g) Marcador para vidrio
- h) Espectrofotómetro UV y cubetas
- i) Cronómetro (Timer)

B. ACTIVIDADES

1. Tomar 2 ml de solución H_2O_2 Stock y diluir a 20 ml con tampón fosfato en matraz Erlenmeyer de 50 ml (solución sustrato)
2. Preparar diluciones 1: 100 del extracto de hígado y 1: 50 de hemolizados con tampón fosfato
3. Tomar 3 ml de la solución sustrato y leer DO a 240 nm, de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ a tiempo 0.
4. Echar a andar la reacción agregando rápidamente (soplando fuerte) 1 ml de la dilución de enzima al matraz con solución sustrato y agite inmediatamente por rotación. Simultáneamente tome el tiempo en segundos.

5. Tome muestras de 3ml cada 20 segundos y lea rápidamente su DO a 240 nm. Registre el tiempo exacto, en segundos, al momento de la lectura.
6. Completar la tabla siguiente

Tubos	Tiempo (s)	Concentración H_2O_2	$[H_2O_2]_0 / [H_2O_2]_t$
0			
1			
2			
3			
4			

A partir de los moles de H_2O_2 en 3 ml determinar la concentración molar de H_2O_2 en la solución sustrato.

7. Construir gráficos $[H_2O_2]$ versus tiempo y $\log [H_2O_2]$ versus tiempo. Comparar y discutir en relación al tipo de cinética de la reacción
8. Calcular la actividad de catalasa a partir de la ecuación siguiente

$$k = \log Co / Ct \times 2.3 / \Delta t \quad (k = \text{seg.}^{-1})$$

La actividad de catalasa se puede expresar también como unidades internacionales

$$U.I., \text{ siendo } 1 U.I. = k \times 13 / 6.93 \times 10^{-3}$$

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Seminario N° 3: Enzimas y bioenergetica

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son de vital importancia para el metabolismo de todos los seres vivos (bacterias, vegetales y animales). Sin estos compuestos las reacciones bioquímicas serían tan lentas, que serían incompatibles con la vida. Además de acelerar las reacciones, en su papel de biocatalizadores, las enzimas presentan una instancia de regulación del metabolismo, ya que pueden modular su actividad en presencia de activadores, inhibidores, cambios de pH y concentración de iones y metabolitos.

El estudio de las enzimas es esencial para entender el metabolismo celular y muchas de ellas presentan localización celular específica, lo que permite utilizarlas como marcadores celulares.

Asimismo su determinación puede ser de gran importancia para el diagnóstico y evolución de enfermedades que involucran daño tisular con liberación de enzimas. Muchas enfermedades genéticas que afectan el metabolismo en bacterias, animales y vegetales son producidas por mutaciones de genes que codifican enzimas.

OBJETIVOS

El desarrollo de esta guía pretende que los alumnos

1. Revisen las características de las enzimas como biocatalizadores
2. Comprendan la relación entre los parámetros cinéticos de V , V_o , $V_{máx.}$ y K_M en relación a los procesos de reacción enzimática
3. Sean capaces de aplicar los métodos de representación gráfica en la determinación y análisis de los parámetros cinéticos de una enzima.
4. Analicen los principales mecanismos de regulación enzimática y comprendan su importancia en la regulación del metabolismo.

CUESTIONARIO

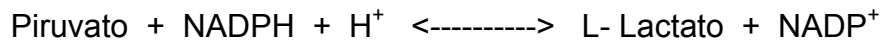
1. Indique que entiende por:
 - a) Energía de activación
 - b) Catalizador
 - c) Estereoespecificidad
 - d) Reacción de 1er orden
 - e) Reacción de orden 0
 - f) Sitio activo
 - g) Efecto alostérico
 - h) Inhibidor no-competitivo
 - i) Complejo activado

2. ¿Qué efecto tiene una enzima sobre: la velocidad de reacción, el equilibrio de la reacción, el orden de reacción, la energía de activación y el ΔE de una reacción enzimática? ¿Qué relación puede establecer entre E de activación y velocidad de Reacción?
3. Considerando la naturaleza proteica de las enzimas ¿qué precauciones se deben tomar para manipular y realizar el ensayo de la actividad de una enzima? ¿Qué ventajas puede tener analizar una reacción enzimática en condiciones de velocidad inicial (V_0)?
4. Dada una cierta reacción catalizada por una enzima en presencia de un exceso de sustrato. Indique:
- Que ocurre con la velocidad inicial (V_0), la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de Michaelis (K_M) si la concentración de enzima aumenta al doble.
 - Que ocurre con V_0 , $V_{m\acute{a}x}$ y K_M si se adiciona una sustancia que aumenta al doble la afinidad de la enzima por el sustrato.
5. Dada la ecuación general de una reacción enzimática
- $$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$$
- Escriba la expresión de velocidad a baja y alta concentración de sustrato
 - ¿Cuál es la expresión de K_M en función de las constantes de velocidad?
 - ¿En qué caso K_M sería igual a k_2/k_1 ?
 - Considerando una situación de estado estacionario escriba una ecuación que exprese la concentración de ES en función de $[S]$, $[E]$ y K_M
6. Dados los siguientes datos experimentales del estudio de la actividad de una enzima a 25 °C

S (M)	V_0 ($\mu\text{M min}^{-1}$)
$2,5 \times 10^{-6}$	28
$4,0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

- Utilizando análisis gráfico determine el valor de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M
- ¿Es posible determinar estos parámetros por simple inspección de los datos en la tabla?
- ¿Es posible calcular el ΔG° de la reacción? ¿Porqué?

7. Se ha estudiado la enzima malato deshidrogenasa de hígado de paloma, enzima que cataliza la reducción de piruvato en lactato según la siguiente reacción global



La reacción se puede seguir por disminución de absorción de luz (absorbancia) a 340 nm, correspondiente a la oxidación del NADPH. Se ha medido la velocidad de reacción expresada en mU a diferentes concentraciones de piruvato y a 25°C, lo que se muestra en la siguiente tabla

Piruvato (mM)	Velocidad de reacción (mU)
1,5	4,0
2,5	6,0
3,5	7,5
6,0	10,4
12,0	14,0

- a) Determine la velocidad máxima de la reacción y la K_m de piruvato.
 b) Si los potenciales de reducción de lactato y NAD^+ son -0.19 volts y -0.32 volts.
 c) Respectivamente ¿Cuál será el ΔG° de esta reacción? ¿Tiende a formar lactato?
 d) ¿Qué reacciones se acoplan en esta reacción de oxido-reducción?
 e) Si las concentraciones en un sistema celular a 37°C son 80 mM de lactato y 20 mM de piruvato ¿Cuál será el valor de ΔG para este sistema?
8. ¿Cómo puede distinguir experimentalmente si un inhibidor actúa en forma competitiva o no-competitiva?
- 9.
- a) ¿Qué entiende por enzima alostérica? y ¿Cómo puede reconocerla? Explique sobre la base de una enzima con efecto heterotrópico.
 b) Dé dos ejemplos de enzimas alostéricas indicando sus efectores positivos y negativos.
- 10.
- a) ¿Qué entiende por regulación por modificación covalente?
 b) ¿Qué efecto tiene la fosforilación y la defosforilación sobre la actividad de una enzima? Dé 2 ejemplos.

