

MÓDULO DE BIOQUÍMICA

MATERIAL
GERARDO PÉREZ
YOLANDA NAVARRO
EN
REVISIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

BOGOTÁ, SEPTIEMBRE 30 DE 2005

RECONOCIMIENTOS

Primero que todo, hay que hacer los reconocimientos que se tienen en cuenta para la elaboración del presente módulo. En la Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería se trazó como una forma de trabajo en la elaboración de los nuevos módulos el que los docentes nos basáramos en el trabajo previo que se tenía elaborado. Es así como me correspondió trabajar sobre el Módulo de Bioquímica de Gerardo Pérez y Yolanda Navarro.

Rubén Darío Múnera Tangarife

MATERIAL
EN
REVISIÓN

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN.....	11
UNIDAD 1: BIOMOLÉCULAS	13
CAPITULO 1: AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS	13
Objetivos	13
Autoevaluación No 1	14
1 Aminoácidos: clasificación y propiedades	15
2 Péptidos	20
Actividad 1.....	25
Autoevaluación No. 2	26
CAPITULO 2: PROTEINAS	28
Objetivos	28
Autoevaluación No. 3	28
1 Niveles estructurales	29
2 Clasificación	41
Actividad 2.....	44
Autoevaluación No. 4	45
CAPITULO 3: ENZIMAS	47
Objetivos	47
Autoevaluación No. 5	48
1 Características de la acción enzimática	49
2 Clasificación y nomenclatura.....	51
3 Cinética enzimática	52
4 Actividad enzimática.....	58
5 Factores que influyen en la actividad enzimática	58
5.1 pH.....	58
6 Inhibición.....	60
7 Sitios activos de algunas enzimas	65
Actividad 3.....	69
Autoevaluación No. 6	71
Lecturas recomendadas.....	72
UNIDAD 2: ÁCIDOS NUCLÉICOS Y BIOENERGÉTICA	73
CAPÍTULO 1: ÁCIDOS NUCLEICOS	73
Objetivos	73
Autoevaluación No. 7	74
1 Características generales y clases.....	75
2 Estructura de bases, nucleósidos y nucleótidos.....	75
3 Estructura del DNA.....	79
3.1 Estructura Primaria.....	79
4 Complejidad y estructura supramacromolecular del DNA en el genoma	84
5 RNA: Clasificación	85
6 Estructura del RNA.....	86
Actividad 4.....	89

Autoevaluación No. 8	90
Lecturas Recomendadas	91
CAPITULO 2: INTRODUCCION AL METABOLISMO Y BIOENERGETICA.....	92
Objetivos	92
Autoevaluación No. 9	93
1 Aspectos generales del metabolismo.....	93
2 Bioenergética	95
3 Energía libre de hidrólisis y potencial de transferencia de grupos fosfato... 99	
4 Importancia del ATP	101
Actividad 5.....	103
Autoevaluación No. 10	103
Lecturas recomendadas.....	104
UNIDAD 3: CATABOLISMO, BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO	105
CAPITULO 1: CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	105
Objetivos	105
Autoevaluación No. 11	106
INTRODUCCIÓN	107
1 Glicólisis.....	107
2 Ciclo de Krebs.....	113
3 Fosforilación oxidativa.....	120
4 Vía del glicerol fosfato	128
5 Balance global de la oxidación de glucosa.....	129
6 Vía de las pentosas fosfatos	130
Actividad 6.....	133
Autoevaluación No. 12	134
Lecturas recomendadas.....	135
CAPITULO 2: BIOSÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS	136
Objetivos	136
Autoevaluación No. 13.....	137
INTRODUCCIÓN	138
1 Principios organizativos.....	138
2 Gluconeogénesis	139
3 Fotosíntesis.....	143
4 Biosíntesis de polisacáridos	151
Actividad 7.....	152
Autoevaluación No. 14	153
Lecturas recomendadas.....	154
CAPITULO 3: METABOLISMO DE LIPIDOS.....	155
Objetivos	155
Autoevaluación No. 15	156
1 Catabolismo de lípidos.....	157
1.1 Catabolismo de triglicéridos	157
2 Biosíntesis de lípidos.....	173
Actividad 8.....	182
Autoevaluación No. 16	184

CAPITULO 4: METABOLISMO DE AMINOACIDOS	185
Objetivos	185
Autoevaluación No.17	186
INTRODUCCIÓN	187
1 Catabolismo	187
1.1 Catabolismo de los grupos α -NH ₂ y α -COO ⁻	188
1.2 Catabolismo del esqueleto carbonado	190
1.3 Eliminación del NH ₄	191
2 Biosíntesis.....	196
Actividad 9.....	200
Autoevaluación No. 18	200
Lecturas recomendadas.....	201
INFORMACIÓN DE RETORNO	202
Autoevaluación No. 1	202
Autoevaluación No.2	202
Autoevaluación No. 3	203
Autoevaluación No. 4	204
Autoevaluación No.5	204
Autoevaluación No.6	204
Autoevaluación No. 7	205
Autoevaluación No. 8	205
Autoevaluación No. 9	205
Autoevaluación No. 10	206
Autoevaluación No. 11	206
Autoevaluación No. 12	206
Autoevaluación No. 13	207
Autoevaluación No. 14	209
Autoevaluación No. 15	210
Autoevaluación No. 16	210
Autoevaluación No. 17	210
Autoevaluación No. 18	211
GUÍAS PARA PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.....	212
INTRODUCCIÓN.....	212
PRÁCTICA No. 1: Fraccionamiento de tejidos en sus principales constituyentes: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos	213
Objetivos	213
1 Fundamento teórico	213
2 Reactivos	214
3 Procedimiento	214
4 Expresión de resultados.....	215
Cuestionario	215
PRÁCTICA No. 2: Caracterización de las fracciones obtenidas a partir de diferentes tejidos.....	217
Objetivo	217
1 Fundamento teórico	217

2 Reactivos	220
3 Procedimiento	221
4 Expresión de resultados	223
Cuestionario	223
PRÁCTICA No. 3: Extracción de la yema de lípidos del huevo	224
Objetivo	224
1 Fundamento teórico	224
2 Reactivos	224
3. Procedimiento	224
4 Expresión de resultados	227
Cuestionario	227
PRÁCTICA No. 4: Hidrólisis de polisacáridos	228
Objetivo	228
1 Fundamento teórico	228
2 Reactivos	229
3 Procedimiento	229
Cuestionario	231
PRÁCTICA No. 5: Fraccionamiento de proteínas en semillas de leguminosas y cereales por solubilidad	233
Objetivos	233
1 Fundamento teórico	233
2 Reactivos	235
3 Procedimiento	235
4 Cálculos y resultados	237
Cuestionario	238
PRÁCTICA No.6: Determinación cuantitativa de proteínas en harinas de leguminosas y cereales por el método de Micro Kjeldahl	239
Objetivo	239
1 Fundamentos teóricos	239
2 Reactivos	240
3 Procedimiento	240
4 Expresión de resultados	243
Cuestionario	243
PRÁCTICA No. 7: Estudio cinético de la ureasa	244
Objetivos	244
1 Fundamento teórico	244
2 Reactivos	245
3 Procedimiento	245
Cuestionario	250
PRÁCTICA No. 8: Determinación de vitamina C en frutas y verduras	251
Objetivo	251
1 Fundamento teórico	251
2 Reactivos	252
3 Procedimiento	252
4 Expresión de resultados	253

PRÁCTICA No. 9: Determinación de actividad de inhibidores de tripsina en leguminosas.....	255
Objetivos	255
1 Fundamento teórico	255
2 Reactivos	256
3 Procedimiento	256
4 Resultados	257
Cuestionario	257
GLOSARIO.....	259
BIBLIOGRAFÍA	264

MATERIAL EN REVISIÓN

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Curva de titulación de un aminoácido con grupo R no cargado	16
Figura 2: Curva de titulación del Glu	18
Figura 3: Representación coplanar del enlace peptídico.....	20
Figura 4: Secuencia de AA de la insulina bovina	30
Figura 5: Esquema simplificado de la insulina.....	31
Figura 6: Puentes de hidrógeno en un polipéptido con estructura extendida.....	32
Figura 7: Estructura en hoja plegada	34
Figura 8: Empaquetamiento de grupos R en la fibroina	35
Figura 9: Estructura de α -hélice	36
Figura 10: Estructura simplificada del tropocolágeno.....	37
Figura 11: Tipos de enlaces que mantienen la estructura terciaria de las proteínas	38
Figura 12: Estructura del grupo heme	40
Figura 13: Estructura cuaternaria de la hemoglobina.....	40
Figura 14: Solubilidad de las proteínas en función de la fuerza iónica.....	43
Figura 15: Velocidad de transformación del sustrato en función de S.....	53
Figura 16: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.....	55
Figura 17: Representación gráfica según Lineweaver-Burk de v vs [S]	56
Figura 18: Representación gráfica según Eadie-Hofstee de v vs [S]	57
Figura 19: Ejemplos de actividad de algunas enzimas en función del pH.....	59
Figura 20: Catálisis enzimática inhibida competitivamente	61
Figura 21: Representación según Lineweaver-Burk de la inhibición competitiva ..	62
Figura 22: Cinética de una enzima inhibida no competitivamente.....	63
Figura 23: Representación según Lineweaver-Burk de la inhibición no competitiva	64
Figura 24: Representación de la inhibición incompetitiva.....	64
Figura 25: Sistema "relay" Ser, His, Asp en quimotripsina	66
Figura 26: Sitio activo de la carboxipeptidasa A.....	67
Figura 27: Sitio activo de la lisozima	69
Figura 28: Estructura fundamental de un segmento de una cadena de DNA	80
Figura 29: Asociación de las bases complementarias en el DNA	83
Figura 30: Estructura en doble hélice del DNA.....	84
Figura 31: Estructura fundamental de un segmento de RNA	87
Figura 32: Estructura general en hoja de trebol de t-RNA.....	88
Figura 33: Estructura terciaria del t-RNA para Phe	89

Figura 34: Ciclo global del C yO en la blósfera	95
Figura 35: Ciclo global del N en la biósfera	96
Figura 36: Flujo de la energía en el mundo biológico.....	96
Figura 37: Flujo de grupos y situación Intermedia del ATP.....	102
Figura 38: Carbohidratos proveedores de las hexosas que nutren la glicólisis ...	109
Figura 39: Esquema de la vía glicolítica	110
Figura 40: Papel del NAD en las reacciones de óxido-reducción.....	112
Figura 41: Oxidación del piruvato en acetato por acción del complejo de la piruvato deshidrogenada.....	115
Figura 42: Esquema del ciclo de Krebs	117
Figura 43: Estructura y modo de acción de la Flavinadenin dinucleótido (FAD) .	118
Figura 44: Fosforilación oxidativa en mitocondrias.....	125
Figura 45: Fosforilación oxidativa en procariotes	126
Figura 46: Esquema de la vía del glicerol-fosfato.....	128
Figura 47: Vía de las pentosas fosfato	131
Figura 48: Secuencias de las reacciones de la gluconeogénesis	140
Figura 49: Esquema del ciclo del glioxilato	142
Figura 50: Esquema de un cloroplasto	144
Figura 51: Estructura de clorofilas y carotenos	145
Figura 52: Etapa luminosa de la fotosíntesis.....	147
Figura 53: Esquema de la etapa oscura de la fotosíntesis.....	149
Figura 54: Esquema de la β -oxidación de ácidos grasos saturados	163
Figura 55: Esquema de β -oxidación de ácidos grasos ramificados	167
Figura 56: Productos resultantes de la degradación de la Lecitina por fosfolipasas	170
Figura 57: Estructura del colesterol.....	171
Figura 58: Principales productos del catabolismo del colesterol	172
Figura 59: Transporte de Acetil-CoA mitocondrial al citoplasma	174
Figura 60: Esquema de las reacciones de biosíntesis de ácidos grasos	178
Figura 61: Esquema de la biosíntesis de triglicéridos y fosfoglicéridos.....	181
Figura 62: Principales intermediarios en la biosíntesis del colesterol.....	182
Figura 63: Convergencia de los esqueletos carbonados de los AA al ciclo de Krebs.....	191
Figura 64: Ciclo de la Urea.....	195
Figura 65: Biosíntesis de Thr y Met.....	198

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Aminoácidos hidrofóbicos.....	15
Tabla 2: Aminoácidos polares no cargados	15
Tabla 3: Aminoácidos ácidos.....	16
Tabla 4: Aminoácidos básicos.....	16
Tabla 5: Estructuras de la Ala en función del pH.....	17
Tabla 6: Relación entre el pH y la estructura del Glu	19
Tabla 7: Valores de pK _a de los grupos de algunos AA.....	26
Tabla 8: pK del grupo de la His	26
Tabla 9: Acción de algunas enzimas sobre la amilopectina.	51
Tabla 10: Clases principales de enzimas.....	52
Tabla 11: Subclases de hidrolasas.....	52
Tabla 12: Sub-subclases de las proteasas.....	52
Tabla 13: Diferencias entre DNA y RNA	76
Tabla 14: Valores de $\Delta G_0'$ de hidrólisis y de Potencial de Transferencia de Grupos PTG para algunos metabolitos fosforados	100
Tabla 15: Potenciales de reducción estándar de algunos metabolitos y transportadores de la cadena de electrones	121
Tabla 16: Algunas propiedades fisicoquímicas de los citocromos de la fosforilación oxidativa	122
Tabla 17: Organismos fotosintéticos	144
Tabla 18: Precursores usados en la biosíntesis de polisacáridos	151
Tabla 19: Clasificación de los AA esenciales o no, en humanos.....	197

INTRODUCCIÓN

La bioquímica es una ciencia que comenzó a emerger desde comienzos del siglo pasado. Es frecuentemente descrita como el estudio de la química de la vida e incluye el estudio de todas las formas de vida y utiliza los conceptos básicos derivados de la biología, química, física y matemáticas.

Con este módulo se pretende que el estudiante se prepare en los conocimientos básicos acerca de las biomoléculas y su metabolismo a través de la comprensión de las interacciones entre ellas, reconozca los aminoácidos como unidades estructurales de las proteínas, identifique las bases conceptuales básicas a través del estudio sistemático de nociones, conceptos y problemáticas que configuran el campo general de la bioquímica y que fortalezca los conocimientos adquiridos a través de las diferentes prácticas de laboratorio que se van a realizar.

Se espera que después de estudiar este módulo el estudiante analice adecuadamente las vías metabólicas más importantes con referencia a su importancia relativa en el conjunto del metabolismo y las correlaciona con otras vías; distingue las transformaciones sufridas por los nutrientes como resultado de la acción de agentes físicos, químicos o biológicos.

En vista de la importancia de este curso academizo y teniendo en cuenta que algunos estudiantes que ingresan a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD, son personas que generalmente han dejado pasar un tiempo después que terminaron sus estudios secundarios para luego ingresar a la universidad, se ha diseñado un texto con la didáctica necesaria para que sus contenidos sean aprendidos teniendo en cuenta los fundamentos básicos del aprendizaje autónomo.

Las unidades didácticas que conforman el curso son: 1) Biomoléculas: aminoácidos, péptidos, proteínas, glúcidos, lípidos, enzimas y vitaminas; 2) Ácidos nucleicos, hormonas, minerales y metabolismo; 3) Bioquímica de líquidos y tejidos. Metabolismo de las glándulas mamarias, semen y rumen.

El trabajo académico consta de dos componentes a saber: el estudio Independiente, el cual puede ser realizado en trabajos a nivel personal y el trabajo en pequeños grupos colaborativos que son los espacios donde se inicia el verdadero autoaprendizaje; el segundo componente es el acompañamiento tutorial, donde se desarrollan tutorías a nivel individual, en pequeños grupos colaborativos o a nivel de grupo de curso.

La Bioquímica es, comparativamente con otras áreas del conocimiento, una disciplina científica joven, que integra múltiples conceptos de la Física, la Química y la Biología en un cuerpo coherente de generalizaciones que permiten comprender cómo operan los organismos vivos. Sus puntos de contacto con otras áreas son múltiples y no siempre es fácil establecer las fronteras respectivas.

La comprensión de las propiedades estructurales y funcionales de las principales moléculas que intervienen como constituyentes de los alimentos y del papel que ellas juegan en el metabolismo, nos proporciona criterios para juzgar el valor nutritivo de un alimento de uso común o de una fuente nutricional potencialmente utilizable.

Desde el punto de vista tecnológico, los conceptos bioquímicos son claves para una correcta interpretación y una predicción acertada de las transformaciones sufridas por los nutrientes como resultado de agentes físicos, químicos y biológicos. Estos puntos justifican de por sí la necesidad de disponer de un bagaje bioquímico mínimo.

Para facilitar la comprensión e ir profundizando gradualmente, se ha adoptado la estrategia de discutir en los capítulos iniciales las características estructurales y el comportamiento de las macromoléculas biológicas.

Para finalizar esta introducción quisiera dirigir un comentario a los estudiantes que usarán este módulo. La complejidad aparente de la Bioquímica se reduce considerablemente cuando en su estudio se comparan sistemáticamente las vías biosintéticas con las degradativas, se aplican los principios generales del metabolismo y se tienen en mente los puntos ya mencionados en el enfoque global. Es mejor hacer énfasis en las transformaciones generales y no en la secuencia detallada de reacciones; poco a poco ésta se irá incorporando a sus conocimientos. ¡Buen trabajo y mucho ánimo!

UNIDAD 1: BIOMOLÉCULAS

CAPITULO 1: AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS

Objetivos

- Diferenciar los tipos de aminoácidos existentes, tomando como base la naturaleza de sus cadenas laterales.
- Establecer las relaciones existentes entre las curvas de titulación de los aminoácidos y sus valores de PKa y pl.
- Describir las características del enlace peptídico.
- Reconocer los tipos de rupturas que pueden sufrir los péptidos.
- Analizar el comportamiento anfótero de los péptidos en términos de su composición en aminoácidos.
- Identificar las principales actividades biológicas de los péptidos.
- Reconocer la correlación entre la estructura y la función de los péptidos.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No 1

1. Ilustre la estructura general de los aminoácidos que constituyen las proteínas e identifique sus características generales.
2. Establezca la correspondencia entre los términos de la columna de la izquierda y los de la derecha, que pueden ser válidos para un aminoácido. Cada término puede ser usado una vez, varias veces o ninguna vez.
 - a. Glutámico 1. Aminoácido básico
 - b. Valina 2. Aminoácido aromático
 - c. Lisina 3. Aminoácido azufrado
 - d. Aspártico 4. Aminoácido con grupo fenólico
 - e. Triptófano 5. Aminoácido ácido
 - f. Metionina 6. Aminoácido neutro
 - g. Arginina 7. Aminoácido con grupo imidazol.
3. Explique en qué consiste el carácter anfótero de los aminoácidos.
4. Explique cómo se forma un enlace peptídico.
5. Relacione los términos correspondientes:
 - a. Ala - Gly - Val - Asp 1. Dipéptido
 - b. Trp - Lys 2. Tetrapéptido
 - c. His - Met - Leu - Gly - Glu 3. Tripéptido
 - d. Arg - Arg - Ser 4. Pentapéptido

MATERIAL
EN
REVISIÓN

1 Aminoácidos: clasificación y propiedades

Los aminoácidos (AA) son biomoléculas presentes en todos los seres vivos conocidos, donde intervienen como unidades constituyentes de las proteínas o como intermediarios en diferentes procesos metabólicos, especialmente en aquellos relacionados con la síntesis de otras sustancias. Aquí nos ocuparemos exclusivamente de los aminoácidos proteínicos por ser los más importantes.

La clasificación de los aminoácidos proteínicos se puede hacer teniendo en cuenta la relación de grupos $\text{COO}^-/\text{NH}_3^+$, o considerando criterios que tienen que ver con su polaridad, presencia o no de cargas positivas o negativas; todo lo cual, en último término, depende de la naturaleza de su cadena lateral (o grupo R). Estos criterios serán continuamente utilizados en las siguientes unidades y por ello es importante identificar los diferentes aminoácidos de acuerdo con la siguiente clasificación.

1.1 Aminoácidos no polares o hidrofóbicos

En estos aminoácidos la cadena lateral, alifática o aromática, no tiene grupos que interactúen fácilmente con solventes acuosos y de ahí el nombre de hidrofóbicos. A este grupo pertenecen los siguientes aminoácidos:

Aminoácido	Abreviatura	Aminoácido	Abreviatura
Alanina	Ala	Prolina	Pro
Valina	Val	Fenilalanina	Phe
Leucina	Leu	Triptófano	Trp
Isoleucina	Ile	Metionina	Met

Tabla 1: Aminoácidos hidrofóbicos

1.2 Aminoácidos polares no cargados

A diferencia de los anteriores, estos AA se solubilizan con mayor facilidad en solventes acuosos y su grupo R no posee cargas positivas o negativas a pH fisiológico, es decir, pH cercanos a 6,5 y 7,0. Aquí incluimos los siguientes AA:

Aminoácido	Abreviatura	Aminoácido	Abreviatura
Glicina	Gly	Tirosina	Tyr
Serina	Ser	Asparagina	Asn
Treonina	Thr	Glutamina	Gln
Cisteína	CySH	Hidroxi prolina	OH - Pro
Cistina	CySSCy		

Tabla 2: Aminoácidos polares no cargados

1.3 Aminoácidos ácidos

Se caracterizan porque su grupo R $-(\text{COOH})$ está cargado negativamente a pH fisiológico. Los aminoácidos con sus respectivos pK_a son:

Aminoácido	Abreviatura	pK_a
Aspártico	Asp	3,9
Glutámico	Glu	4,2

Tabla 3: Aminoácidos ácidos

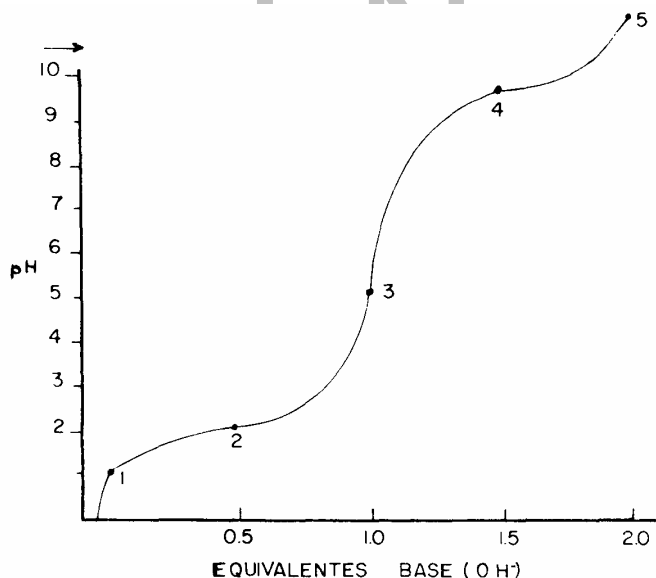
En consecuencia, estos aminoácidos pierden su carga únicamente a pH bastante ácido y en su forma libre o como constituyentes de las proteínas están cargados negativamente.

1.4 Aminoácidos básicos

En ellos, el grupo R (generalmente $-\text{NH}$) está cargado positivamente a pH fisiológico. A este grupo pertenece:

Aminoácido	Abreviatura	pK_a
Histidina	His	6,0
Lisina	Lys	10,5
Arginina	Arg	12,5

Tabla 4: Aminoácidos básicos



1: Corresponde al pK_a de 2,3 (Grupo $\alpha\text{-COOH}$)

2: Corresponde al pK_a de 9,7 (Grupo $\alpha\text{-NH}_2$)

3: Valor de $\text{pI} = 6,0$

Figura 1: Curva de titulación de un aminoácido con grupo R no cargado

El comportamiento anfótero de cada uno de los aminoácidos y sus valores de punto isoeléctrico (pI) son una consecuencia de su estructura particular. Vamos a complementar estos conceptos con el análisis de las curvas de titulación típicas que se obtienen al considerar la disociación sucesiva de los grupos.

Las curvas de titulación para aminoácidos no polares o polares no cargados, se pueden ver en la figura 1.

El AA usado como ejemplo es la Ala, donde los únicos grupos que en un momento dado pueden tener carga, dependiendo del pH de la solución, son el α -COOH y el α -NH₂. La siguiente tabla ilustra la situación que se presenta en cada punto identificado:

Punto	Estructura	Corresponde a
1	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	pH \ll pK ₁
2	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>50%</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>50%</p> </div> </div>	pK ₁ , (α -COOH)
3	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	pI
4	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>50%</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>50%</p> </div> </div>	pK ₂ , (α -NH ₂)
5	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	pH \gg pK ₂

Tabla 5: Estructuras de la Ala en función del pH

Podemos observar que al pH que corresponde al pI, la carga neta del 100% de moléculas es cero (máxima concentración del Zwitterion); a pH inferiores al pI, un cierto porcentaje de moléculas tiene carga neta positiva, siendo mayor a medida que el pH es más ácido y a pH superiores al pI, más y más moléculas están cargadas negativamente mientras más básico es el pH. Notamos además que las zonas en que estos AA tienen capacidad buffer, se sitúan en las cercanías de pK_1 y pK_2 .

Para un aminoácido ácido (Glu en este caso), podemos representar la curva de titulación así:

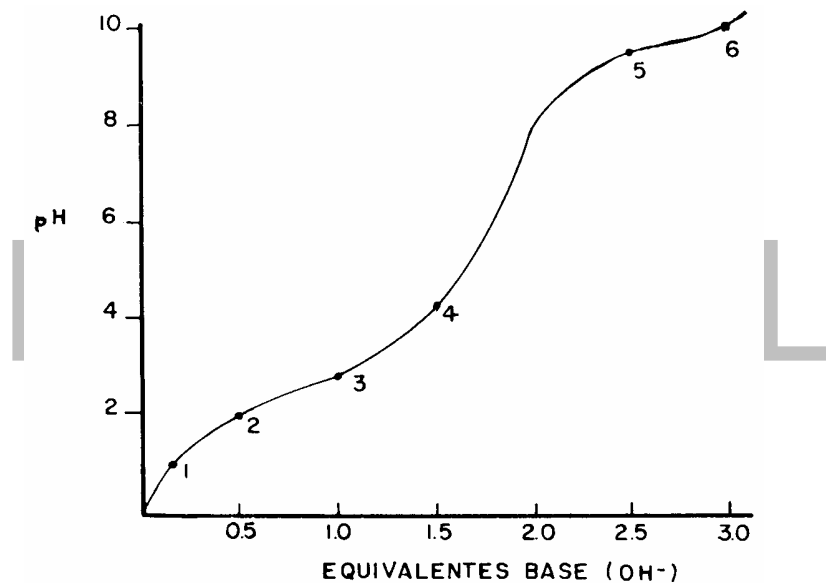


Figura 2: Curva de titulación del Glu

La tabla 6 muestra lo que ocurre en cada uno de los puntos indicados en la figura 2.

Al calcular el pI vemos que es igual a 3.2 (que corresponde al pH del punto 3 en la gráfica), valor que indica que el Glu es un aminoácido ácido pues el pI está muy alejado del rango 6.0 a 7.0; su carga neta a pH superiores a su pI será negativa y a pH inferiores, será positiva. Al comparar su curva de disociación con la de la Ala, vemos que en la región ácida las inflexiones son menos fuertes.

Las curvas de titulación obtenidas para los AA básicos muestran también inflexiones más marcadas, pero están desplazadas hacia pH más altos y su análisis es similar.

Si se conocen los valores de pK de cada grupo y el pI (que se pueden determinar experimentalmente) podemos proceder en forma inversa y representar las curvas de disociación.

Punto	Estructura	Corresponde a
1	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\text{pH} \ll \text{pK}_1$
2	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \\ 50\% \end{array} + \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_a \\ \\ \text{CH}_a \\ \\ \text{COOH} \\ 50\% \end{array}$	$\text{pK}_1, (\alpha\text{-COOH})$
3	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	pI
4	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \\ 50\% \end{array} + \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N} - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \\ 50\% \end{array}$	$\text{pK}_2 = 4.2$ (grupo R)
5	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N} - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \\ 50\% \end{array} + \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \\ 50\% \end{array}$	$\text{pK}_3 = 9.7$ ($\alpha\text{-NH}_2$)
6	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	$\text{pH} \gg \text{pK}_3$

Tabla 6: Relación entre el pH y la estructura del Glu

Las consideraciones anteriores además de que permiten comprender mejor el comportamiento ácido-base de los aminoácidos en solución, estos serán muy útiles para entender las propiedades de polímeros integrados por aminoácidos (péptidos y proteínas).

Los aminoácidos no presentan absorción en la zona del espectro visible por no poseer cromóforos y los únicos que absorben en el ultravioleta son el Trp y la Tyr a 280 nm y la Phe, en menor grado, a 260 nm debido a que sus grupos R son aromáticos. Esta propiedad se aprovecha para detectar aminoácidos, péptidos y proteínas en soluciones en que no haya otras moléculas que absorben a estas longitudes de onda.

2 Péptidos

2.1 Aspectos estructurales

La unión de dos o más AA entre sí a través de enlaces amida da origen a un importante grupo de biomoléculas llamadas péptidos.

El enlace resultante recibe el nombre de enlace peptídico, y debido a la distribución electrónica posee un carácter parcial de doble enlace (alrededor de un 40%); por ello, aunque se represente convencionalmente como un enlace sencillo, goza de dos características muy importantes que siempre deben tenerse en cuenta:

- Todos los átomos que intervienen en el enlace son coplanares, es decir, están situados en el mismo plano. Esta situación la podemos ilustrar en la figura 3.

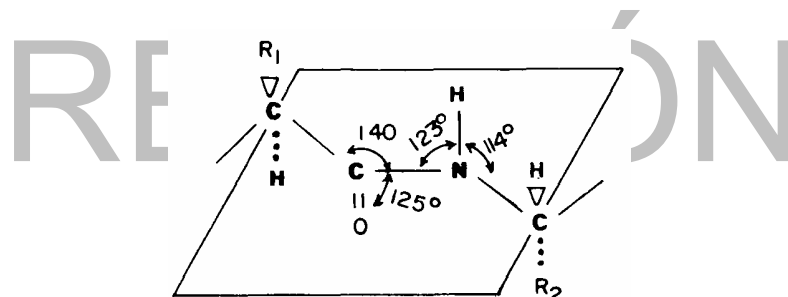


Figura 3: Representación coplanar del enlace peptídico

Observamos que los cuatro átomos (C, O, N, H) que participan en el enlace están localizados en el plano indicado, en cuyos bordes se encuentran los carbonos portadores de las cadenas laterales R₁ y R₂. Como veremos más adelante, esta coplanaridad tiene consecuencias en la determinación de una estructura fundamental de las proteínas.

- Debido al carácter parcial de doble enlace, se establece una isomería geométrica del tipo trans, donde el O y el H (del enlace) están en lados opuestos.

La secuencia se determina combinando rupturas selectivas de los enlaces peptídicos, logrados en condiciones suaves, por medio de agentes específicos que generalmente son enzimas con el establecimiento de los AA-N terminales, C-terminales e intermedios, de los fragmentos resultantes más pequeños.

Para identificar estos AA se puede usar el reactivo de sanger o reactivos que actúan en forma similar como el reactivo de Edman o el Dansilo.

El conocimiento de la estructura de los péptidos permite, además de su caracterización, establecer cuáles AA son determinantes para la función biológica del péptido y, como veremos más adelante, postular una estrecha correlación entre la estructura y la actividad biológica.

2.2 Propiedades ácido-base

El comportamiento ácido-base de cada péptido está determinado por los grupos α -NH₂ y α -COOH (N- y C- terminales respectivamente) y por los grupos R de los AA presentes.

Por ejemplo, en péptidos del grupo de las bradikininas, que poseen una fuerte actividad depresora de la tensión arterial, es frecuente la presencia de aminoácidos básicos lo cual le confiere pH fisiológicos, cargas positivas y un pl relativamente alto. El péptido Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Leu-Pro-Phe-Arg tendrá en estas condiciones cuatro cargas positivas (una por el grupo α -NH₃⁺ y tres por los grupos R de Lys y Arg) y una carga negativa (a causa del -COO- terminal); su pl será cercano al pK_a de la Arg y por consiguiente es un péptido muy básico.

En el caso de los péptidos donde predominan Glu y Asp tendremos la situación inversa (péptidos ácidos, bajo pl).

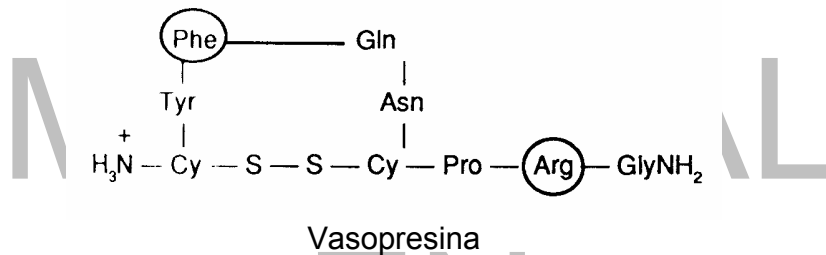
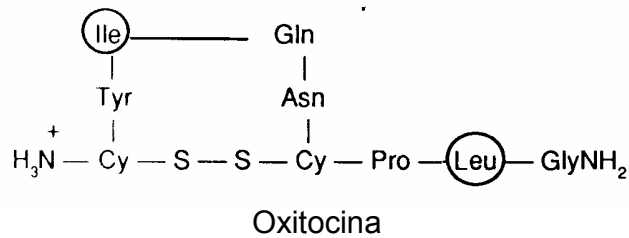
En general los péptidos poseen simultáneamente AA ácidos y básicos y su comportamiento anfótero depende de las proporciones relativas de estos aminoácidos; las curvas de titulación presentan múltiples puntos de inflexión (a diferencia de lo observado con los AA libres) y no es posible calcular el valor de pl considerando los pK_a de los AA y su disociación sucesiva, pues frecuentemente podemos tener a un pH dado más de un grupo R que se esté disociando. La determinación del pl podemos, en estos casos, realizarla por electroforesis.