Laboratorio N° 6: Metabolismo de carbohidratos fermentación.

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos requieren un continuo aporte de nutrientes para suplir sus necesidades de materia y energía. El principal nutriente de la célula es la glucosa, la que es catabolizada para producir ATP, la forma más importante de energía utilizable en la célula. El metabolismo de la glucosa ocurre a través de una serie de reacciones:

Glicólisis: Glucosa \longrightarrow Piruvato, ATP

Ciclo de Krebs: Acetil CoA \longrightarrow CO₂ + NADH + H⁺ + FAD + ATP

Cadena respiratoria: NADH + H⁺, FADH₂ + O₂ \longrightarrow ATP + H₂O

En ausencia o deficiencia de oxígeno, ocurre respiración celular anaeróbica o fermentación, en que el piruvato (producto de la glicólisis) se transforma en etanol (levaduras) o ácido láctico (músculo).

En presencia de oxígeno suficiente ocurre respiración celular aeróbica, en que el piruvato se incorpora a la mitocondria y se transforma en Acetil CoA, el cual a través del ciclo de Krebs origina CO₂ y coenzimas reducidas. Estas coenzimas reducidas se incorporan a la cadena respiratoria mitocondrial, donde son reoxidados por O₂, produciendo ATP y H₂O. Esta vía aeróbica es la principal vía de producción de ATP. Algunas células como los glóbulos rojos y las bacterias anaeróbicas estrictas tienen en la fermentación la única vía de producción de ATP, en tanto que otras células como las levaduras, que son anaerobios facultativos, en ausencia de O₂ realizan fermentación y en presencia de él, realizan fermentación y respiración celular.

OBJETIVOS

1. Observar experimentalmente los fenómenos de respiración celular anaeróbica (fermentación) en levaduras.
2. Comprobar el efecto de inhibidores de la glicólisis y de la respiración celular.
3. Aplicar los conceptos de sustrato, inhibidores competitivos, inhibidores no competitivos, oxido-reducción, modificación de pH e inhibidores en la interpretación de sus resultados.

ACTIVIDADES

Fermentación alcohólica en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

La fermentación alcohólica en levaduras ocurre de acuerdo a la reacción:



El etanol se acumula en el medio y el CO_2 es liberado como gas, por lo que se puede medir la fermentación por la producción de CO_2 .

Procedimientos.

1. Complete la siguiente batería de tubos:

Tubos	1	2	3	4
Suspensión de levadura 7%	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Solución de glucosa	-	1 ml	1 ml	1 ml
Solución NaF	-	-	1 ml	-
Agua destilada (43°C)	2 ml	1 ml	-	-
Solución rojo neutro	-	-	-	1 ml

Agitar por inversión para homogenizar el contenido de cada tubo.

2. Tapar cada tubo con un frasco de penicilina invertido, presionándolo girar rápidamente de manera que el tubo quede invertido dentro del frasco. Marcar el nivel de la burbuja en la parte superior del tubo y amarrando con un elástico los 4 frascos, ponerlos a incubar en un baño de agua a 43°C.
3. Al cabo de 30 min. marque el nivel final de la solución en el tubo y mida el volumen de gas producido con una pipeta con agua.
4. Cual es el objetivo del tubo 4? Verifique el pH en el tubo 2 con papel pH.
5. Anote y discuta sus resultados.

Soluciones:

1. Solución de levadura: disolver a homogeneidad 7 g de levadura en 10 ml de agua destilada a 43°C y completar a 100 ml con agua destilada a 43°C.
2. Solución de glucosa 0,1 M
3. Solución de NaF 0,1 M
4. Solución rojo neutro 0,02 M

Papel pH.

Laboratorio N° 7: Metabolismo de carbohidratos ciclo de krebs

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos requieren un continuo aporte de nutrientes para suplir sus necesidades de materia y energía. El principal nutriente de la célula es la glucosa, la que es catabolizada para producir ATP, la forma más importante de energía utilizable en la célula. El metabolismo de la glucosa ocurre a través de una serie de reacciones:

Glicólisis: Glucosa \longrightarrow Piruvato, ATP

Ciclo de Krebs: Acetil CoA \longrightarrow CO₂ + NADH + H⁺ + FAD + ATP

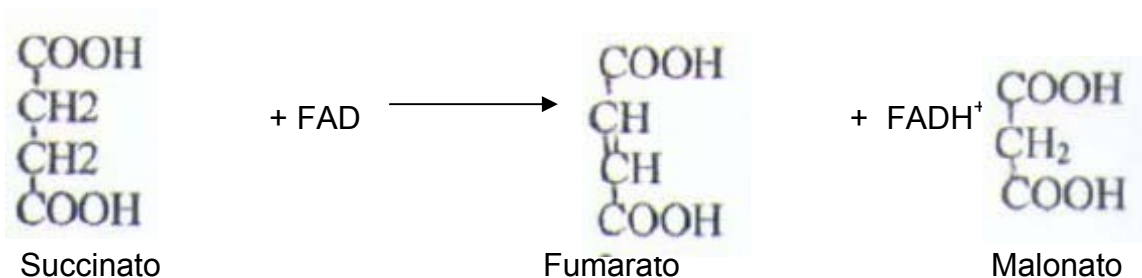
Cadena respiratoria: NADH + H⁺, FADH₂ + O₂ \longrightarrow ATP + H₂O

En ausencia o deficiencia de oxígeno, ocurre respiración celular anaeróbica o fermentación, en que el piruvato (producto de la glicólisis) se transforma en etanol (levaduras) o ácido láctico (músculo).

En presencia de oxígeno suficiente ocurre respiración celular aeróbica, en que el piruvato se incorpora a la mitocondria y se transforma en Acetil CoA, el cual a través del ciclo de Krebs origina CO₂ y coenzimas reducidas. Estas coenzimas reducidas se incorporan a la cadena respiratoria mitocondrial, donde son reoxidados por O₂, produciendo ATP y H₂O. Esta vía aeróbica es la principal vía de producción de ATP. Algunas células como los glóbulos rojos y las bacterias anaeróbicas estrictas tienen en la fermentación la única vía de producción de ATP, en tanto que otras células como las levaduras, que son anaerobios facultativos, en ausencia de O₂ realizan fermentación y en presencia de él, realizan fermentación y respiración celular.

Respiración aeróbica en corazón o hígado de rata.

La deshidrogenada succínica es una enzima del ciclo de Krebs, que cataliza la oxidación de ácido succínico a ácido fumárico. Usando FAD⁺ como coenzima. Esta enzima es específica para el ácido succínico, pero puede ser inhibida competitivamente por el ácido malónico.



En sistemas de ensayo con extractos de tejido, se puede utilizar azul de metileno como aceptor de electrones de H^+ el cual en estado oxidado es azul y en estado reducido es incoloro. Por lo tanto se puede reconocer la actividad enzimática por la decoloración del azul de metileno en ausencia de oxígeno, ya que el oxígeno del aire reoxida el azul de metileno.