2.3 Actividad biológica de algunos péptidos

Los péptidos que existen libres en una célula desempeñan en muchos casos una función biológica bien precisa. A continuación examinaremos algunos ejemplos:

2.3.1 Actividad hormonal

En el lóbulo posterior de la hipófisis se produce un cierto número de péptidos con función hormonal. Se destacan: la oxitocina nonapéptido cíclico que estimula la contracción del músculo liso del útero durante el parto y la glándula mamaria en la lactancia; y la vasopresina, otro nonapéptido cíclico que estimula la reabsorción renal del agua y aumenta la presión arterial (acción hipertensora). Estos péptidos tienen las siguientes estructuras:



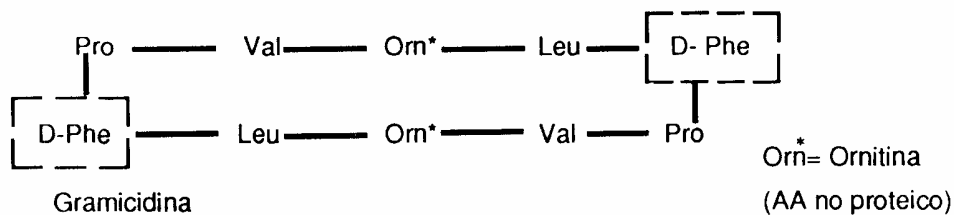
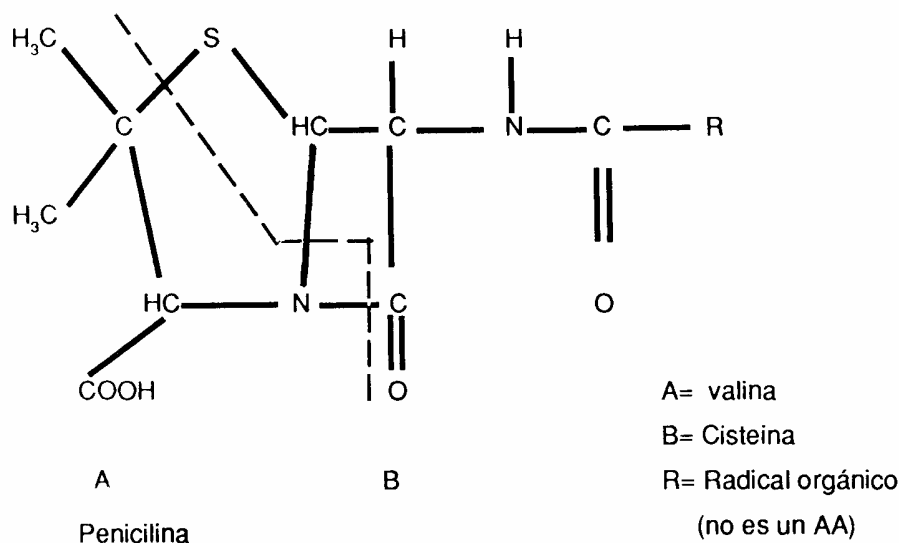
Aquí tenemos un buen ejemplo de la estrecha correlación existente entre estructura y acción biológica ya que las dos hormonas difieren solamente en las posiciones indicadas y a pesar de ello sus funciones biológicas son completamente diferentes.

Cuando en cualquiera de ellas se rompe el enlace -S-S- (disulfuro) entre las dos Cisteínas por una reducción suave, que no altera ningún otro enlace ni AA, se pierde completamente la actividad hormonal. Esto se debe a que por la ruptura ocurren cambios en la conformación de estos péptidos; esto refuerza la decisiva importancia que tiene la estructura sobre la acción biológica.

La hipófisis produce en su lóbulo anterior la hormona adrenocorticotropa (ACTH), péptido constituido por 25 a 34 AA (dependiendo de la especie), que actúa sobre la corteza de las glándulas suprarrenales, quienes participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos.

2.3.2 Actividad como antibióticos

Los péptidos que presentan esta actividad poseen generalmente AA con configuración D o enlaces poco comunes. Entre ellos tenemos:



2.3.3 Actividad hiper o hipotensora

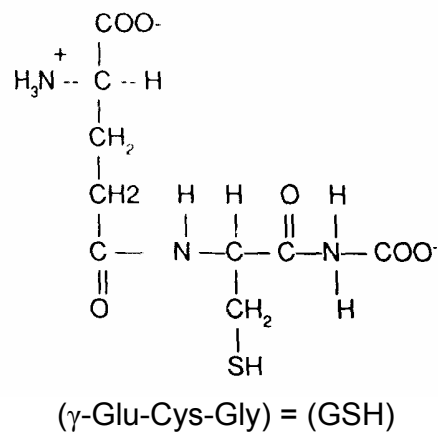
Estos péptidos resultan de la acción de enzimas sobre proteínas del plasma sanguíneo. Las angiotensinas, derivadas del angiotensinógeno, son un grupo de agentes hipertensores estructuralmente relacionados con 8 a 10 AA:

- Angiotensina I:
Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Leu
- Angiotensina II:
Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe

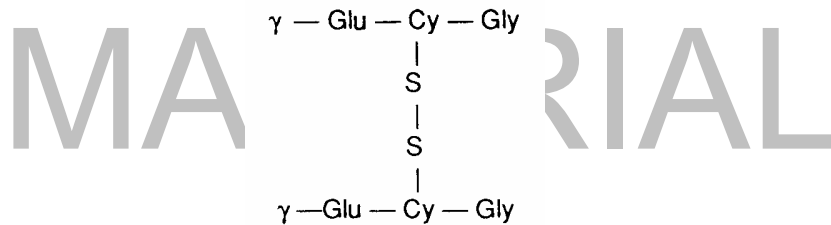
Las bradikinas (ya mencionadas) son péptidos con 9 a 12 AA de fuerte actividad hipotensora y pl elevados.

2.3.4 Actividad oxido reductora

El más abundante es el Glutatión, presente en muchos tejidos, que presenta un enlace no peptídico entre Glu y CySH como lo muestra la estructura:



El grupo SH (tiol) de la Cisteína puede oxidarse y dar lugar al glutatión oxidado (GSSG):



Esta oxidación está acompañada de la reducción de un aceptor (metabolito) que pasa de su forma oxidada a la reducida.

Actividad 1

Construya una tabla con los cuatro tipos de aminoácidos de la siguiente manera:

Nombre	Abreviatura	Estructura	pK _a del grupo R	Tipo

A partir de los valores dados en la tabla 7 represente las curvas de titulación para cada uno de los siguientes aminoácidos. Ubique las zonas con capacidad buffer y calcule el pI para cada uno:

Aminoácido	α -COOH	α -NH ₂	R
His	1,8	9,2	6,0
Arg	2,2	9,0	12,5
Lys	2,2	8,9	10,5
Asp	2,1	9,8	3,9
Ser	2,2	9,1	—
Gly	1,9	9,2	—

Tabla 7: Valores de pK_a de los grupos de algunos AA

Usando los valores de PKa de la tabla 7, calcule los pI de los siguientes péptidos:

- Arg-Gly-Asp-Ser
- Ser-Lys-His

Represente la estructura de cada uno de estos péptidos teniendo en cuenta la naturaleza (o tipo) de cada AA.

Al frente de cada péptido indique su actividad biológica:

- ACTH:
- Gramicidina
- Vasopresina:
- Glutati6n.
- Oxitocina:
- Angiotensina:
- Penicilina:
- Bradikinina:

Autoevaluaci6n No. 2

- Teniendo como criterio la naturaleza qu6mica de sus cadenas laterales, ¿c6mo puede clasificar los aminoácidos? Cite dos ejemplos en cada caso, indicando en los casos pertinentes, los valores de pK de los grupos R.
- Explique a partir de la curva de disociaci6n que puede dibujar a partir de los siguientes datos, porqu6 la His es el 6nico AA con capacidad tamp6n a pH fisiol6gico.

Grupo	pK _a
α -COOH	1.8
α -NH ₂	9.2
R-(imidazol)	6.0

Tabla 8: pK del grupo de la His

- Describa las caracter6sticas del enlace pept6dico.

4. Enuncie los tipos de degradación a que puede ser sometido un péptido, identificando los agentes que los provocan y los métodos de análisis usados en cada caso.
5. Analice el comportamiento ácido-base de los péptidos en términos de su composición en AA.
6. ¿Cuáles son las actividades biológicas que pueden ser desempeñadas por los péptidos? Mencione en cada caso el péptido correspondiente.
7. Establezca, con un ejemplo, la correlación existente entre la estructura y la función biológica de los péptidos.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

CAPITULO 2: PROTEINAS

Objetivos

- Explicar los diferentes niveles de organización estructural de las proteínas.
- Comparar las características de cada uno de los tipos de estructura secundaria.
- Identificar las interacciones que mantienen la estructura terciaria de una proteína.
- Explicar las relaciones existentes entre la estructura y la función de las proteínas usadas como modelo.
- Analizar los efectos de la desnaturalización sobre la actividad biológica de las proteínas

Autoevaluación No. 3

1. ¿Cómo se pueden clasificar las proteínas con base en:
 - a) Su estructura macroscópica.
 - b) Sus productos de hidrólisis.
2. Identifique las clases de estructuras que poseen las proteínas.
3. Describa algunas de las propiedades más importantes de las proteínas.
4. Explique en qué se basan las reacciones de:
 - a) Ninhidrina.
 - b) Biuret.

¿Qué compuestos se determinan con cada una?

1 Niveles estructurales

Se considera que cuando un péptido sobrepasa los 40-50 aminoácidos tenemos una cadena polipeptídica que llamamos proteína. Estos polímeros poseen un considerable grado de complejidad que se expresa en todas las proteínas en por lo menos tres niveles de estructura y en algunas hasta cuatro.

Estructura primaria. Está definida por la composición en AA y su secuencia en la proteína.

Estructura secundaria. Es el ordenamiento espacial de las cadenas polipeptídicas resultante de interacciones por puentes de hidrógeno formados únicamente entre los átomos que intervienen en el enlace peptídico.

Estructura terciaria. Consiste en la distribución espacial de todos los grupos de la proteína, es decir, su conformación tridimensional.

Estructura cuaternaria. Está dada por la asociación reversible de varias cadenas polipeptídicas (monómeros) iguales o diferentes. Este tipo de estructura solo la poseen algunas proteínas.

Debido a la importancia que revisten estos niveles de organización para la comprensión del funcionamiento y propiedades de las proteínas, las discutiremos con algún detalle a continuación.

1.1 Estructura primaria

El alto número de AA que integran una proteína nos da, en forma similar a lo anotado en los péptidos, una enorme variabilidad estructural y para caracterizar una proteína debemos por tanto conocer su composición en AA y el orden en que se encuentran.

La determinación de la composición se logra sometiendo la proteína a una hidrólisis drástica con ácidos o bases (generalmente HCl 6N y Ba(OH)₂ 4N) y analizando cuantitativamente la mezcla de AA libres que resulta. Actualmente esto se logra por medio de un analizador automático de AA que se basa en la separación de los AA por cromatografía de intercambio iónico, haciéndole reaccionar luego con Ninhidrina y determinando por colorimetría a 570 nm su concentración.

Establecer la secuencia es más complejo; la estrategia que se utiliza consiste en romper la proteína por medios químicos o enzimáticos, en un número no muy grande de péptidos, separar por diversos métodos (cromatografía, intercambio iónico, solubilidad, etc). Los péptidos resultantes a cada uno determinarles su secuencia en la forma ya discutida.

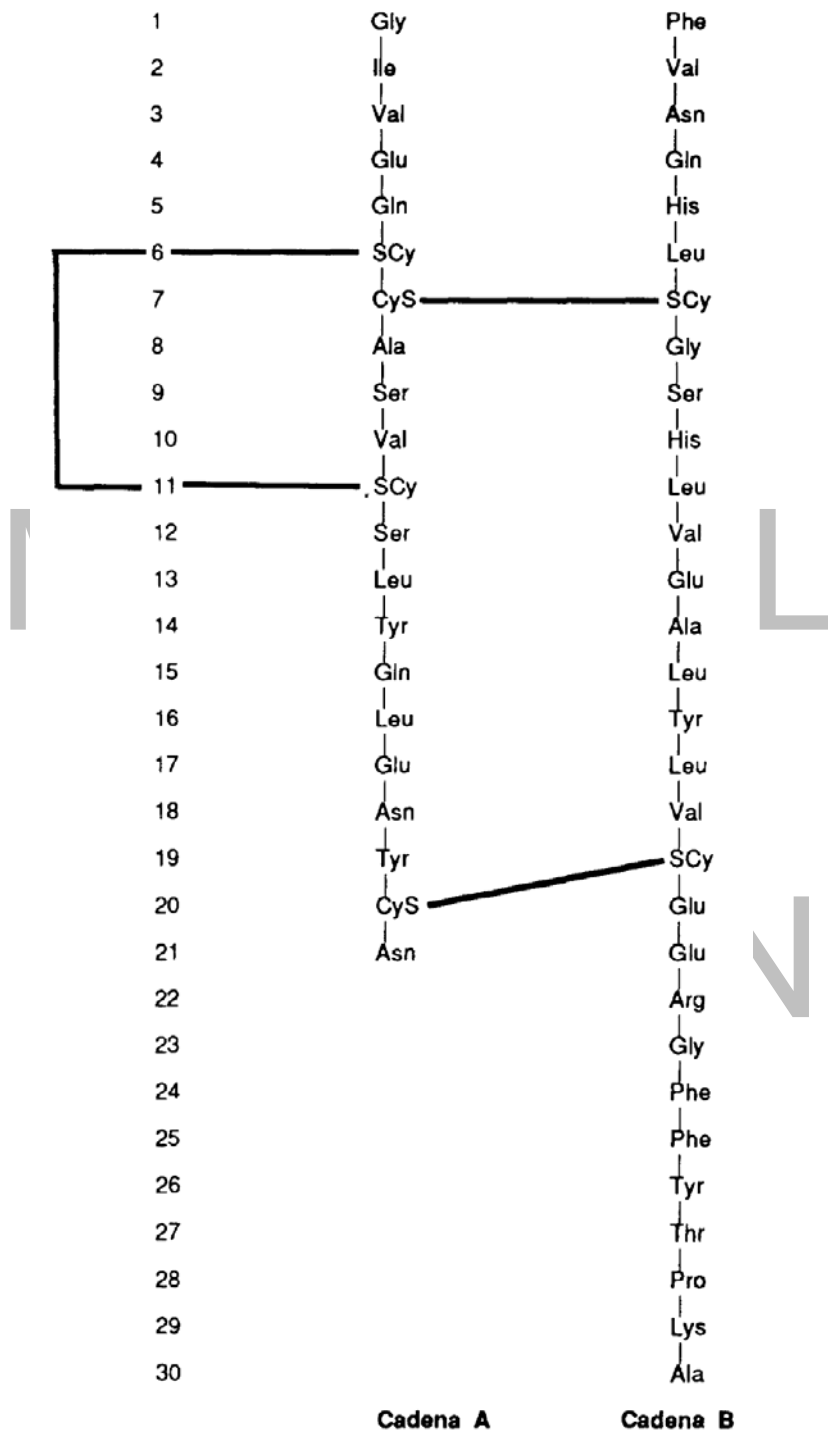


Figura 4: Secuencia de AA de la insulina bovina

Utilizando las combinaciones apropiadas de agentes de clivaje, se pueden ensamblar como en un rompecabezas los péptidos, y obtener la secuencia de la proteína.

La primera proteína a la que se le determinó su estructura primaria fue la insulina, hormona originada en el páncreas como proinsulina, que tiene por función disminuir el nivel de glucosa en la sangre y cuya carencia tiene múltiples complicaciones incluyendo la diabetes. Esta proteína tiene dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por dos puentes de hidrógeno disulfuro intermoleculares formados por la oxidación de cuatro cisteínas.

En la figura 4 representamos esquemáticamente la insulina bovina, sin que lo indicado en los puentes disulfuro intermoleculares e intramoleculares, corresponda a las longitudes relativas y ángulos de unión de los enlaces.

A pesar de ser una de las proteínas más pequeñas es evidente lo incómodo que resulta su representación. Por esta razón se adoptan esquemas simplificados como éste:

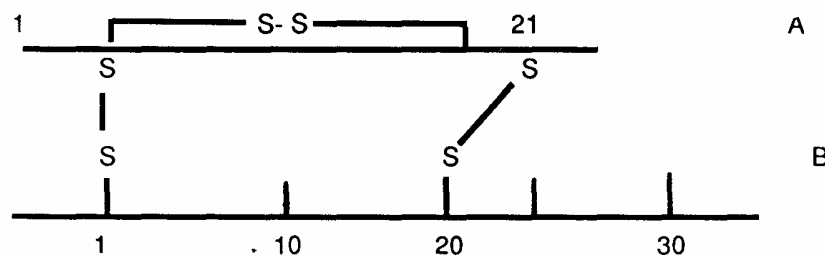


Figura 5: Esquema simplificado de la insulina

En la estructura primaria en detalle observamos que la hormona tiene todos los AA con excepción de Trp, Met, lo cual no es de extrañar pues en total no hay sino 51 AA y las Met y Trp cuando están presentes, sólo se encuentran unos pocos residuos (2 a 3 por cadena de 200 a 300AA).

Una vez que el grupo de Sanger en Inglaterra estableció la metodología para determinar la estructura primaria de proteínas, lo cual le valió el premio Nóbel en 1951, ésta se ha aplicado no solo a insulina de distintos animales sino a un número creciente de proteínas, incluyendo la hemoglobina, citocromo c, ribonucleasa y muchas enzimas.

Los estudios comparativos de secuencia realizados con estas proteínas han permitido:

- Localizar los segmentos donde reside la actividad biológica.
- Realizar estudios sobre la evolución de las proteínas.
- Utilizar en algunos casos proteínas no humanas como sustitutos en el tratamiento de ciertas enfermedades.