OBJETIVOS

1. Observar experimentalmente los fenómenos de respiración celular aeróbica en extractos de tejidos.
2. Comprobar el efecto de inhibidores de la glicólisis y de la respiración celular.
3. Aplicar los conceptos de sustrato, inhibidores competitivos, inhibidores no competitivos, oxido-reducción, modificación de pH e inhibidores en la interpretación de sus resultados.

ACTIVIDADES

1. Complete la siguiente batería de tubos.

Tubos	1	2	3	4	5
Tampón fosfato	4 ml	2 ml	2 ml	2 ml	1 ml
Preparación enzima	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Glucosa 0,1 M	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Succinato 0,1 M	-	1 ml	-	0,5 ml	1 ml
Malonato 0,1 M	-	-	1 ml	0,5 ml	-
KCN 0,05 M	-	-	-	-	1 ml

Nota: Agregar KCN con propipeta, NO USE LA BOCA PARA PIPETEARLO.

2. Mezclar por inversión y agregar 5 gotas de azul de metileno 0,02 % inclinando el tubo agregar por la pared del tubo una capa de aceite para aislar el aire de la mezcla de ensayo.
3. Incubar los tubos a 37°C por una hora, observar y anotar los resultados.
4. Agite el tubo decolorado. ¿Que observa? Explique.

Analizar y discutir los resultados. Presentar un informe escrito.

Soluciones:

5. Preparación enzimática de succinato deshidrogenada. Preparar un homogeneizado de corazón o hígado de rata al 20% p/v en tampón fosfato 100 mM a temperatura ambiente. Centrifugar a 1000 rpm aproximadamente y obtenga el sobrenadante que será la preparación enzimática y consérvelo a 4°C.
6. Solución de glucosa 0,1 M
7. Solución de azul de metileno 0,02 M
8. Solución de succinato de sodio 0,1 M

9. Solución de malonato de sodio 0,1 M
10. Tampón fosfato 100mM
11. KCN 0,05 M

Las soluciones 8 y 9 llevarlas a pH 7 con NaOH 0,2 M

Nota: Soluciones NaF y KCN agregar con propipeta



Seminario Nº 4: Estructura y metabolismo de hidratos de carbono

INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos dependen de un continuo aporte de materia y energía para realizar sus funciones básicas y son dos los principales procesos de obtención de energía: nutrición autotrófica y nutrición heterotrófica. En la nutrición autotrófica los organismos vegetales con clorofila realizan fotosíntesis capturando para ello la energía solar en moléculas orgánicas, principalmente hidratos de carbono. En la nutrición heterotrófica los organismos vivos aprovechan los productos de la fotosíntesis para obtener energía a través de procesos degradativos exergónicos u oxidativos.

Así, los hidratos de carbono que son el primer y principal producto de la fotosíntesis, son a la vez la principal fuente de energía de la célula, cuyo metabolismo está adaptado para usar hidratos de carbono por glicólisis anaeróbica o fermentación o por respiración celular vía glicólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria mitocondrial.

Con respecto a los hidratos de carbono se sabe que las hexosas-P son la primera fuente de energía en la célula. A partir de su transformación metabólica se producen triosas-P que son intermediarios de alta energía para generar ATP en la glicólisis, dando piruvato como producto de esta vía. El metabolismo mitocondrial aeróbico del piruvato genera una serie de ácidos carboxílicos que a través de reacciones de oxido-reducción generan a su vez coenzimas reducidos ($\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2) y liberan CO_2 . Estas coenzimas reducidas aportan electrones de alta energía para que en la cadena respiratoria mitocondrial se produzca la síntesis de ATP. El aceptor final de estos electrones es el oxígeno, el cuál una vez reducido interactúa con protones para producir agua. En resumen el metabolismo aeróbico de la glucosa da como productos finales ATP, CO_2 y agua. Es importante destacar la importancia de los sistemas enzimáticos en estas vías metabólicas, ya que además de catalizar las múltiples reacciones, realizan un estricto control del metabolismo

OBJETIVOS

1. Revisar la estructura, características e importancia de los hidratos de carbono
2. Conocer y comprender el papel de los hidratos de carbono como fuente de energía en la célula en relación a los requerimientos energéticos de los seres vivos
3. Conocer las vías metabólicas de utilización de los hidratos de carbono, comprender sus mecanismos de regulación y sus interrelaciones con otras vías metabólicas
4. Conocer y comprender los mecanismos de regulación de la glicemia en los organismos animales, especialmente mamíferos

CUESTIONARIO

1. Escriba la estructura de cadena abierta y/o cíclica de:
 - a) D- deoxiribosa
 - b) -D- glucopiranososa
 - c) -D- fructofuranosa -6-P
 - d) Sacarosa
 - e) Glucosa - 1- P
 - f) Glucosa - 6 -P
 - g) Gliceraldehído -P

2. Qué entiende por:
 - a) Enantiómeros
 - b) Anómeros
 - c) Enlace glicosídico β 1-4
 - d) Cetohehexosa
 - e) Homopolisacárido
 - f) Glicosaminoglicanos

3. Considerando que el ΔG° de oxidación completa de la glucosa es - 686.000 cal / mol y que el ΔG° de formación del ATP es de -7.500 cal /mol ¿Cuál sería la producción de ATP en moles por la oxidación de un mol de glucosa asumiendo una eficiencia energética del 100%? ¿Cuál es el rendimiento real en la célula?

4. *Para un individuo que realiza trabajo pesado se estima un requerimiento energético de 147 cal / min/ k de peso. Calcule el consumo de ATP expresado en gramos de un individuo de 70 kilos que realiza 8 horas de trabajo pesado. (PM ATP = 507.2 g/ mol).

5. *Con respecto a la glucosa indique
 - a) ¿Por qué es el principal carbohidrato utilizado en la célula?
 - b)Cuál puede ser el origen de la glucosa utilizada por los tejidos? Esquematice.
 - c) ¿Como se regula el nivel de glucosa sanguínea o glicemia? Esquematice.

6. ¿Qué papel tiene el glicógeno almacenado en el hígado y en el músculo esquelético? ¿Cómo se regula su nivel?

7. Señale las diferentes vías metabólicas que puede seguir la glucosa -6-fosfato en la célula, indicando su importancia y su localización celular

8. *Respecto a la glicólisis indique:
 - a) En un esquema los productos e intermediarios de esta vía
 - b) ¿Cuál es el papel de las primeras fosforilaciones que sufre la glucosa al ingresar a la célula e incorporarse a la glicólisis?
 - c) Analice la importancia de la glicólisis en el músculo y en el glóbulo rojo

- d) ¿Cuáles son las etapas reguladas de esta vía? Indique sus mecanismos de regulación
- e) ¿Cuáles son los productos de la glicolisis en condiciones aeróbicas y con déficit de oxígeno en una célula muscular? ¿Porqué siendo tan baja la producción de ATP por la vía “anaeróbica” es tan alta su importancia para el trabajo muscular intenso?
- f) Qué efecto tiene en la glicolisis la adición del
 - i. Iodoacetato
 - ii. Fluoruro
 - iii. ATP
 - iv. Fructosa 2,6 difosfato

9. Con respecto al ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico indique

- a) ¿Cuál es su importancia en el metabolismo?
- b) ¿Porqué esta vía es dependiente de oxígeno?
- c) Los sitios de la vía en que se produce CO_2 , NADH, FADH_2 y ATP
- d) Las etapas reguladas de esta vía y los factores que la afectan

10. *Si tiene una preparación de mitocondrias aisladas.