- Predecir parcialmente la estructura terciaria de la proteína.
- Diseñar proteínas sintéticas con actividad biológica.

Vemos por consiguiente las insospechadas consecuencias que ha tenido el estudio, aparentemente poco complicado de la estructura primaria de las proteínas.

1.2 Estructura secundaria

En una o varias cadenas polipeptídicas se presentan uniones por puentes de hidrógeno en las que solo intervienen los grupos C=O y N-H que forman el enlace peptídico. Todas las configuraciones existentes o propuestas deben satisfacer las características estructurales que ya discutimos para este tipo de enlaces; la configuración más sencilla es la de cadena extendida, figura 6.

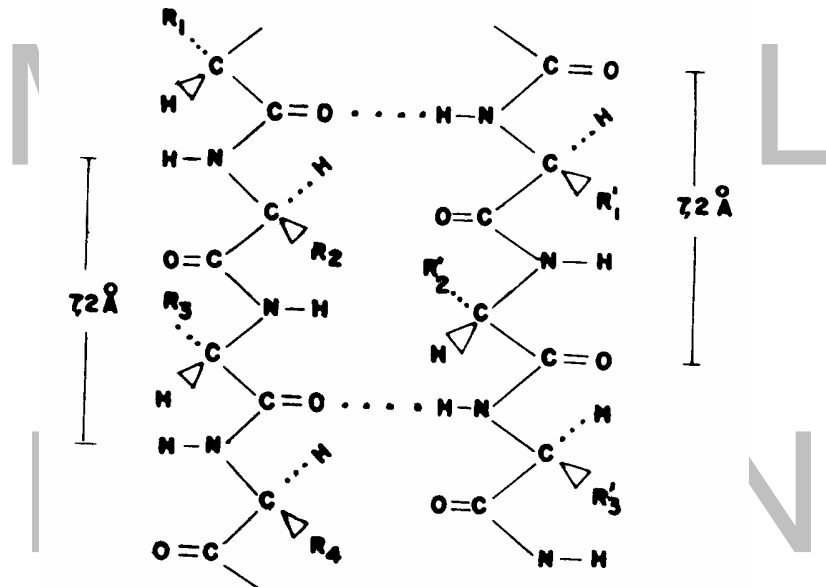


Figura 6: Puentes de hidrógeno en un polipéptido con estructura extendida

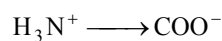
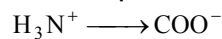
En esta configuración la disposición espacial de los grupos se repite cada 7.2 Å, lo que constituye su distancia en la unidad de repetición e incluye un puente de hidrógeno por cada par de cadenas.

Si se observa con detenimiento la estructura vemos que en una cadena dada los grupos laterales R₁ y R₃ están localizados del mismo lado (hacia atrás, en este ejemplo) y puesto que con excepción de Ala y Gly, estos grupos son voluminosos, por lo que existe impedimento estérico y por ello la estructura extendida es poco estable.

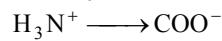
En las proteínas fibrosas que tienen un papel estructural, este problema se resuelve mediante la adopción de uno de los siguientes tipos de estructura:

- Grupo I: Estructura en hoja plegada.
- Grupo II: Estructura en α -hélice.
- Grupo III: Estructura en triple hélice.

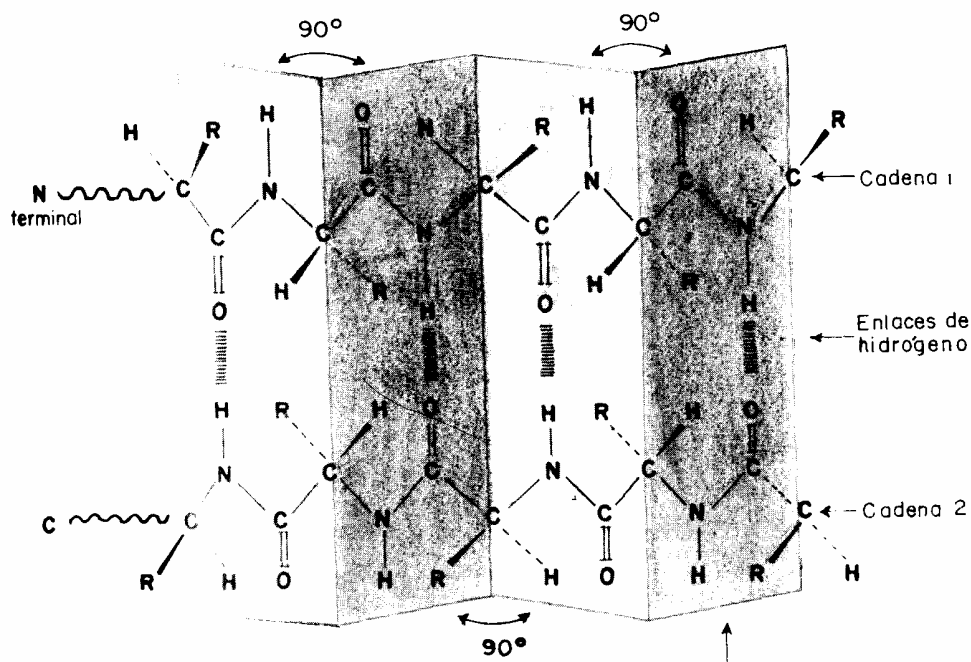
El grupo I se caracteriza por tener una unidad de repetición de 6.5 a 7.0 Å, con formación de puentes de hidrógeno intermoleculares entre al menos dos cadenas o segmentos de cadena que pueden ser, paralelas (van en el mismo sentido):



o antiparalelas (van en sentido opuesto):



Dado que cada enlace peptídico define un plano en el que también se localizan los puentes de hidrógeno, se obtiene una estructura similar a la de una hoja plegada, figura 7.



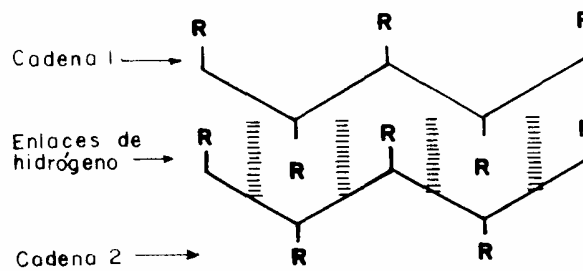
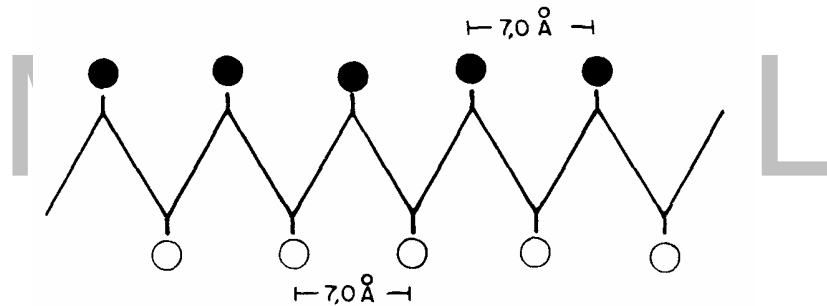


Figura 7: Estructura en hoja plegada

Esquemáticamente se puede representar esta estructura de la siguiente manera, donde cada línea representa un plano, $\text{---}\bullet\text{---}$ los grupos R impares y $\text{---}\circ\text{---}$ los grupos R pares:



La proteína más importante de este grupo es la fibroína de la seda, constituida básicamente por Gly (45%), Ala (26%) y Ser (12%) con una secuencia repetitiva:

...Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala...

Debido a esta estructura primaria, no hay impedimento estérico apreciable y es posible lograr un empaquetamiento compacto entre distintas capas originándose así la fibra con sus propiedades de flexibilidad y poca extensibilidad. Esquemáticamente, figura 8, tendríamos:

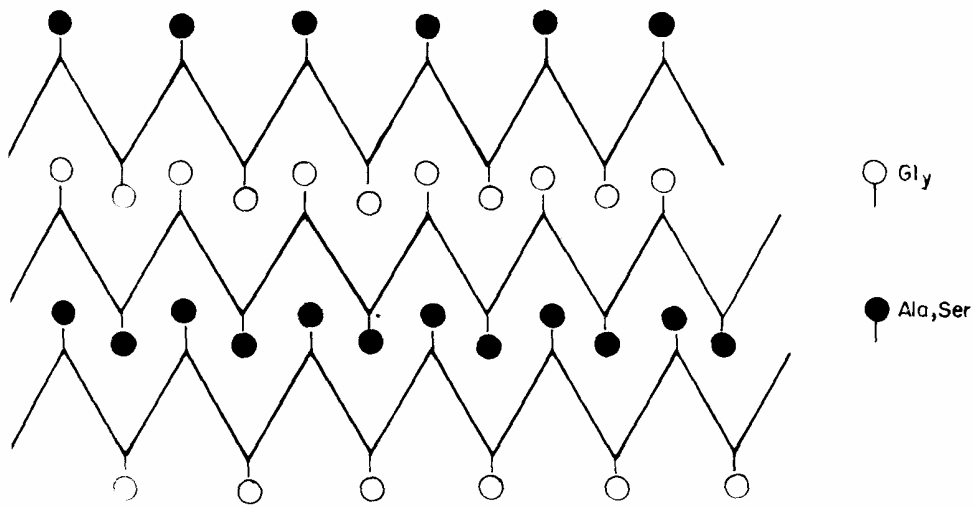


Figura 8: Empaquetamiento de grupos R en la fibroína

El grupo II posee una unidad de repetición de 5.1 a 5.4 Å, y los puentes de hidrógeno son exclusivamente intermoleculares. Esto genera una estructura helicoidal del tipo representado en la figura 9.

Podemos observar que los grupos R están dirigidos hacia el exterior de la hélice, lo cual implica que grupos R voluminosos tengan una misma carga, si están situados muy cerca desestabilizan la estructura; por otra parte la Prolina rompe la hélice por no poder formar los puentes de hidrógeno necesarios.

A este grupo pertenece la α -queratina que es el constituyente más importante de fibras como cabello y lana y de tejidos de protección como piel, plumas, cuernos, uñas, etc. Esta proteína que posee muy poco Trp, His y Met, tiene una alta proporción de CySH que forma puentes disulfuro entre las distintas cadenas helicoidales y mantiene así la estabilidad de la fibra:

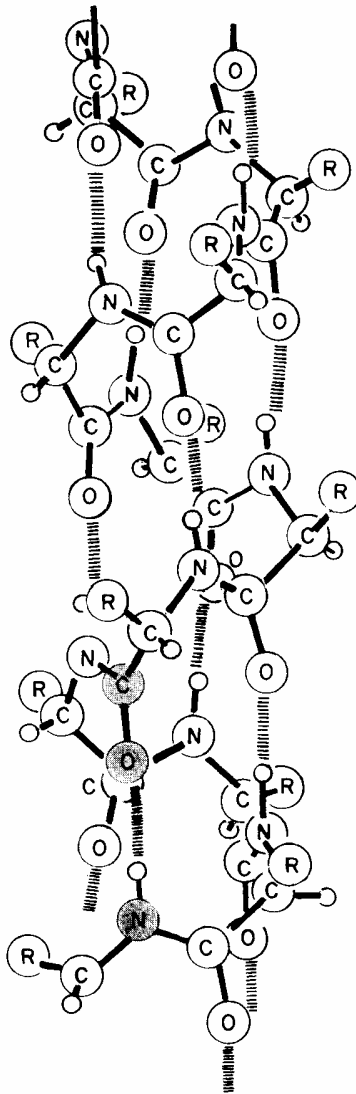


Figura 9: Estructura de α -hélice

Las fibras que tienen esta estructura son extensibles reversiblemente, luego de un tratamiento por calor húmedo debido a que el agua provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno intramoleculares y la cadena puede adquirir una configuración extendida.

El grupo III posee una unidad de repetición de 2.8 \AA , y los puentes de hidrógeno se forman entre tres cadenas polipeptídicas que se enrollan entre sí, de manera helicoidal. El mejor ejemplo de este tipo de estructura es el colágeno, proteína que constituye un 30% de las proteínas del cuerpo humano y está presente en tejido conjuntivo, piel, huesos, tendones. El colágeno tiene un 33% de Gly, 25% de Pro o

OH-Pro y 11% Ala, sin que haya Trp, CySH, CySSCy y con menos del 2% de Phe, Tyr.

Cada cadena peptídica tiene aproximadamente 1000 AA y la unión de las tres constituye el tropocolágeno que es la fibra básica con 14 Å de diámetro y 2800 Å de larga. Estas fibras se unen a otras a través de enlaces covalentes y generan el colágeno. De manera simplificada podemos representar el tropocolágeno así, figura 10:

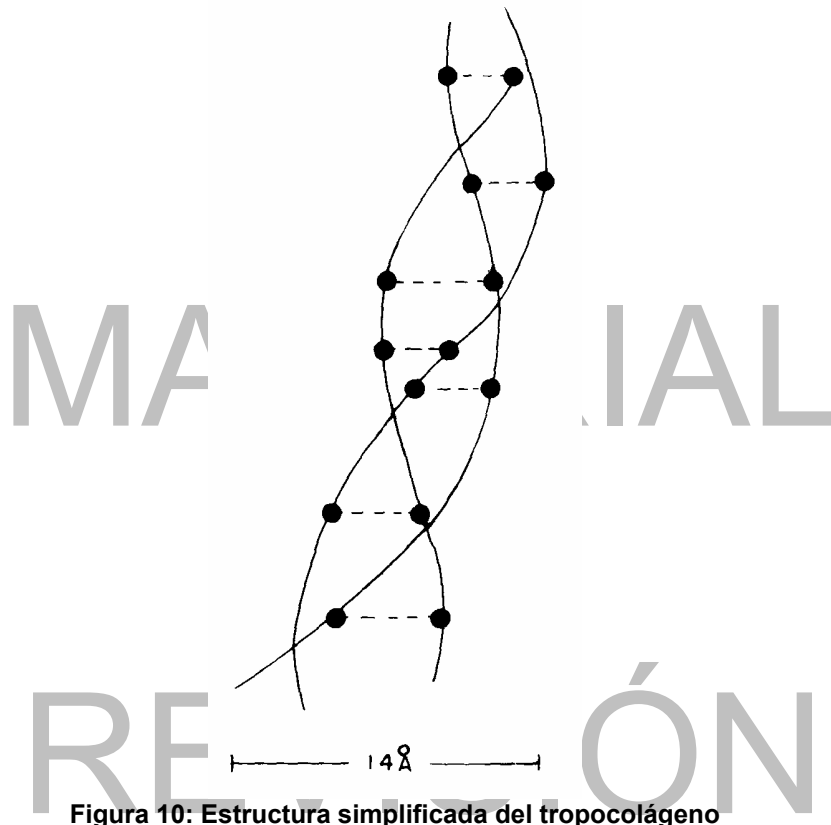


Figura 10: Estructura simplificada del tropocolágeno

1.3 Estructura terciaria

En estas proteínas y como consecuencia de sus estructuras primaria y secundaria, se presentan simultáneamente varias clases de interacciones que determinan su conformación. Estas interacciones (representadas en la figura 11) son:

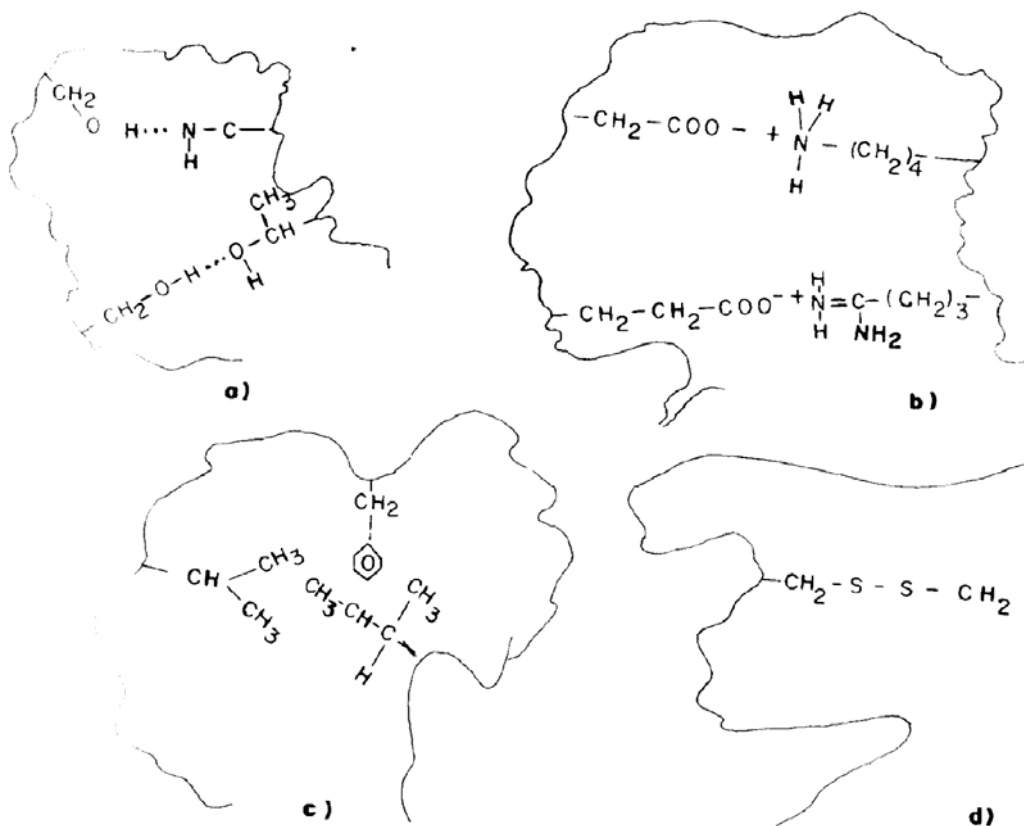


Figura 11: Tipos de enlaces que mantienen la estructura terciaria de las proteínas

- Puentes de hidrógeno intramoleculares o intermoleculares, cuando la proteína tiene más de una cadena polipeptídica, que se forman entre cadenas laterales, o entre cadenas laterales y átomos del enlace peptídico, (a. en la figura 11).
- Enlaces salinos o iónicos que resultan de la atracción electrostática entre grupos R con cargas opuestas, (b. en la figura 11).
- Uniones hidrofóbicas provenientes de las interacciones entre cadenas laterales de AA no polares, que tienden a asociarse entre sí excluyendo el agua, (c. en la figura 11).
- Enlaces covalentes entre grupos R de CySH (enlaces disulfuro), Lys y Glu o Asp (enlaces amida), (d. en la figura 11).

Estos enlaces en conjunto mantienen la estructura terciaria que fundamentalmente está determinada por su composición y secuencia de aminoácidos.

La conformación de las proteínas globulares es considerablemente más compleja que la de las proteínas fibrosas y es característica para cada una. Los estudios realizados sobre diversas proteínas (insulina, mioglobina, citocromo c,

hemoglobina, etc) usando difracción de rayos X han permitido deducir algunas características estructurales comunes:

- La proteína es una molécula compacta cuya forma se asemeja en muchos casos a una esfera con cavidades y protuberancias. La cadena polipeptídica sigue un trazo irregular con segmentos en hoja plegada, en α -hélice o desordenados.
- Los aminoácidos polares y los cargados están generalmente situados en el exterior, en íntimo contacto con el medio acuoso circundante.
- Los aminoácidos hidrofóbicos se ubican preferencialmente en regiones internas donde se encuentran pocas moléculas de agua o iones.
- Los segmentos de α -hélice que se presentan están interrumpidos por Pro o por HO-Pro.
- En una proteína dada proveniente de diferentes especies, la conformación es similar.

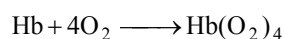
Dada la enorme complejidad de la estructura terciaria es posible solo después de establecer la estructura primaria y a su vez es un requisito para tratar de explicar la acción biológica de una proteína dada. Es importante resaltar la estrecha dependencia que existe entre la conservación de la estructura terciaria natural u original (conformación nativa) y la actividad de la proteína.

1.4 Estructura cuaternaria

Algunas proteínas y con mucha frecuencia aquellas con peso molecular (PM) superiores a 100000 están formadas por la asociación reversible de dos o más cadenas polipeptídicas que no están unidas entre sí por enlaces covalentes y pueden ser separadas y estudiadas individualmente.

Un buen ejemplo de este tipo de proteínas es la hemoglobina (Hb) que se encuentra presente en los glóbulos rojos y tiene como función el transporte de oxígeno a los tejidos. Esta proteína está formada por dos cadenas polipeptídicas α y de dos cadenas β que nos dan el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con un PM de 65000. Cada una de ellas posee además de la parte proteínica (globina), un grupo heme en el cual el Fe^{+2} está unido a cinco átomos de Nitrógeno en la forma indicada en la figura 12.

Sobre este Fe^{+2} se fija una molécula de oxígeno (OxiHb), o de H_2O (HCO_3^-) (de-oxiHb) o de CO (carboxiHb) en casos de intoxicación por este gas; en conjunto tenemos:



Un esquema de la estructura cuaternaria de la hemoglobina se representa en la figura 13.

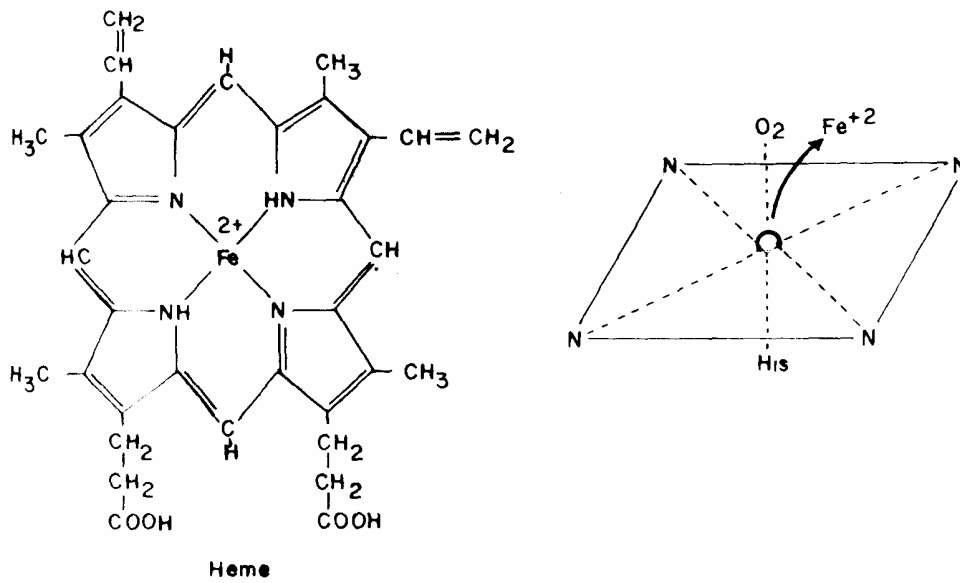


Figura 12: Estructura del grupo heme

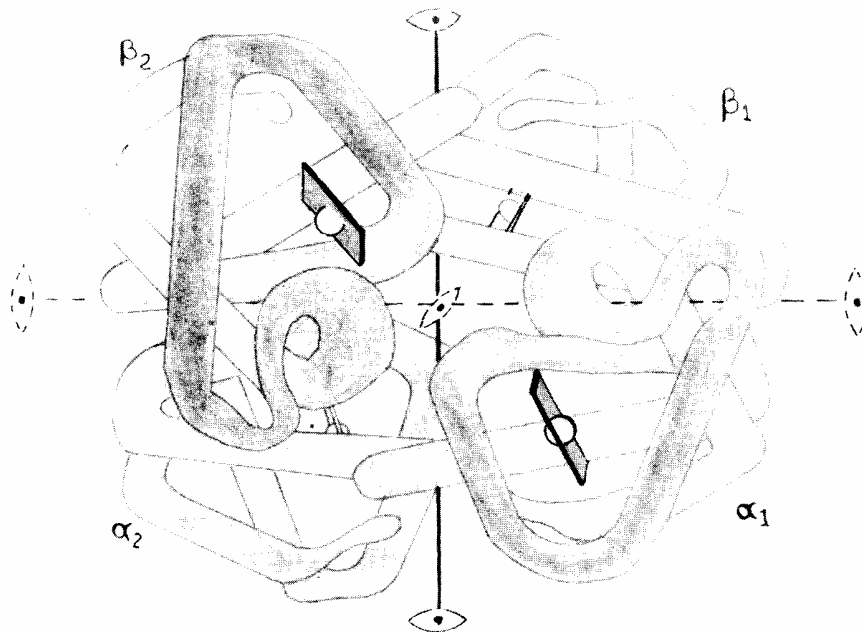
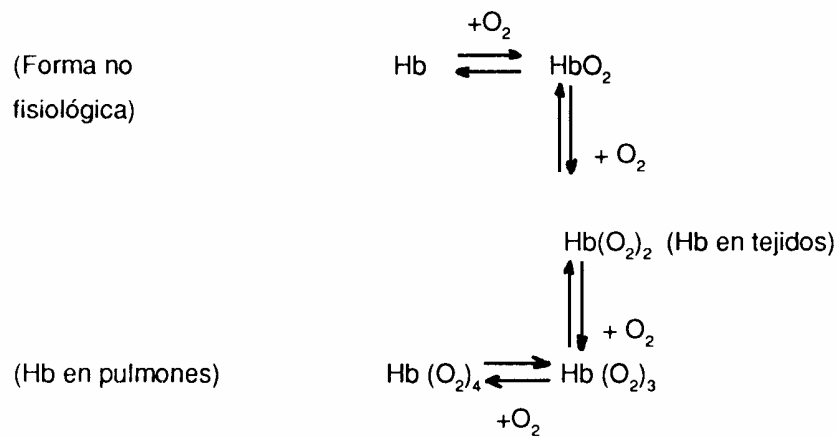


Figura 13: Estructura cuaternaria de la hemoglobina

Podemos representar el transporte de oxígeno como una serie de interacciones cooperativas donde la entrada de un oxígeno se facilita si hay otro fijado:



En los pulmones la Hb se satura con O₂ y está oxigenada a casi un 100%; al llegar a los tejidos la Hb suelta parte del O₂ y queda saturada a un 65% y en esta forma regresa a los pulmones. Para realizar este transporte se requiere la forma tetramétrica (α₂β₂) ya que los monómeros (α, β), dímeros (α₂, β₂, αβ) o trímeros (α₂, β, αβ₂) no transportan el oxígeno y tampoco existen como tales en los eritrocitos; el átomo de hierro de cada heme debe estar en forma ferrosa (Fe⁺²), si se oxida a la forma férrica (Fe⁺³) tampoco hay transporte.

Estudios similares con enzimas que poseen estructura cuaternaria han mostrado que la actividad biológica se presenta con la forma asociada y no con la forma disociada (monómeros).

2 Clasificación

Además de la clasificación en fibrosas y globulares o en simples y conjugadas¹ las proteínas globulares se pueden subdividir, según Osborn, de acuerdo con su solubilidad en:

- **Albúminas:** Son proteínas solubles en agua y en soluciones salinas; precipitan a altas concentraciones de sales, 80%S (porcentaje de solubilidad). Ejemplo: (NH₄)₂·SO₄, Na₂SO₄ y están ampliamente distribuidos en tejidos animales y vegetales (albúmina de huevo, albúmina sérica).
- **Globulinas:** Son insolubles en agua y solubles en soluciones salinas diluidas (NaCl 1%); precipitan a concentraciones medianas de sales (40 a 50%) y se encuentran prácticamente en todos los tipos de células y tejidos.
- **Prolaminas:** Insolubles en agua y soluciones salinas; son solubles en etanol 50-90% y se encuentran sólo en vegetales (ej: zeína de maíz, hordeína de la cebada, gliadina del trigo). Son ricas en Glu y en Pro (10%).
- **Glutelinas:** Solo se solubilizan en ácidos o bases diluidos; están presentes solo en tejidos vegetales (gluten del trigo) y tienen buenos contenidos de CySH o CySSCy.

2.3 Propiedades fisicoquímicas

2.3.1 Propiedades ácido-base

Debido a la presencia simultánea de AA ácidos y básicos, las proteínas se comportan como polielectrolitos e interactúan ampliamente con solventes acuosos; una excepción la constituyen aquellas proteínas que por tener una elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos, son poco polares y por ello poco solubles en soluciones salinas.

En forma similar a lo que ocurre con los péptidos, las proteínas presentan curvas de titulación complejas a partir de las cuales no es posible obtener información sobre el pI o sobre los pK_a de los grupos cargados. Los valores de pK_a se pueden determinar por métodos físicos o químicos más sofisticados y se ha encontrado que en algunos casos el pK de un grupo R difiere del establecido para ese grupo en un aminoácido libre; probablemente esto se debe a interacciones (iónicas, puentes de hidrógeno) con grupos vecinos y a la cercanía a residuos hidrofóbicos que modifican la constante dieléctrica del medio.

El pI de las proteínas se determina por electroforesis y en la mayoría se encuentra entre 4.5 y 5.5; en consecuencia su capacidad tampón es muy pequeña a pH fisiológicos y sólo las proteínas con buen contenido de His, como la hemoglobina, son capaces de actuar como buffers a estos pH.

El conocimiento del pI nos permite predecir la carga neta de una proteína en un pH dado y su comportamiento en un campo eléctrico; si el pH es mayor que el pI, la proteína estará cargada negativamente y en un campo eléctrico migrará hacia el ánodo. A pH menores que el pI tendrá carga positiva y migrará al cátodo.

2.3.1.1 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas depende de varios factores:

- **pH:** A mayor interacción con el solvente mayor será la solubilidad, por esto en el pI (donde la carga neta es cero) la solubilidad es mínima.
- **Fuerza iónica (μ) de la solución:** La mayoría de las proteínas presenta un comportamiento como el ilustrado en la figura 14, donde se grafica el logaritmo de la solubilidad en función de la fuerza iónica:

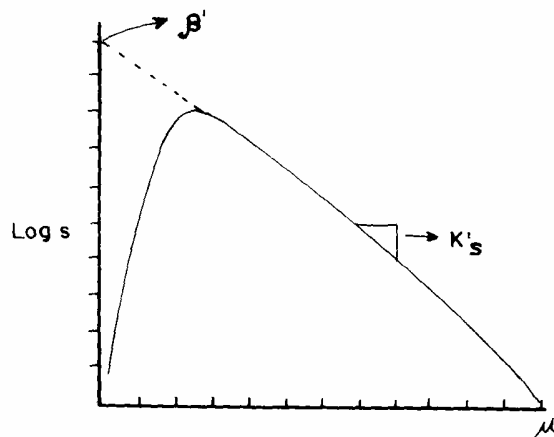


Figura 14: Solubilidad de las proteínas en función de la fuerza iónica

Podemos aprovechar esta curva para deducir la ecuación que rige la solubilidad:

$$\log S = \beta' - K'_{s\mu}$$

donde β' (intersección por extrapolación al eje y) representa la solubilidad (teórica para proteínas diferentes a las albúminas) en agua pura y $K'_{s\mu}$ (pendiente de la recta) es un parámetro cuyo valor es característico para cada proteína. Se observa que la solubilidad aumenta rápidamente al incrementar la fuerza iónica (salting out). Esto explica por qué las albúminas y las globulinas precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% y al 50% de saturación respectivamente.

- **Temperatura:** En el intervalo 0-60°C la solubilidad aumenta al aumentar la temperatura pero a valores superiores las proteínas precipitan debido a que la energía térmica es suficiente para destruir los enlaces no covalentes que estabilizan la estructura terciaria, exponiendo al solvente los grupos R hidrofóbicos del interior y puesto que estos no interactúan apreciablemente con el agua, precipitándose.
- **Solventes orgánicos miscibles con el agua:** Estos solventes (etanol, acetona, metanol) disminuyen la constante dieléctrica del solvente acuoso y por tanto causan la precipitación. Para que la proteína permanezca en solución se requiere, como en el caso de las prolaminas, que tenga una composición en aminoácidos muy particular.

En los procesos industriales y de laboratorio tendientes a obtener proteínas, se aprovechan los anteriores factores, combinándolos de tal manera que las diferencias en solubilidad sean máximas y se puedan eliminar componentes indeseables.

2.3.1.2 Interacciones con iones

Una consecuencia de la presencia de grupos R ácidos y básicos es la capacidad que tienen las proteínas para fijar, por interacciones electrostáticas, cationes y aniones. Esta interacción es muy importante pues en algunos casos la actividad biológica de la proteína depende de ella (ej. metaloenzimas) y en otros es el mecanismo usado para transportar o almacenar un determinado ión (ej: ceruloplasmina, ferritina).

El tipo de ión fijado y su cantidad depende de:

- **La naturaleza de la proteína:** Esto se manifiesta en la clase de grupos R presentes, sus cargas y el pI de la proteína.
- **pH de la solución:** Este factor determina la carga neta, y el número de grupos R cargados positiva o negativamente en un momento dado.
- **Carga y tamaño del ión:** Los iones divalentes se fijan más fuertemente que los monovalentes y a igualdad de carga los de mayor radio de hidratación más débilmente que los que poseen radios menores.
- **Concentración del ión:** A mayor concentración del ión mayor cantidad se fija sobre la proteína pudiéndose alcanzar valores para la albúmina sérica de hasta 20 moles $Cl^-/10^5$ g proteína.

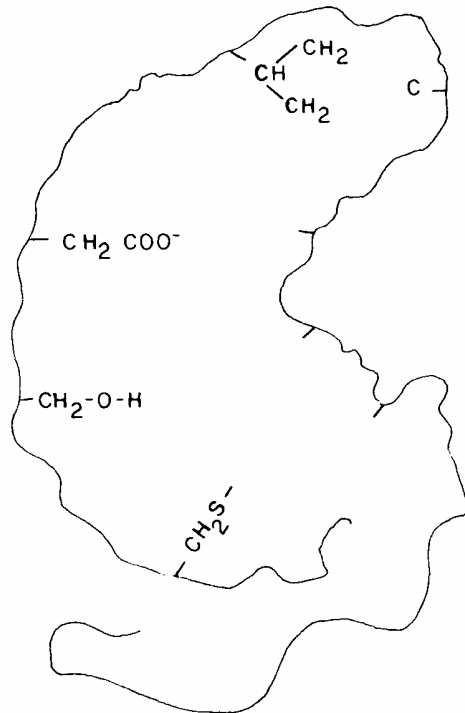
2.3.1.3 Desnaturalización:

Como discutimos anteriormente, la actividad biológica de las proteínas depende de la conservación de su estructura en los diferentes niveles (primaria, secundaria, terciaria y aun cuaternaria en las proteínas que la poseen). Es lógico pensar que condiciones ambientales (hidrólisis, oxidación, reducción) que provoquen la destrucción de enlaces covalentes causarán una pérdida de la actividad; sin embargo esta pérdida se puede presentar también sin necesidad de romper enlaces covalentes y en estos casos es imputable a modificaciones profundas de su estructura terciaria y/o cuaternaria.