- a) ¿Qué efecto tiene la adición de KCN? y ¿Qué consecuencias tiene para el ciclo de Krebs y la glicolisis?
- b) ¿Qué tipo de sustancia es un compuesto desconocido que al agregarlo al sistema inhibe la fosforilación oxidativa y aumenta el consumo de oxígeno?
- c) ¿Cómo se explican las diferencias de producción de ATP a partir de NADH citosólico y NADH mitocondrial?
- d) ¿Cuál es el mecanismo que explica la producción de ATP a nivel mitocondrial?

NOTA: Las preguntas marcadas con asterisco se deben desarrollar de preferencia.

Laboratorio Nº 8: Extracción y Cromatografía de Lípidos

INTRODUCCIÓN

Los lípidos comprenden una amplia gama de compuestos insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (éter, acetona, cloroformo, benceno, etc.). Debido a su insolubilidad en agua, los lípidos presentes en las estructuras biológicas se encuentran generalmente asociados a otras biomoléculas como proteínas e hidratos de carbono.

Por otra parte, aunque los lípidos se consideran sustancias hidrofóbicas o apolares, presentan diferente grado de polaridad. Los triglicéridos totalmente apolares, no tienen ningún grado de interacción con el agua, en tanto que los fosfolípidos son moléculas bipolares e interactúan con el agua formando monocapas, bicapas y micelas. El colesterol es también una molécula bipolar debido al grupo OH unido a su anillo esteroideal. Así por ejemplo la acetona extrae principalmente triglicéridos y colesterol, ya que los fosfolípidos son poco solubles en acetona.

Por lo tanto, cualquier método de extracción de lípidos requiere utilizar mezclas de solventes orgánicos que permitan solubilizar todos los lípidos y precipiten proteínas e hidratos de carbono para su mejor separación. Aprovechando la solubilidad diferencial de los lípidos se puede realizar una extracción fraccionada con distintos solventes, lo que permite a la vez la separación de los diferentes lípidos

Se pueden extraer lípidos totales con una mezcla de metanol:éter (1:1) y separarlos posteriormente por cromatografía de adsorción en capa fina.

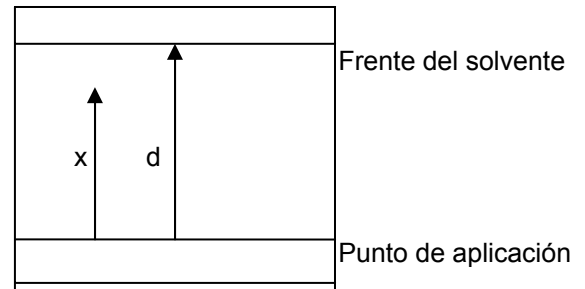
La separación de los componentes de una mezcla por cromatografía de adsorción, se basa en:

1. El diferente grado en que cada componente se une o es adsorbido a un soporte sólido (fase estacionaria)
2. La diferente solubilidad de las sustancias de la mezcla en una combinación de solventes de diferente polaridad, que se hace pasar por el soporte sólido (fase móvil)

El soporte sólido debe ser lo suficientemente poderoso (activo) para retener la mayor cantidad de sustancia. Por ejemplo el gel de sílica se utiliza como soporte sólido para sustancias apolares como los lípidos. El grado de adsorción de cada sustancia es variable, así por ejemplo un fosfolípido con un grupo bastante polar será más retenido que el colesterol libre con un grupo menos polar y éste más retenido que los triglicéridos. De esta manera, el fosfolípido y el colesterol migran más lentamente que los triglicéridos, haciendo posible su separación. Para la identificación de los diferentes lípidos se usan patrones o estándar de la sustancia pura y se reconocen por comparación de sus Rf.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia (x)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (d)}}$$

El R_f es una constante para cada sustancia en las condiciones establecidas



Placa de cromatografía: Placa de vidrio (20 x 20 cm.)

Para la cromatografía de adsorción se usan placas de vidrio de 20 x 20 cm., cubiertas con una capa fina ($\pm 0,25$ mm) de gel de sílice (Silica gel G), formada a partir de una pasta fluida (10 g de Silica gel G + 20 ml de agua destilada). La placa es posteriormente deshidratada o activada colocándola a 120°C por 30 minutos.

OBJETIVOS

Esta actividad de trabajo de laboratorio tiene como objetivos que

1. Los alumnos conozcan métodos generales de extracción de lípidos
2. Conozcan métodos cromatográficos sencillos de separación e identificación de lípidos
3. Comprendan las propiedades fisicoquímicas de los lípidos involucradas en la extracción y cromatografía de lípidos con solventes orgánicos

ACTIVIDADES

1. Extracción de lípidos de yema de huevo.

Colocar una yema de huevo en un matraz de 250 ml (con tapa) y agregar 50 ml de etanol y 50 ml de éter, tapar herméticamente y agitar. Dejar reposar 10 minutos y filtrar con papel filtro. El filtrado será utilizado como muestra para separar e identificar lípidos.

2. Aplicación de muestras y desarrollo de la cromatografía

Tomar cuidadosamente una placa de vidrio cubierta con sílica gel y marcar cuidadosamente 5 puntos para la aplicación de la muestra y los 4 estándar: Triglicéridos, colesterol, ácido esteárico y fosfolípidos. Las muestras y los estándar se colocan en la placa a más o menos 2 cm del borde inferior. Las sustancias se aplican con una micropipeta gota a gota de manera que la mancha sea del menor diámetro posible, para ello se aplica la gota y se seca con secador de pelo cada vez.

Posteriormente se pone la placa cromatográfica en una cámara con una mezcla de solvente cloroformo:metanol:amoniaco (75 : 25 : 4), previamente saturada, para "correr" la cromatografía. El nivel de solvente en la cámara no debe ser mayor a 1,5 cm. Al cabo de $\frac{3}{4}$ de hora a 1 hora se saca la placa y se marca el frente del solvente.

Se seca la placa y se revela en una cámara con vapores de yodo o por pulverización (spray) con ácido fosfomolibdico etanólico 10 % p/v y se colocan en la estufa a 110 °C por 10 minutos. En este último caso se deja evaporar el alcohol antes de ponerlo a la estufa.

A partir de las manchas producidas por el revelado se calculan los R_fs y se comparan las muestras con los estándar para la identificación de las sustancias de la muestra.

Anote sus resultados y compare con los datos de la literatura. Discuta con respecto a los valores de R_f obtenidos y la composición de lípidos de la yema de huevo.

Material y Reactivos:

1. Huevos enteros (se ocupará la yema como fuente de lípidos)
2. Mezcla Metanol – Eter (1:1 v/v)
3. Mezcla Cloroformo - Metanol – Amoniaco (75:25:4 v/v) o Eter de petroleo: éter etílico: ácido acético (10 :90 :1)
4. Soluciones 2 mg/ml en metanol-eter (1:1) de colesterol, tripalmitina, lecitina y ácido Esteárico (soluciones estándar)
5. Acido fosfomolibdico 10% en etanol
6. Yodo metálico
7. Placas de cromatografía (20 cm x 20 cm)
8. Sílica gel G
9. Cámaras cromatográficas de vidrio, con tapas.
10. Estufa a 110°C
11. Secador de pelo
12. Micropipetas o pipetas Pasteur

Nota: Las placas cromatográficas se deben preparar con bastante antelación (3 o 4 días); deben estar totalmente secas. O bien, se compran listas, existen en el mercado placas preparadas para cromatografía de lípidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Clark J.M. Jr. (ed) Experimental Biochemistry, W. H. Freeman and Co. 1964. Págs. 43 – 51.
2. Abboot D. y Andrews R.S. Introducción a la cromatografía, Editorial Alambra S.A. 2ª Edición , 1970.
3. Nelson D.L. y Cox M.M. Principios de Bioquímica de Lehninger, 3ª Ed.2000. Cap.11.

Seminario Nº 5: Estructura y Metabolismo de Lípidos

INTRODUCCIÓN

Los lípidos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como cloroformo, eter, acetona, etc.

Los lípidos naturales se encuentran mayoritariamente como grasas sólidas y aceites, con un rol principalmente de reserva energética o aislante térmico o eléctrico. Los lípidos son componentes de las membranas biológicas (fosfolípidos) y tienen un importante papel en la regulación (hormonas esteroidales, prostaglandinas, etc). Los lípidos de la dieta pueden afectar la composición de lípidos de la célula y alterar las funciones biológicas. El efecto de los lípidos de la dieta en la salud humana ha sido ampliamente estudiado y existen recomendaciones aconsejando el consumo de ácidos grasos insaturados omega 3 y disminuir el consumo de colesterol, con el fin de prevenir alteraciones de las funciones cardiovasculares.

Según su composición química las grasas naturales existen como ésteres de glicerol y ácidos grasos (acilglicéridos), o como ésteres de ácidos grasos y esfingosina (esfingolípidos). Los ácidos grasos son de dos tipos: ácidos saturados, como los ácidos grasos palmítico (16 C) y esteárico (18 C), que son los más abundantes y ácidos grasos insaturados tales como los ácidos oleico (18 C: 1), el ácido linoleico (18 C:2, ω 6) y el ácido Linolénico (18 C : 3, ω 3), siendo estos dos últimos ácidos grasos esenciales.

La grasa más abundante son los triglicéridos (TG), principal reserva de energía de los seres vivos. Otro importante grupo de lípidos son los esteroides entre los que se encuentra el colesterol y sus derivados, tales como los ácidos biliares y las hormonas estroidales.

La utilización metabólica de los lípidos, ya sea a partir de la dieta o de las reserva de TG, implica un proceso de activación citosólica y oxidación mitocondrial y peroxisomal (β - oxidación). Ambos proceso producen coenzimas reducidos (NADH y FADH₂) y AcetilCoA, pero sólo la oxidación mitocondrial está acoplado a la producción de ATP, en tanto que la oxidación peroxisomal debe enviar sus productos a la mitocondria para generar ATP.

La oxidación de lípidos representa una alta fuente de energía para la célula, pero su uso excesivo genera exceso de cuerpos cetónicos y acidosis metabólica, tal como ocurre en la diabetes y el ayuno prolongado.

El organismo presenta una alta capacidad para acumular lípidos como triglicéridos (lipogénesis), esterificando el exceso de ácidos grasos provenientes de la dieta o esterificando ácidos grasos sintetizados a partir de hidratos de carbono y aminoácidos.

Con excepción de los vegetales y algunos microorganismos, los organismos vivos tienen capacidad de sintetizar colesterol. En los mamíferos el principal sitio de síntesis de colesterol es el hígado, el que es a la vez el principal sitio de degradación de colesterol a ácidos biliares.

OBJETIVOS

El desarrollo de esta guía de ejercicios pretende que los alumnos

1. Conozcan la composición química y las propiedades de los lípidos
2. Conozcan y comprendan los procesos de transporte, las vías metabólicas y mecanismos de regulación en la utilización y biosíntesis de los lípidos
3. Comprendan las relaciones del metabolismo de lípidos con otras vías metabólicas y las alteraciones del metabolismo en patologías asociadas al metabolismo de lípidos.

CUESTIONARIO

1. Escriba la estructura molecular de:
 - a) ácido graso C 20:4, ω 6,9,12,15 (serie ω 6)
 - b) ácido linolénico C 18:3, ω 3, 6,9 (serie ω 3)
 - c) Tripalmitina
 - d) Fosfatidil etanolamina
 - e) Colesterol
 - f) Etilnil estradiol (anticonceptivo oral)

Indique la polaridad y solubilidad en agua de cada compuesto.
2. Describa brevemente el proceso de digestión, absorción y transporte de lípidos
3. ¿De qué manera afecta a la utilización de lípidos de la dieta:
 - a) Una falla pancreática
 - b) Una falla hepática
4. Esquematice el proceso de β - oxidación mitocondrial del ácido esteárico (C 18:0). Establezca
 - a) El número de moles de NAD^+ , FAD^+ , ATP y CoASH requeridos
 - b) Los moles de ATP producidos por la oxidación completa del ácido graso
5. ¿Cómo se regula el nivel de ácidos grasos libres en el plasma? Esquematice
6. ¿Qué entiende por cetogénesis? En que condiciones normales o patológicas se puede producir un aumento de cuerpos cetónicos en el plasma? Explique
7. Explique brevemente ¿Qué efecto tendrá en la biosíntesis de lípidos

- a) Un aumento del nivel de I. AcetilCoA II. Citrato III. Acidos grasos libres
b) Una disminución del nivel de I. Biotina II. NADPH III. Glucosa
8. ¿Qué relaciones puede establecer entre el metabolismo de glucosa y la biosíntesis de triglicéridos? En base a estas relaciones explique porqué una dieta habitualmente rica en hidratos de carbono produce obesidad
9. Un investigador en la Antártida decide utilizar mantequilla como fuente de energía. Explique qué le sucederá al cabo de 15 días con respecto a:
- a) El nivel de cetogénesis
b) La utilización de sus proteínas corporales
10. Esquematice el rol de las lipoproteínas plasmáticas (QM, VLDL, LDL, HDL) en el transporte de lípidos. ¿Qué importancia tiene su determinación en el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares?
11. Esquematice las vías de utilización y síntesis de colesterol. ¿Qué relación tiene con la biosíntesis de ácidos biliares?
12. ¿Podría prescindir de la presencia de lípidos en la dieta? Explique

BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson y Cox Bioquímica de Lehninger Capítulos 11, 17 y 21
2. Styer Lbert Bioquímica 4° Edición 1995 . Edit. Reverté . Capítulo 24.

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Seminario N° 6A: Metabolismo de aminoácidos

INTRODUCCIÓN

El recambio natural de todas las proteínas y otros compuestos nitrogenados, con una vida media de días a meses, exige un aporte constante de proteínas en la dieta.

La dieta normal debe contener alrededor de 20 % del contenido energético en proteínas de buena calidad, que aporte todos los aminoácidos esenciales y que tenga alta digestibilidad.