Estos cambios se conocen como desnaturalización (o pérdida de su estructura nativa) que en algunos casos puede ser reversible al eliminar el agente causal. Cambios extremados en los factores que afectan la solubilidad, presencia de metales pesados (Hg^{+2} , Ag^{+1} , Pb^{+2} , etc.) o de detergentes, son algunas de las causas que pueden desnaturalizar una proteína u ocasionar su precipitación, es prácticamente imposible recuperar posteriormente la conformación nativa y por ende la actividad biológica.

Actividad 2

1. En la siguiente estructura terciaria imaginaria, complete en cada caso la interacción correspondiente, que mantiene la estructura:



2. Represente un segmento corto de una estructura en hoja plegada, en α -hélice y en triple hélice. Indique en cada caso cómo se forman los puentes de hidrógeno. Recuerde las características de cada estructura.
3. Asocie la proteína especificada en la lista con el tipo de estructura que le es característica y su función:
 - a. Queratina.
 - b. Colágeno
 - c. Hemoglobina:
 - d. Fibroína:
4. Establezca una tabla que muestre como se pueden clasificar las proteínas dependiendo del criterio que se adopte.
5. Cite los diferentes factores que influyen en la solubilidad de las proteínas. Recuerde cuáles son los factores que afectan la interacción de las proteínas con un solvente dado.

Autoevaluación No. 4

1. Explique cómo están definidos los niveles de organización estructural de las proteínas.
2. Compare las características de cada una de las clases de estructura secundaria que puede adoptar una proteína. Dé un ejemplo en cada caso.

3. Proponga un segmento esquemático de estructura terciaria de una proteína donde se ilustren las interacciones que la mantienen.
4. Proponga un modelo de estructura terciaria de una proteína globular, que satisfaga las características que les son comunes a estas proteínas.
5. Construya una tabla donde se indique la organización estructural, la clasificación y la función biológica de las siguientes proteínas:
 - a) Insulina
 - b) Fibroína
 - c) Hemoglobina
 - d) Colágeno
 - e) Queratina
6. Explique la correlación existente entre la estructura y la función de:
 - a) Hemoglobina
 - b) Fibroína
7. Explique las relaciones existentes entre la composición en AA, el pI de la proteína y el pH de la solución con:
 - a) La solubilidad de la proteína
 - b) Las propiedades anfóteras
 - c) Las interacciones con iones
8. Cite las diferentes formas como se puede desnaturalizar una proteína.
9. Analice las consecuencias de la desnaturalización sobre la actividad biológica de las proteínas.

Lecturas recomendadas

Usted puede ampliar algunos de los aspectos estudiados en:

1. Proteínas/P. Doty: En: La base molecular de la vida /Julio R Villanueva: Lecturas del Scientific American.- - Madrid: Blume, 1971.- - p31.
2. La molécula de la insulina / E.O.P. Thompson. - - En: Ibid., p.24
3. La molécula de hemoglobina / M. F. Perutz. - - En: Ibid, p39.

CAPITULO 3: ENZIMAS

Objetivos

- Identificar las características de la acción enzimática.
- Ilustrar la clasificación de las enzimas basada en las clases de reacciones catalizadas.
- Analizar el comportamiento cinético de las enzimas.
- Interpretar los cambios de actividad enzimática debidas a la influencia del pH, temperatura, efectores.
- Establecer las diferencias entre los distintos tipos de inhibición.
- Identificar los sitios activos de algunas de las principales enzimas.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 5

1. Explique el significado del término grupo prostético.
2. Establezca la diferencia entre estado en equilibrio y estado estacionario.
3.
 - a. ¿Cuál es el significado de energía libre?
 - b. ¿Cómo se relacionan los cambios de energía libre con la constante de equilibrio?
4. Explique cómo ejercen su acción los catalizadores.
5. Identifique las características de una cinética de primer orden.
6. Ilustre con dos ejemplos las relaciones existentes entre estructura y función biológica de las proteínas.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

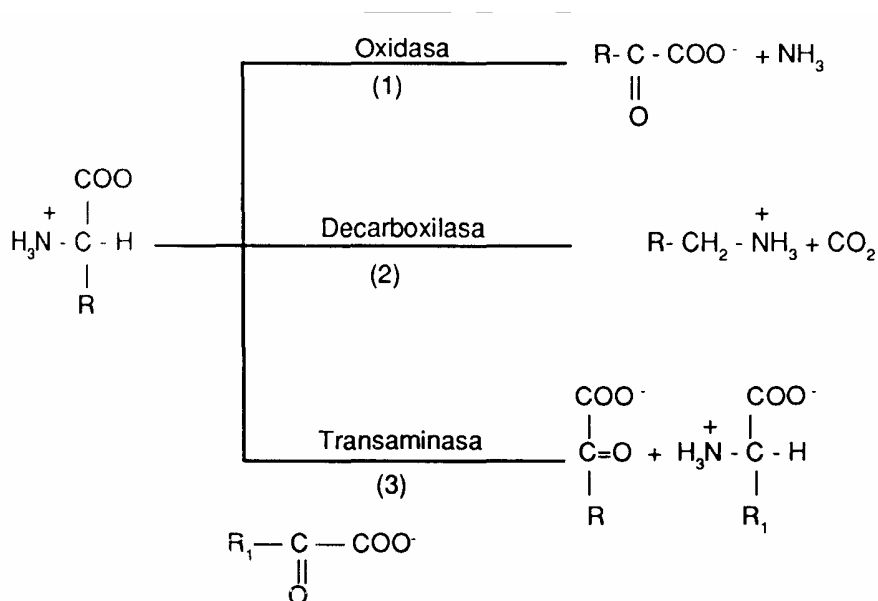
1 Características de la acción enzimática

En este capítulo vamos a considerar un grupo de proteínas que cumplen con la función esencial de catalizar las reacciones químicas que en su conjunto constituyen el metabolismo. Estas proteínas, que antiguamente se denominaron fermentos, reciben el nombre de enzimas y frecuentemente son del tipo de las albúminas o de las globulinas pudiendo según el caso ser proteínas simples o conjugadas. Su distribución es muy amplia ya que todos los seres vivos las poseen y podemos asignarles el papel de catalizadores biológicos.

Además de tener las propiedades generales de los catalizadores orgánicos o inorgánicos, las enzimas ejercen su acción presentando las siguientes características:

1.1 Especificidad de acción

Esto significa que una enzima en particular cataliza con un sustrato dado, un solo tipo de reacción química y ningún otro. Un buen ejemplo lo constituyen las enzimas que intervienen en el metabolismo de los aminoácidos, compuestos que según el tipo de enzima involucrada dará origen a diferentes productos; de manera general podemos ilustrar este ejemplo así:



Tendremos entonces que la reacción (1) será catalizada solo por oxidasas y no por decarboxilasas o transaminasas y así sucesivamente.

1.2 Especificidad por el sustrato

Cada enzima reconoce de una manera muy selectiva su sustrato basándose en la estructura tridimensional que éste posee. La estereo especificidad es la que determina que una oxidasa dada modifique por ejemplo la L-Phe sin que la D-Phe sea alterada. Otro ejemplo son las proteasas que reconocen a nivel del enlace peptídico cuáles son los AA adyacentes del lado amino o carboxilo; esto se observa al comparar los enlaces hidrolizados en el siguiente péptido:



1. Tripsina rompe del lado COO- de Lys y Arg.
2. Quimotripsina rompe del lado del COO- de aminoácidos aromáticos (p.e. Trp).
3. Aminopeptidasa rompe en extremo N-Terminal
4. Carboxipeptidasa rompe en extremo C-Terminal

Debido a su especificidad estas enzimas producen a partir de un péptido o proteína dada, un mismo conjunto de fragmentos y son por tanto muy utilizadas en los estudios de secuencia.

Un ejemplo de estas dos características de la reacción enzimática, está constituido por las glicosidasas (hidrolasas que atacan los enlaces α - y β - glicosídicos de los carbohidratos) que degradan el almidón y la celulosa. (para tener claras las diferencias estructurales es conveniente revisar el Módulo de Química Orgánica¹). La amilosa, polisacárido lineal con enlaces α -1,4 entre las unidades de glucosa, es hidrolizada por:

α - amilasa presente en la saliva y el jugo pancreático, que es una glicosidasa que actúa al interior de la molécula produciendo una mezcla de maltosa y de glucosa.

β - amilasa, muy abundante en semillas en germinación, que ataca desde el extremo reductor de la cadena liberando unidades de maltosa.

Estas dos glicosidasas son entonces un buen ejemplo de la especificidad de acción ya que el mismo sustrato (amilosa) es degradado de diferente manera.

La amilopectina, segundo constituyente del almidón, además de ser hidrolizado por α - y β - amilasa lo es por la amilo α -1,6 glicosidasa y la acción conjunta de las tres enzimas resulta en la degradación completa de este polisacárido.

En el caso de la celulosa, que es un constituyente importante de las paredes celulares vegetales, estas glicosidasas no pueden actuar y se requiere la presencia de la celulasa para romper los enlaces β -1,4 de este polímero y producir glucosa y oligosacáridos.

Podemos resumir la acción de estas enzimas sobre la amilopectina, de la siguiente manera:

Enzima	Ataque	Productos
α -amilasa	Interno, enlaces α -1,4; su acción se detiene en las cercanías de enlace α -1,6.	Maltosa, glucosa y oligosacáridos ramificados.
β -amilasa	Extremo no reductor, enlaces α -1,4; su acción se detiene en las cercanías de enlace α -1,6.	Maltosa y dextrina límite (polisacárido).
Amilo α -1,6 glicosidasas	Interno, enlaces α -1,6.	Polisacáridos (y oligosacáridos) con enlaces α -1,6.

Tabla 9: Acción de algunas enzimas sobre la amilopectina.

Aquí tenemos ilustrada la especificidad sobre el sustrato pues para hidrolizar enlaces glicosídicos α -1,4 se requieren enzimas diferentes a las necesarias para degradar enlaces β -1,4 y viceversa.

Estas características de las enzimas implican que exista un número muy elevado de ellas pues cada sustrato será modificado por su enzima específica.

1.3 Condiciones óptimas de actividad

Cada enzima presenta su máxima actividad en ciertas condiciones experimentales que generalmente tienen que ver con pH, temperatura y la presencia o ausencia de activadores o inhibidores respectivamente.

Más adelante examinaremos en detalle como se afecta la actividad enzimática con cada uno de estos factores.

2 Clasificación y nomenclatura

Debido al número creciente de enzimas que día a día se purifican y caracterizan, es imperativo emplear un sistema de clasificación lógico. El sistema adoptado internacionalmente asigna la terminación *asa* al nombre de la enzima y sólo por razones de uso se han conservado nombres triviales como tripsina, quimotripsina, pepsina, papaina y algunos otros.

La clasificación se establece según el tipo de reacción química catalizada y la división en grupos según el tipo de reacción junto con el nombre del sustrato, proporciona la base para el nombre individual de cada enzima.

En consecuencia resultan seis clases principales de enzimas:

Clase	Nombre	Acción Catalítica
1.	Óxido reductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción.
2.	Transferasas	Catalizan reacciones de transferencia de grupos.
3.	Hidrolasas	Catalizan reacciones de hidrólisis de enlaces covalentes C-O, C-N, C-C, etc.
4.	Liasas	Catalizan reacciones que implican formación de un doble enlace debido a la remoción de un grupo o desaparición de un doble enlace por adición de un grupo.
5.	Isomerasas	Reacciones de isomeración.
6.	Ligasas	Reacciones en las que se forma un enlace entre dos átomos, acompañada de un consumo de energía.

Tabla 10: Clases principales de enzimas.

Cada una de estas clases se subdivide en varias subclases de acuerdo con el tipo de enlace; por ejemplo la clase de las hidrolasas se divide en:

Subclase	Hidrolasa	Ejemplo del sustrato	Nombre general
3.1	Esterasas	Lípidos	Lipasas
3.2	Glicosidasas	Carbohidratos	Amilasas
3.3	Hidrolasas de éteres		Celulasas
3.4	Peptidasas	Péptidos, proteínas.	Tripsina
3.5	Otros grupos CN	Amidas	
3.6	Anhídridos de ácido		
3.6	Enlaces C-C		
3.8	Enlaces C-haluro, P-haluro		
3.9	Enlaces P-N		
3.10	Enlaces S-N		
3.11	Enlaces C-P		

Tabla 11: Subclases de hidrolasas

Estas subclases a su vez se dividen en varias sub-subclases dependiendo de sustrato en particular que se considere; en último término cada enzima se identifica con cuatro números que le son propios. La siguiente tabla nos muestra varios ejemplos:

3.4.21	Sub-subclase: serin proteinasas
3.4.21.1	Quimotripsina
3.4.21.2	Quimotripsina C.
3.4.21.4	Tripsina
3.4.21.5	Trombina

Tabla 12: Sub-subclases de las proteasas

3 Cinética enzimática

Las reacciones químicas que se presentan en los organismos vivos ocurren por una parte gracias a la capacidad de las enzimas de disminuir la energía de activación que actúa como una barrera y por otra parte por la especificidad con que se realiza esta catálisis.

Los estudios pioneros de Henry y Brown realizados con enzimas de la levadura mostraron que la cinética enzimática presenta el comportamiento ilustrado en la figura 15 donde $[S]$ es la concentración de sustrato y dS/dt equivale a la velocidad de transformación del sustrato (v).

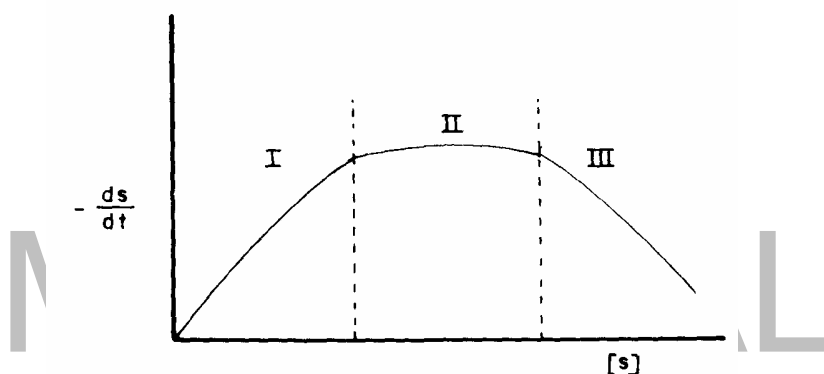


Figura 15: Velocidad de transformación del sustrato en función de S

Podemos observar que la curva se divide en 3 zonas. En la zona I, la velocidad (v) aumenta linealmente con la concentración de sustrato $[S]$. Esta región corresponde a una cinética de primer orden en la cual a una concentración dada de enzima (que permanece constante) podemos obtener un rápido incremento de v con cambios pequeños en $[S]$.

En la zona II la velocidad permanece constante para un intervalo de $[S]$ y se considera que la enzima está saturada.

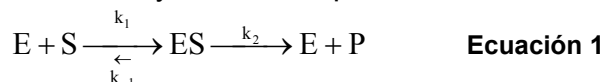
A concentraciones altas de S , se llega a la zona III donde se observa una disminución de la velocidad a medida que aumentamos más y más S .

Este comportamiento se interpreta como una inhibición de la enzima por exceso de sustrato.

El análisis del comportamiento de la enzima en las zonas I y II condujo a Michaelis y Menten a plantear que la enzima (E) se une reversiblemente con el sustrato (S) formando un complejo inestable (ES) que da lugar, irreversiblemente, al producto (P) y a la enzima libre (E), la formación del complejo ocurre por complementariedad estérica entre el sustrato y una región de la enzima, denominada el sitio activo, donde se realiza la catálisis. El Sitio activo es entonces un grupo de aminoácidos de la proteína que son los responsables de la actividad

catalítica y que, como consecuencia de la estructura terciaria, se disponen espacialmente de tal manera que la conformación del conjunto es complementaria de la conformación del sustrato.

El planteamiento de Michaelis y Menten se puede resumir en la expresión:



donde k_1 = rata de formación de ES.
 k_{-1} = rata de descomposición reversible de ES.
 k_2 = rata de descomposición irreversible de ES.

La constante k_2 es considerablemente menor que k_1 o k_{-1} y por tanto la velocidad global del proceso estará dado por:

$$v = k_2 [ES] \quad \text{Ecuación 2}$$

En otras palabras el paso limitante, será la descomposición de ES en producto más enzima.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores es posible deducir a partir de la ecuación (1) la ecuación de Michaelis-Menten¹ que describe el comportamiento de la enzima:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{KM + [S]} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde V_{\max} (velocidad máxima) y KM (constante de Michaelis) son dos parámetros importantes de la enzima dado que en la zona I tenemos una cinética de primer orden, podemos considerar que habrá un momento en el cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima, es decir:

$$v = \frac{1}{2} V_{\max}$$

Reemplazando en la ecuación 3:

$$v = \frac{1}{2} V_{\max} = \frac{V_{\max} [S]}{KM + [S]}$$

Dividiendo por V_{\max} y despejando, tendremos:

$$KM = [S] \quad \text{Ecuación 4}$$

Esta ecuación nos proporciona el significado físico de KM que será entonces la concentración del sustrato (moles/litro) necesaria para alcanzar la velocidad semimáxima.