Las proteínas ingeridas son digeridas por proteasas a nivel estomacal e intestinal dando origen a péptidos y aminoácidos cuya absorción intestinal depende de transportadores. También existe absorción de proteínas no digeridas por pinocitosis, lo cuál es de gran importancia para incorporar anticuerpos de la leche materna en la inmunización pasiva de los recién nacidos.

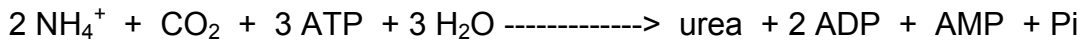
La falta de proteínas de la dieta determina aumento de degradación de proteína endógena, utilizadas como fuente de nitrógeno y de aminoácidos, especialmente de aminoácidos esenciales. En caso de ayuno prolongado se degradan proteínas corporales como fuente de energía, lo que implica el catabolismo de los aminoácidos a través de dos procesos

1. Incorporar el esqueleto hidrocarbonato (cetoácido) en las vías oxidativas de obtención de ATP o en la formación de glucosa por gluconeogénesis y
2. Eliminar el grupo amino por transaminación para formar aminoácidos no esenciales y otros productos nitrogenados o generar amonio (NH_4^+) por desaminación oxidativa, para posteriormente sintetizar urea, producto menos tóxico que el amoniaco.

Las transaminaciones juegan también un importante papel en la eliminación del nitrógeno proteico, ya que las transaminasas transfieren el grupo amino de la mayor parte de los aminoácidos hasta glutamato, dado que este aminoácido es el único que sufre deaminación oxidativa apreciable por la enzima glutamato deshidrogenada, enzima alostérica con alta actividad en hígado y activada por ATP, GTP y NADH. El transporte del grupo amino desde otros tejidos al hígado se realiza como glutamina, no toxica, la cuál es desaminada a glutamato por la enzima glutaminasa hepática, liberando amonio para la síntesis de urea.

Una glutaminasa renal libera amonio que es eliminado directamente en la orina. La glutamina sintetasa es una importante enzima que permite remover el amonio tóxico de los tejidos, especialmente del cerebro, sobre todo cuando existe una falla hepática. El hígado juega un rol central en la remoción del amonio producido por los tejidos convirtiéndolo en glutamato y urea.

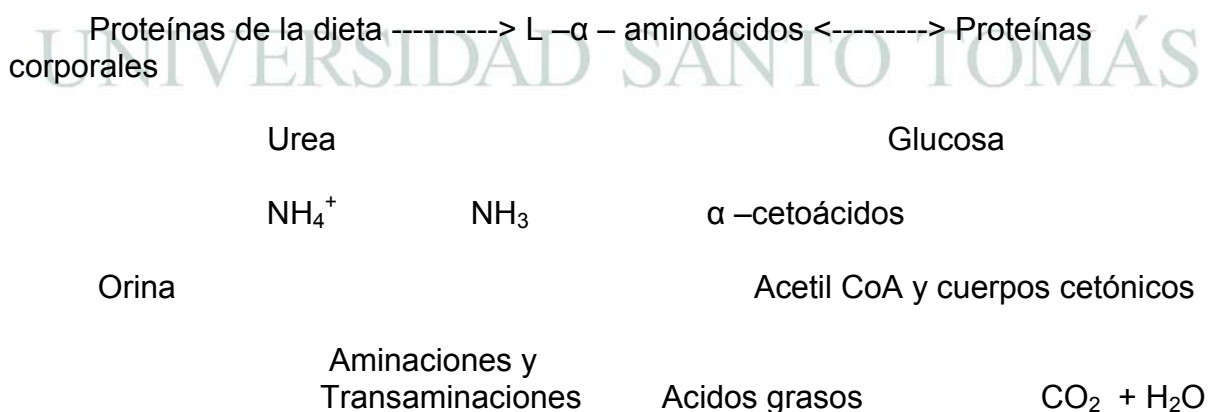
El hombre bien alimentado, con una actividad moderada, consume aproximadamente 100 gramos de proteína al día y excreta 16 gramos de nitrógeno, 95% del cuál es eliminado por los riñones y el 5% restante por las heces. Entre el 80% al 90% del nitrógeno excretado por los riñones es en forma de urea, sintetizada exclusivamente por el hígado, con un alto costo energético. Por cada mol de urea formada se requieren 3 moles de ATP, como se aprecia en la reacción siguiente de la síntesis de urea



Existen varios desórdenes metabólicos asociados con deficiencias de enzimas de la síntesis de urea y cuyos síntomas más frecuentes son vómitos, intolerancia a proteínas, letargo, ataxia intermitente y retardo mental.

CUESTIONARIO


- Haga un esquema del ciclo del nitrógeno y discuta la importancia de los vegetales en la incorporación del nitrógeno a la cadena alimenticia.
- ¿Qué entiende por Recambio de proteínas y Balance Nitrogenado (BN)?
- ¿Qué entiende por aminoácidos esenciales? Nómbralos. ¿Qué relación puede establecer entre los aminoácidos esenciales con el Valor Biológico de las proteínas y su efecto en el Balance Nitrogenado?
- ¿Qué mecanismos de transporte de aminoácidos conoce? ¿Cuál es la importancia del Glutatión?
- Complete el esquema siguiente indicando con flechas las relaciones entre los distintos metabolitos.



- Con respecto al catabolismo de los aminoácidos indique
 - ¿Cuál es el destino de los aminoácidos ingeridos en la dieta?
 - ¿Cuál es la fuente endógena más importante de aminoácidos?
 - ¿Compare la importancia de las transaminasas y de glutamato deshidrogenada.
 - ¿Cuál es el destino del NH_3 producido por desaminación oxidativa?

- e) Con respecto a la glutamina sintetasa y la gluaminasa, indique su importancia y su localización tisular y celular.
7. ¿Qué interpretación se puede dar a los aumentos de las transaminasas en el plasma o suero sanguíneo?
8. ¿Qué relación (es) puede establecer entre el metabolismo de los aminoácidos y el metabolismo de los hidratos de carbono?
9. En el estudio del metabolismo ha sido de gran importancia el uso de isótopos para marcar nutrientes y metabolitos y seguir su camino en las vías metabólicas. Al respecto indique como se explica que
- a) Si a un animal de experimentación se administra una dieta completa adicionada con Alanina – N^{15} , presente ácido glutámico- N^{15} y urea- N^{15} ?
- b) ¿Cómo se explica la marca C^{14} y/o N^{15} en las proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos de un animal que fue alimentado con alanina – C^{14}, N^{15} ?

BIBLIOGRAFÍA

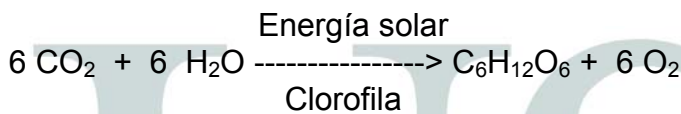
1. Syllabus de Bioquímica General Universidad Santo Tomas , Sesiones 18 y 19.
2. Nelson D.L. y Cox M. M. Principios de Bioquímica de Lehninger, Worth Publishers 3ª Edición 2000, Capítulo 18. (Edición en español de Editorial Omega-Barcelona).
3. Stryer N.V.L. Bioquímica Editorial Reverté 4ª Edición, 1995. Capítulo 25. 

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Seminario 6B: Fotosíntesis

INTRODUCCIÓN

La luz solar es la fuente de energía directa o indirecta que hace posible la vida en la tierra. La fotosíntesis es la conversión de energía luminosa en energía química y de ella dependen todos los sistemas biológicos. Las plantas como organismos autótrofos y fotosintetizadores dependen directamente de la luz solar, en tanto que los animales heterótrofos tienen una dependencia indirecta ya que deben alimentarse de otros organismos vegetales y/o animales. Para los organismos autótrofos basta la energía solar, una fuente de carbono y agua para iniciar los procesos que satisfacen sus necesidades energéticas y de paso sostienen toda la vida en la tierra.



Esta ecuación química general de la fotosíntesis no dice nada respecto del detalle de los procesos ¿Qué papel juega la luz y cuál es la naturaleza de la luz utilizada?, ¿Cómo se sintetizan los compuestos orgánicos?, ¿De donde se origina el oxígeno?, ¿Cómo se transfiere la energía de los fotones a las moléculas orgánicas?, ¿Qué sistemas enzimáticos participan?, etc

El proceso fotosintético ocurre en dos etapas; en una primera etapa dependiente de luz (etapa clara) se produce ATP y coenzimas reducidos (NADPH) y se lleva a cabo en los tilacoides de los cloroplastos. Una segunda etapa que no depende directamente de luz (etapa oscura), utiliza ATP, NADH + H⁺ y CO₂ para producir azúcar y se realiza en el estroma del cloroplasto.

Las reacciones de la luz o de la etapa clara, se realizan por 2 fotosistemas, complejos fotosintéticos que realizan transferencia de electrones de alta energía, desde la molécula de agua, para producir ATP (fotofosforilación) y reducir el NADP⁺ a NADPH. Un fotosistema I (P700), asociado a ferredoxina, produce la reducción de NADP⁺ y un fotosistema II (P680), produce la fotólisis del agua. Ambos fotosistemas, están conectados por una cadena transportadora de electrones que contiene plastoquinona (PQ), citocromos (complejo f-b6) y plastocianina (PC).

La fotofosforilación puede ser cíclica y no-cíclica, la fotofosforilación no cíclica genera ATP y NADPH y utiliza ambos fotosistemas, en tanto que la fotofosforilación cíclica produce ATP solamente y no produce liberación de O₂.

La síntesis de ATP se explica por la teoría quimiosmótica en forma similar a la síntesis de ATP mitocondrial.

La etapa oscura o ciclo de Calvin-Benson utiliza ATP y NADPH para fijar CO₂ en moléculas orgánicas, siendo la Ribulosa-biP el aceptor de CO₂ y el 3-P-Glicerato el intermediario estable. La ribulosa-bi P- carboxilasa (Rubisco), enzima

El usuario solo podrá utilizar la información entregada para su uso personal y no comercial y, en consecuencia, le queda prohibido ceder, comercializar y/o utilizar la información para fines NO académicos. La Universidad conservará en el más amplio sentido la propiedad de la información contenida. Cualquier reproducción de parte o totalidad de la información, por cualquier medio, existirá la obligación de citar que su fuente es "Universidad Santo Tomás" con indicación La Universidad se reserva el derecho a cambiar estos términos y condiciones de la información en cualquier momento. 38

universalmente presente en organismos fotosintetizadores, es la proteína más abundante en la biosfera y cataliza la incorporación de CO_2 a la ribulosa-biP. La rubisco también actúa como oxidasa catalizando la reacción de la Ribulosa-biP con O_2 , reacción conocida como fotorrespiración y que interfiere con la fotosíntesis. Las plantas desarrollaron sistemas que contrarrestan la fotorrespiración, como son las plantas C_4 y las plantas CAM.

CUESTIONARIO

1. Dibuje un esquema del cloroplasto tal como se aprecia al microscopio electrónico. Anote el nombre de todas sus partes e indíquelas con una flecha.
2. Con respecto al punto anterior elabore un cuadro indicando la función de cada una de las partes del cloroplasto
3. ¿Cuál es el origen de los cloroplastos? Refiérase al origen evolutivo y su formación en la célula. Discuta al respecto la importancia de la presencia de ADN.
4. ¿Qué entiende por el esquema Z? Constrúyalo y explique como funciona.
5. Con respecto al esquema anterior indique:
 - a) ¿Qué entiende por los fotosistemas I y II? Indique su función.
 - b) ¿Qué entiende por fotofosforilación y que efecto tiene en ella el bloqueo del fotosistema I y la ausencia total de NADP^+ ?
 - c) ¿Cómo se explica el transporte de electrones entre ambos fotosistemas y que importancia tiene en la fotofosforilación?
6. ¿Qué entiende por ciclo de Calvin –Benson?, ¿Cuál es su importancia y que relación tiene con los fotosistemas?
7. Con respecto a la fijación de CO_2 indique
 - a) ¿Cuál es la molécula aceptora de CO_2 ?
 - b) ¿Qué papel juega la rubisco en este proceso?
 - c) ¿Cuales son los principales intermediarios y los productos finales?
8.
 - a) ¿Qué entiende por fotorrespiración y que consecuencias tiene para la fotosíntesis?
 - b) Indique los diferentes mecanismos de fijación de CO_2 de las plantas, indicando ventajas y desventajas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Syllabus de Bioquímica General, Universidad Santo Tomás, Sesión 11.
2. Purves y otros. Life: The Science of Biology, Sinauer- Freeman Edits. 5ª Edition, Chapter 8

3. Nelson, D.L. y Cox, M.M., Principios de Bioquímica de Lehninger, Edit. Omega, 2ª Edición, 1993. Capítulo 18 (capítulo 19 de la 3ª Edición)
4. Govindjee y Coleman, ¿How plants make oxygen? Scientific American , Feb. 1990.
5. Sommerville C.R. et S.C. Les photosynthèses des plantes. La recherche . Vol 15, N° 154, Avril 1984.

Nota: De las revistas Scientific American y la Recherche existen ediciones en Castellano.



Seminarios 7 y 8: Estructura y Función de los Ácidos Nucleicos

INTRODUCCIÓN

Los ácidos nucleicos son macromoléculas formadas por polímeros de nucleótidos, los que están formados por una pentosa, una base nitrogenada (púrica o pirimídica) y un grupo fosfato. Existen 2 tipos de ácidos nucleicos, el ADN formado por desoxirribonucleótidos y que es la molécula portadora de los genes y el ARN formado por ribonucleótidos, a cargo de la síntesis de proteínas.

Los desoxirribonucleótidos contienen el azúcar desoxirribosa, las bases púricas adenina y guanina, las bases pirimídicas citosina y timina y el grupo fosfato. Los ribonucleótidos se diferencian en el azúcar ribosa y en que poseen uracilo en lugar de timina. Los nucleótidos se unen por enlaces fosfodiéster formando cadenas de ADN o de ARN.