Por su parte V_{max} es la velocidad obtenida cuando la enzima se encuentra saturada con sustrato o sea la situación que se presenta cuando los sitios activos de todas las moléculas de enzima se encuentran ocupados por sustrato.

En condiciones experimentales definidas (sustrato, pH, temperatura), la constante de Michaelis (K_M) tiene un valor propio para cada enzima y es uno de los parámetros que la caracterizan, al igual que el P_M , P_I , composición en aminoácidos, etc.

Los valores de K_M y V_{max} de una enzima se pueden determinar por métodos gráficos realizando en el laboratorio la cinética con un sustrato dado en condiciones experimentales bien definidas, de manera que al calcular las velocidades (cantidad sustrato transformada/ mililitro/ minuto) alcanzadas con diferentes concentraciones de S se obtiene la figura 16.

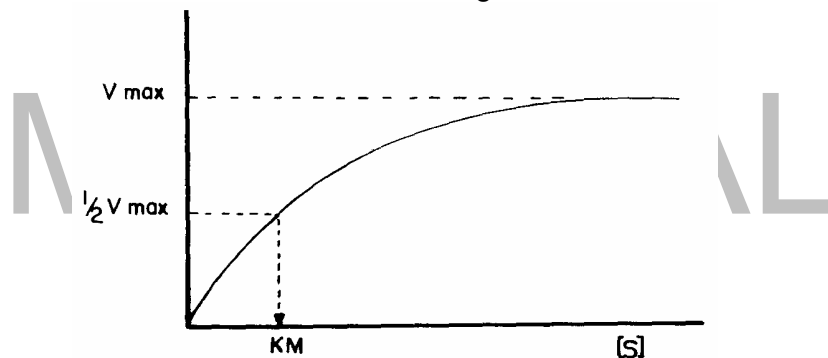


Figura 16: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.

En esta gráfica, el valor de V_{max} se obtiene al extrapolar sobre el eje Y la velocidad con la enzima saturada. Si tomamos $1/2$ de V_{max} e interpolamos en la gráfica, obtenemos K_M .

Debido a que es posible cometer errores experimentales que no se detectan en la gráfica, esta determinación de K_M y V_{max} no es muy apropiada y se prefiere emplear métodos como el de **Lineweaver- Burk** o el de Eadie-Hofstee².

En el primero de ellos, se opta por transformar la ecuación de Michaelis Menten así:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Tomando los inversos tenemos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{KM}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Ecuación 5}$$

La ecuación 5 corresponde a una línea recta: $Y = mX + b$. En donde: $Y = 1/v$ y $X = 1/[S]$.

La pendiente $m = KM/V_{\max}$; y la intercepción en el eje Y, $b = 1/V_{\max}$.

Graficando $1/v$ versus $1/[S]$ tendremos (figura 17) que la intersección en el eje X corresponde a $-1/KM$ y su valor absoluto expresa la afinidad de la enzima por su sustrato. Dado que KM (si $k_2 < k_{-1}$) corresponde a la disociación de $ES \rightarrow E+S$.

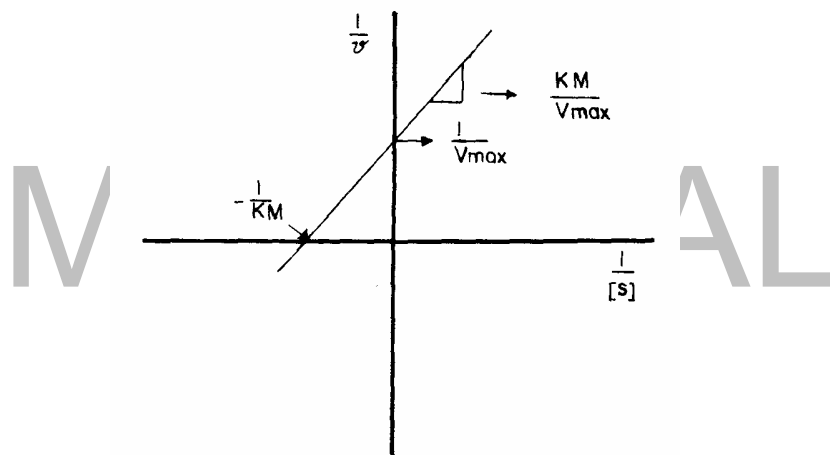


Figura 17: Representación gráfica según Lineweaver-Burk de v vs $[S]$

Esta representación tiene la ventaja de poder detectar errores experimentales en la determinación de la cinética; cuando esto ocurre la dispersión de los datos no permite trazar una recta por los puntos obtenidos.

El método de Eadie- Hofstee transforma la ecuación de Michaelis-Menten de la siguiente manera:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{KM + [S]}$$

Tomamos los inversos y obtenemos la ecuación 5:

$$\frac{1}{v} = \frac{KM}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Multiplicando los dos miembros por $(V_{\max} \cdot v)$:

$$(V_{\max} \cdot v) \frac{1}{v} = (V_{\max} \cdot v) \frac{KM}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + (V_{\max} \cdot v) \frac{1}{V_{\max}}$$

$$V_{\max} = KM \cdot \frac{v}{[S]} + v$$

$$v = V_{\max} - KM \cdot \frac{v}{[S]} \quad \text{Ecuación 6}$$

Graficando v versus $v/[S]$ tendremos la figura 18:

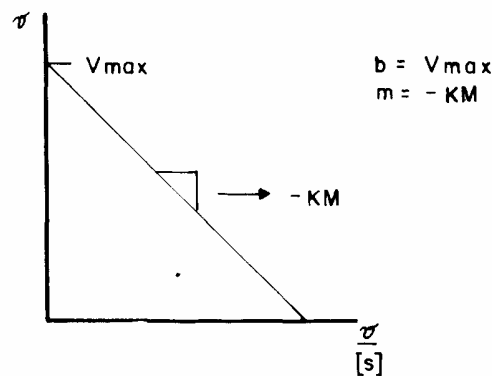
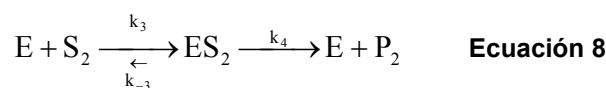
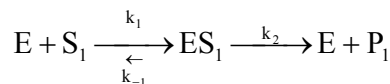
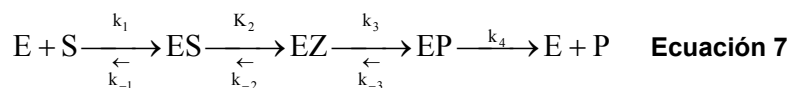


Figura 18: Representación gráfica según Eadie-Hofstee de v vs $[S]$

Si los datos obtenidos se ajustan a una recta, se descartan eventuales errores experimentales y de la gráfica se obtienen directamente los valores de KM y V_{\max} .

Es conveniente resaltar que, sea cual fuere el método que usemos para hallar KM y V_{\max} , solo necesitamos determinar experimentalmente la velocidad de transformación del sustrato (a una $[S]$ dada) la cual se hace generalmente por colorimetría. Las referencias 4 y 5 son un buen ejemplo de cómo se determinan cuidadosamente estos parámetros.

Aunque la ecuación de Michaelis-Menten es muy útil para describir el comportamiento cinético de las enzimas, es conveniente que tengamos en cuenta que en algunos casos se pueden presentar discrepancias debido a la formación de varios intermediarios inestables (ecuación 7) o a la presencia de más de un sustrato susceptible de ser transformado (ecuación 8) o la combinación de las dos situaciones.



Esto naturalmente complica considerablemente el análisis cinético y las ecuaciones son mucho más complejas. Para fines prácticos la determinación de K_M y V_{max} , en condiciones de laboratorio bien definidas, se realiza como lo hemos descrito.

4 Actividad enzimática

La actividad de las enzimas se puede expresar como:

4.1 Actividad específica

Se define como el número de unidades por mg de proteína. Una unidad es la cantidad de enzima que transforma 1 micromol (10^{-6} moles) de sustrato por minuto, a 25°C .

Esta forma de expresar la actividad es la más corriente y nos da una medida de la pureza de la enzima ya que los valores aumentan a medida que se avanza en el aislamiento de la enzima.

4.2 Número de transformación

Se define como el número de moléculas de sustrato transformadas por una molécula de enzima en la unidad de tiempo. Para calcular el número de transformación se requiere conocer el PM de la enzima lo cual implica su purificación previa. Los números de transformación para la mayoría de las enzimas son del orden de $10^4 - 10^5$ y en algunos casos éste puede llegar hasta $10^6 - 10^7$; esto nos da una idea del enorme poder catalítico de estas proteínas.

5 Factores que influyen la actividad enzimática

Dado que el sitio activo es el responsable de la actividad catalítica de la enzima, es esencial preservar su conformación en la proteína nativa. Aquellos factores que modifican la conformación de las proteínas influirán por consiguiente en la actividad enzimática y nos referimos en particular al pH, la temperatura y los efectores.

5.1 pH

La actividad enzimática en función del pH puede cambiar en la forma indicada en las siguientes gráficas:

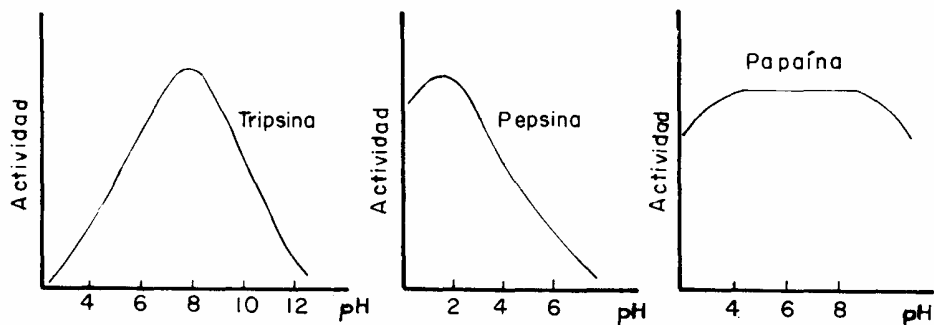


Figura 19: Ejemplos de actividad de algunas enzimas en función del pH

Observamos que cada enzima tiene un pH (o un rango de pH, para algunas) en el que su actividad es máxima; este valor corresponde al pH óptimo el cual es una consecuencia de la intervención de:

- Los pK_a de los grupos laterales presentes en el sitio activo que efectúan la catálisis.
- Los pK_a de los grupos que en el sitio activo ayudan a fijar el sustrato
- Los pK_a de las cadenas laterales que contribuyen a estabilizar la conformación global de la enzima.
- Los pK_a de los grupos funcionales del sustrato, si éste tiene cargas

La mayoría de las enzimas tienen pH óptimos cercanos a la neutralidad pero que no necesariamente coinciden con el pH intracelular; esto sugiere que en condiciones fisiológicas algunas enzimas no actúan al máximo de su capacidad.

El pH óptimo puede variar por la influencia de los siguientes factores:

- **Origen de la enzima:** las enzimas que modifican el mismo sustrato pero que por provenir de diferentes fuentes difieren en su pH óptimo, pI , KM , velocidad de inactivación térmica, etc., reciben el nombre de **isoenzimas**; en ellas las variaciones en pH óptimo pueden ser hasta de 2,5 a 3 unidades de pH.
- **Origen del sustrato:** en estos casos la variación en pH generalmente es menor de 0,5 unidades de pH.
- **Concentración de sustrato:** a bajas concentraciones de sustrato, KM varía con el pH y el pH óptimo se desplaza hacia la zona donde KM aumenta al aumentar el pH. Esta es la razón por la cual KM se determina a $[S]$ elevadas con el fin de evitar los cambios en función de pH.
- **Presencia de sustancias asociadas:** Generalmente las impurezas modifican el pH óptimo por razones que no son claras.

Las variaciones de actividad con cambios de pH indican la necesidad de usar tampones cuando se está trabajando con enzimas, lo cual nos permite eliminar estas variaciones.

5.2 Temperatura

Las enzimas presentan un comportamiento dual respecto a la temperatura. En el rango 5°C - 50°C la actividad aumenta, ya que la velocidad de reacción se incrementa. A temperaturas superiores (60°C a 80°C) la gran mayoría de las enzimas se inactivan debido a la desnaturalización que sufren. Una excepción a este comportamiento la constituyen las enzimas de las bacterias termófilas que se encuentran en habitats muy cálidos, como son las fuentes termales.

Para cada enzima existe una temperatura óptima en la cual su actividad es máxima.

5.3 Efectores

Con este nombre designamos iones o moléculas pequeñas que activan o inhiben las reacciones enzimáticas.

Los activadores más corrientes son iones como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} o grupos reductores (por lo general -SH).

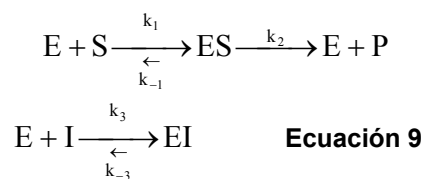
Los inhibidores son de una naturaleza más variada y provocan según el caso, diferentes tipos de inactivación.

6 Inhibición

La inhibición específica de la acción enzimática puede ser de tipo reversible o de tipo irreversible. El primer tipo incluye la inhibición competitiva y la no competitiva y el segundo se refiere a la inhibición incompetitiva. A continuación examinaremos las características de cada una y cómo podemos identificarlas por su representación gráfica según Lineweaver-Burk.

6.1 Inhibición competitiva

En este tipo de inactivación, el inhibidor (I) posee una estructura química similar a la del sustrato: esto le permite fijarse reversiblemente en el sitio activo de la enzima excluyendo el sustrato que previamente se haya unido. La enzima no modifica el inhibidor porque éste no posee enlaces susceptibles al ataque catalítico, que si están presentes en el sustrato. La situación puede representarse con las reacciones:



De acuerdo con esto podemos deducir que la magnitud de la inhibición dependerá de la [I] y que un exceso de S elimina la inhibición pues se usará toda la enzima libre y el equilibrio se desplazará hacia la formación de ES, y de allí a la formación de P.

A partir de las ecuaciones planteadas se puede obtener¹ la ecuación 10:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{KM}{V_{max}^*} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}^*} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde

v = velocidad de reacción en presencia del inhibidor.

V_{max}^* = velocidad máxima en presencia del inhibidor

K_i constante de inhibición,

$$K_i = \frac{[E][I]}{EI}$$

La cinética con y sin inhibidor competitivo se presentaría gráficamente así:

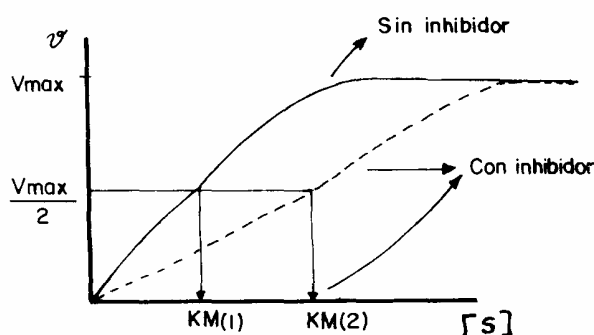


Figura 20: Catálisis enzimática inhibida competitivamente

Observamos que con un exceso de sustrato alcanzamos la misma V_{max} que en su ausencia. No sucede lo mismo para los valores de KM pues en presencia de inhibidor ($KM(2)$) la constante es más alta, o lo que es lo mismo, disminuye la afinidad por el sustrato.

Usando la ecuación 10 y según el método de Lineweaver-Burk, tendremos la figura 21 donde se visualiza fácilmente el cambio en KM y la igualdad en el valor de V_{max} .

Esta inhibición ha sido estudiada a nivel molecular con la lisozima, glicosidasa que degrada la pared celular de las bacterias y un trisacárido sintético o de manera más elemental con la deshidrogenasa succínica.

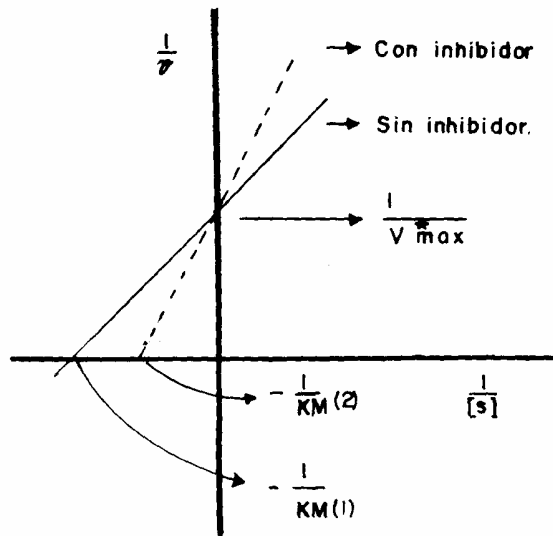
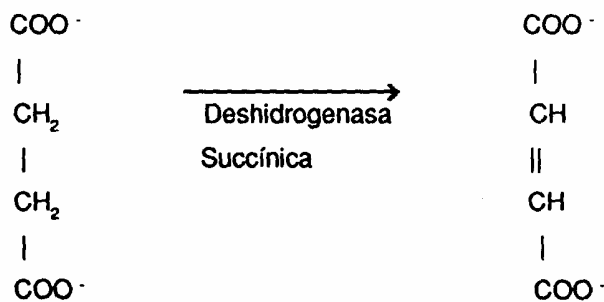


Figura 21: Representación según Lineweaver-Burk de la inhibición competitiva

Esta enzima cataliza la oxidación del succinato o fumarato según la reacción.