El ADN se presenta como una molécula de doble hélice, cuyas hebras complementarias y antiparalelas se unen a través de puentes de hidrógeno entre las bases A – T y C – G, de manera que las relaciones A/T y C/G son siempre igual a 1 en todas las moléculas de ADN. La cantidad de pares de A – T y C – G son variables y propios de cada especie.

Las principales fuerzas estabilizadoras de la doble hélice son fuerzas hidrofóbicas entre las bases nitrogenadas en el centro de la doble hélice. Existen 3 tipos de ADN, el ADN A y el ADN B formados por doble hélices enrolladas a la derecha y el ADN Z formado por una doble hélice enrollada a la izquierda.

El ADN fisiológico (funcional o activo) sería el ADN B, en tanto que el ADN Z sería no funcional o inactivo. Los ADN B y Z son interconvertibles lo que tiene importantes implicancias en regulación génica. El ARN en cambio está usualmente formado por una hebra simple, aunque puede presentar zonas de doble hebra.

La función de los ácidos nucleicos se puede representar por el llamado dogma central de la biología, que muestra el flujo de información en la expresión génica.

Replicación Transcripción Traducción

ADN-----> ADN -----> ARN -----> Proteína → **Función**

La replicación del ADN garantiza la transmisión de la información genética entre las generaciones, pero permitiendo algunos cambios o mutaciones que permiten la variabilidad entre los individuos y que a largo plazo hacen posible la evolución.

La replicación del ADN requiere la participación de enzimas (polimerasas, ligasas, nucleasas, helicasas, etc.), además secuencias específicas que actúan como señales de inicio de la replicación. La transcripción a su vez requiere de enzimas particulares y secuencias de inicio y de término de la transcripción, reconocidas por factores que regulan la transcripción. Existen diferencias en la organización del ADN

de eucariontes y procariontes que se reflejan en la regulación de la replicación, transcripción y traducción del material genético.

La síntesis de proteínas realizado por los ácidos ribonucleicos (Ribosomal, Mensajero y de Transferencia) y dirigidos por el código genético, se realiza en los ribosomas con el aporte de aminoácidos, enzimas, factores de regulación y una fuente de energía.

La expresión de los genes es un fenómeno bajo estricta regulación, ejercida a diferentes niveles según la organización del material genético (genoma) en los diferentes organismos, pero básicamente se puede ejercer a nivel de la transcripción y la traducción. También existen mecanismos de regulación postranscripcionales y postraduccionales, los que son particularmente importante en eucariontes.

OBJETIVOS

El desarrollo del presente cuestionario persigue que los alumnos

1. Conozcan las evidencias experimentales que apoyan el papel del ADN como material genético, su estructura molecular y su mecanismo de replicación
2. Analicen la composición química y las características moleculares del ADN y del ARN
3. Revisen los mecanismos de replicación enzimática del ADN y su relación con fenómenos de mutación y reparación del ADN
4. Conozcan el papel del ADN y del ARN en la expresión de los genes a través de la revisión y análisis de los procesos de transcripción y traducción génica.
5. Comprendan los mecanismos que regulan la expresión de los genes en la síntesis de moléculas específicas de proteínas

CUESTIONARIO

1. ¿Qué consideraciones apoyan el papel del ADN como material hereditario?
2. Indique una evidencia experimental que demuestra el papel del ADN como material hereditario?
3. En relación a la composición química del ADN indique que entiende por:
 - a) Nucleosido
 - b) Nucleotido,
 - c) Indices de Chargaff,
 - d) Efecto hipercrómico,

- e) Hebras antiparalelas
 - f) Enlaces N-glicosídico y fosfodiéster
 - g) Replicación semiconservativa
4. Compare la composición química del ADN y el ARN ¿Qué características presenta la estructura de doble hélice del ADN y que factores determinan esta estructura?
 5. ¿Qué evidencias experimentales demuestran un mecanismo de replicación semiconservativo del ADN en procariontes y eucariontes?
 6. ¿Qué requerimientos presenta la la autoreplicación del ADN?
 7. ¿Cómo se explica la replicación bidireccional y simultánea de las dos hebras del DN, si la ADN polimerasa sintetiza sólo en sentido 5' → 3' ?
 8. ¿Cómo se explica que la duplicación de todo el ADN celular humano dure sólo horas (+ o - 10 hrs.), si por su velocidad de síntesis (aprox. 2000 p.b./min) debería tomar alrededor de 3 años?
 9. ¿Qué tipo de mutaciones debe sufrir el ADN y cuales son sus consecuencias genéticas?
 10. Indique que evidencias apoyan la expresión genética a través del control de la síntesis de las proteínas
 11. Compare los procesos de replicación y transcripción del ADN.
 12. ¿Qué diferencias y semejanzas puede establecer en los procesos de transcripción de procariontes y eucariontes?
 13. ¿En que consiste el procesamiento del ARN transcrito primario hasta ARNm maduro?
 14. Responda las siguientes preguntas
 - a) Qué entiende por: codón, anticodón, triplete sin sentido, codón de inicio
 - b) ¿Cuáles son las características del código genético?
 - c) A la luz de la información actual se puede seguir manteniendo que el código genético es universal?
 - d) ¿Qué significa que el código genético sea degenerado? y ¿cuál sería a su juicio la importancia genética de esta característica del código genético?
 - e) ¿Qué importancia genética tiene la hipótesis del "balanceo" en la lectura del codón por el anticodón?

15. La siguiente secuencia de bases corresponde al segmento de la hebra de ADN que codifica el nonapéptido oxitocina.

I II III

5'..... ACAATAAATTTGATTACAAGGACGACC..... 3'

- a) Escriba la secuencia del ARNm correspondiente
 - b) Utilizando el código genético adjunto determine la secuencia de aminoácidos de la oxitocina.
 - c) Explique que efecto tendría en la síntesis del péptido una mutación
 - i.- de transición de bases en I
 - ii.- por transversión de bases en II
 - iii.- por delección de una citosina en III. Considere el antiparalelismo de los ácidos nucleicos, el orden de las bases en el codón y el sentido de lectura de la traducción.
16. Indique el papel que juegan en la síntesis de proteínas los ARN mensajero, ribosomal y de transferencia.
17. Qué entiende por aminoacil –ARNt sintetasa y cual es su importancia en el proceso de síntesis proteica?
18. Los antibióticos han sido de gran importancia en el estudio de la expresión génica y la aplicación terapéutica de ellos requiere conocer su mecanismo de acción y la sensibilidad del patógeno (antibiograma). Al respecto indique cómo actúan los siguientes antibioticos:
- a) Puromicina,
 - b) Eritromicina,
 - c) Tetraciclina,
 - d) Cloramfenicol,
 - e) Estreptomina,
 - f) Cicloheximida,
 - g) Acido fusídico.
19. Compare los mecanismos generales de regulación de la expresión génica de procariontes y eucariontes.
20. Indique que entiende por: Modelo operon, gen regulador, gen estructural, enzima inducible, inductor, represor, regulación positiva, regulación negativa, regulación posttranscripcional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Syllabus de Bioquímica Sesiones 22 a 27
2. Bioquímica de Lehninger 2ª Edición Cap 9, 24, 26, 27 y 28
3. Bioquímica de Harper Murray y otros, 22ª Edición Cap. 37 a 41