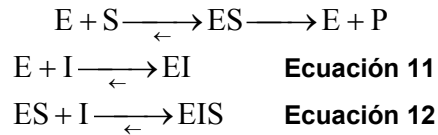
El malonato o el oxalacetato, cuyas estructuras son:



Actúan como inhibidores competitivos pues al igual que el sustrato natural poseen dos grupos COO^- y un tamaño adecuado para encajar en el sitio activo de la enzima.

6.2 Inhibición no competitiva

Se presenta por la unión reversible del inhibidor a un sitio de la enzima libre o con sustrato, diferente del sitio activo e impidiendo por consiguiente la transformación del sustrato. Las reacciones que ocurren simultáneamente son:



En la reacción 12, la enzima no es capaz de modificar S por las razones anotadas; en consecuencia con un exceso de sustrato no podemos recuperar la totalidad de las moléculas de enzima y por tanto no alcanzaremos la misma V_{max} obtenida en ausencia de inhibidor. La figura 22 ilustra lo anterior.

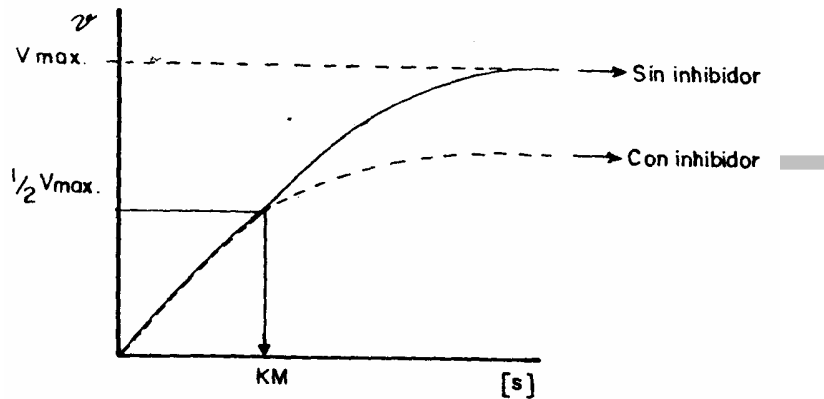


Figura 22: Cinética de una enzima inhibida no competitivamente

El tratamiento matemático de esta situación¹ resulta en la ecuación 13:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad \text{Ecuación 13}$$

La cual se representa en la figura 23 y comparada con la enzima en ausencia de inhibidor muestra que decrece la V_{max} pero que K_M no cambia.

Este tipo de inhibición se presenta con frecuencia con metabolitos intermedios que se combinan con enzimas reguladoras disminuyendo la actividad de sus sitios catalíticos.

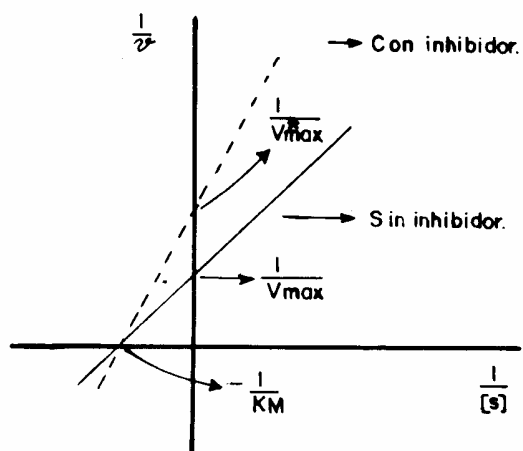


Figura 23: Representación según Lineweaver-Burk de la inhibición no competitiva

6.3 Inhibición incompetitiva

La característica más importante de esta inhibición es la unión irreversible (por enlaces covalentes) del inhibidor con una de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en el sitio activo; en algunos casos la unión irreversible se hace sobre el complejo ES. Esta inhibición se presenta más frecuentemente con enzimas que tienen mecanismos complejos y la representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk es:

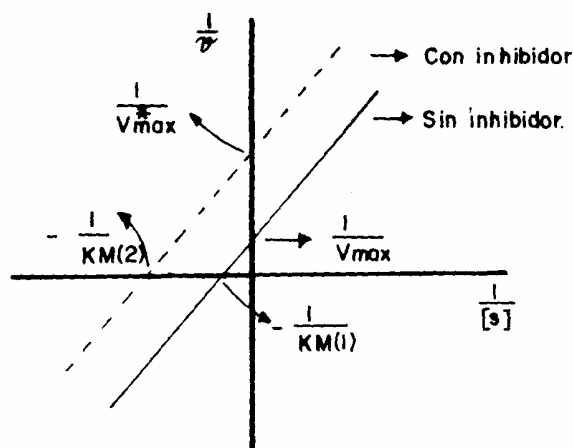


Figura 24: Representación de la inhibición incompetitiva

Y su expresión matemática es:

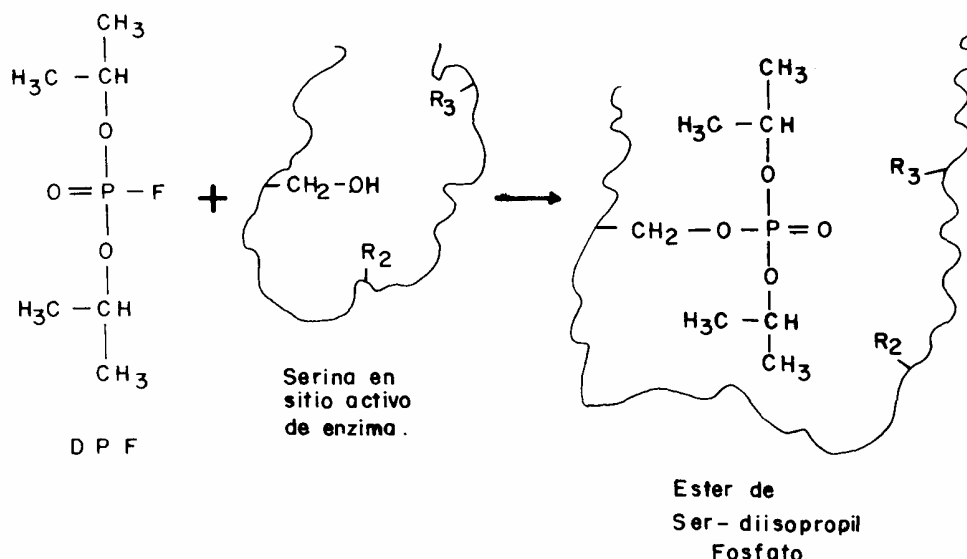
$$\frac{1}{v_i} = \frac{KM}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

De la figura 24 deducimos que en este tipo de inhibición los valores de K_M y V_{max} son menores que los obtenidos en ausencia de inhibidor.

El ejemplo clásico de inhibición incompetitiva es la reacción de compuestos organofosforados (clase a la cual pertenecen muchos insecticidas) con los grupos OH de la serina presente en el sitio activo de muchas enzimas. El diisopropil fluorofosfato.

(DPF) inactiva de esta forma a enzimas como la acetil colinesterasa (necesaria para la transmisión de los impulsos nerviosos), la tripsina, quimotripsina, elastasa (proteasa), etc.

Podemos representar de manera simplificada la acción del DPF así:



Si hacemos una revisión de lo tratado en esta sección vemos que es posible por comparación de las gráficas de Lineweaver- Burk, formarse una idea del tipo de inhibición y deducir con base en ello cuáles AA participan en el sitio activo o cuál es la estructura aproximada del sustrato natural o cuáles otros compuestos podría actuar como inhibidores.

En la próxima sección discutiremos algunos aspectos sobre la estructura de sitios activos de enzimas, que en parte se han aclarado con el uso de inhibidores.

7 Sitios activos de algunas enzimas

Debido a la gran variedad de enzimas existentes y por ende de sitios activos nos limitaremos a considerar los sitios catalíticos de algunas de las enzimas mejor conocidas. Es conveniente recordar que para establecer la estructura de un sitio

activo es necesario conocer en detalle la estructura terciaria de la enzima y puede ser de gran ayuda aclarar para un inhibidor dado, cuál es el tipo de inhibición que se presenta. A su vez el conocimiento del Sitio activo, juntamente con los parámetros que inciden en la actividad enzimática, permite proponer el mecanismo molecular por el cual se efectúa la catálisis.

Un grupo de enzimas particularmente bien estudiado lo constituyen las proteasas de la familia de la tripsina que además de esta enzima incluye la quimotripsina, elastasa, trombina y la proteasa B de *Streptomyces griseus* (una bacteria). Usando inhibidores incompetivos (DPF y otros) se ha establecido que en estas proteínas el sitio activo está formado por Ser, His y Asp que según Blow (lecturas recomendadas 3 y 4) dan lugar a un sistema “relay” de transferencia de protones que le confiere al oxígeno del grupo OH de la serina, un carácter nucleofílico que facilita el ataque del enlace peptídico y su posterior hidrólisis.

La figura 25 muestra cómo opera este sistema “relay” en la quimotripsina con su Ser 195, His 57 y Asp 102.

Esta clase de sitio activo lo tienen también las proteasas de la familia de la subtilisina, enzima producida por la bacteria *Bacillus subtilis*. En todas ellas hay una interesante similitud de secuencias en la región donde se localiza la serina del sitio activo; esto ha dado lugar a la idea de una convergencia evolutiva en estas enzimas.

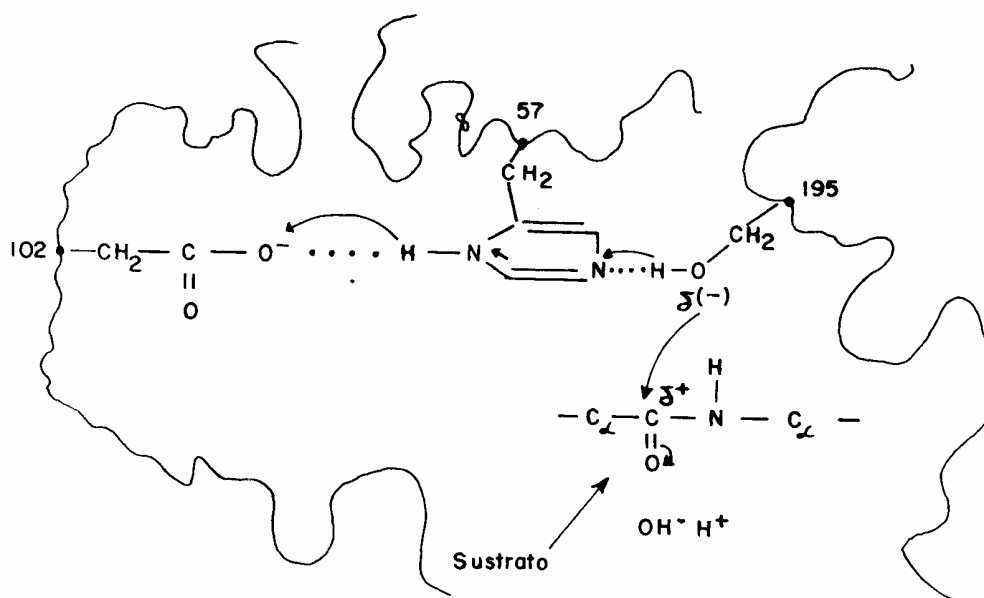


Figura 25: Sistema “relay” Ser, His, Asp en quimotripsina

Un segundo tipo de sitio activo podemos ilustrarlo con la carboxipeptidasa A. Esta exopeptidasa requiere para ser activa, de la presencia de un átomo de Zn^{+2} que se ubica en una depresión en la cual está el sitio activo que se extiende como un bolsillo al interior de la proteína. Los aminoácidos del sitio activo son Tyr 248, Glu 270 y Arg 145; el Zn^{+2} forma enlaces coordinados con el N(His 69), (Glu 72) y N (His 196); el cuarto ligando es el O del C = O del enlace peptídico que se va a hidrolizar. El Zn^{+2} sirve entonces para orientar el sustrato y polarizar el C=O. La figura 26 esquematiza la situación (lectura recomendada No. 4)

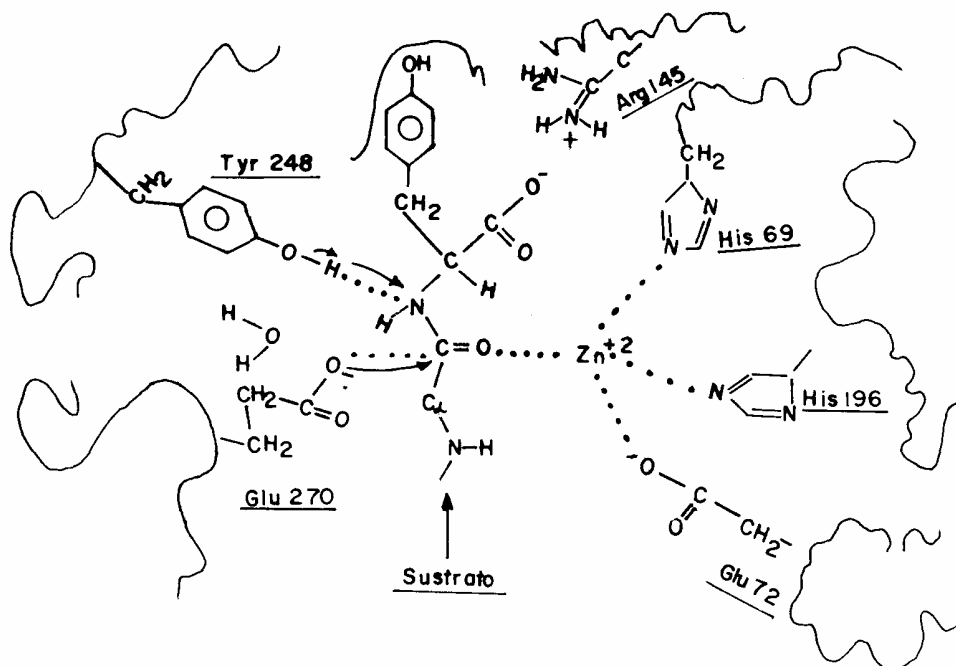


Figura 26: Sitio activo de la carboxipeptidasa A

El mecanismo de acción del Zn en la carboxipeptidasa ha servido como modelo para otras metaloenzimas que necesitan de Zn, Cu, Fe, Mo, Ni u otro metal para realizar la catálisis; la complejación del metal con EDTA suprime la actividad y esto es un primer indicio de que se trata de una metaloenzima.

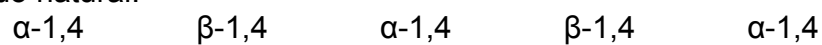
El estudio del sitio activo de la lisozima es uno de los ejemplos clásicos que integran los datos estructurales y cinéticos obtenidos con esta enzima. La lisozima es muy abundante en la clara de huevo y secreciones mucosas y su papel fue descubierto por Fleming quien encontró que esta proteína ataca las paredes celulares bacteriales donde están presentes como unidades alternas la N-acetil glucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM) formando la mureina¹.

El mecanismo de acción de la enzima ha sido establecido por el grupo de Phillips (lectura recomendada No.2) gracias al uso de un análogo del sustrato natural (que

es muy difícil de obtener en forma purificada), constituido por el trisacárido NAG-NAG-NAG.

Este compuesto actúa como un inhibidor competitivo que, según los estudios por difracción de rayos X del complejo lisozima-trisacárido, ocupa la mitad del sitio activo uniéndose a la enzima a través de puentes de hidrógeno e interacciones no polares; la fijación del trisacárido provoca un cambio conformacional en la vecindad del sitio activo.

Tomando como base, además de lo anterior, la información disponible sobre la estructura primaria y terciaria, el grupo de Phillips construyó un modelo con el hexasacárido natural:



NAG → NAM → NAG → NAM → NAG → NAM que ocupa todo el sitio activo y teniendo en cuenta la conformación del sustrato y del sitio activo propuso el mecanismo representado en forma simple en la figura 27.

La catálisis ácido-base se realiza con la intervención de los grupos carboxilo del Asp 52, que por estar situado en una región polar de la proteína, se encuentra como -COO^- aun en condiciones ácidas, y del Glu 35 que está en forma no disociada debido al ambiente hidrofóbico que lo rodea. Observando la figura 27, la cesión del H^+ del Glu 35 sobre el O del enlace glicosídico (a), la estabilización del ión carbonio (C^+) por el Asp 52 (b) y la intervención de un OH^- (que se fija sobre el C^+) y de un H^+ (que se fija sobre el carboxilo del Glu 35) (c), son los pasos por los cuales se realiza la catálisis.

Actualmente se conocen los mecanismos catalíticos de algunas enzimas más incluyendo las proteasas de tipo tiol como la papaína, que poseen una CySH en su sitio activo.

Los ejemplos anteriores además de describir en detalle los mecanismos moleculares por los cuales se realiza la catálisis enzimática, nos sirven para ilustrar la estrecha correlación existente entre la estructura y la función de las enzimas.

Es evidente que aún pequeños cambios conformacionales, que resultan en variaciones de las distancias y posiciones espaciales de los grupos activos de la enzima con respecto al sustrato, pueden modificar apreciablemente la función catalítica (o reguladora) de la enzima.

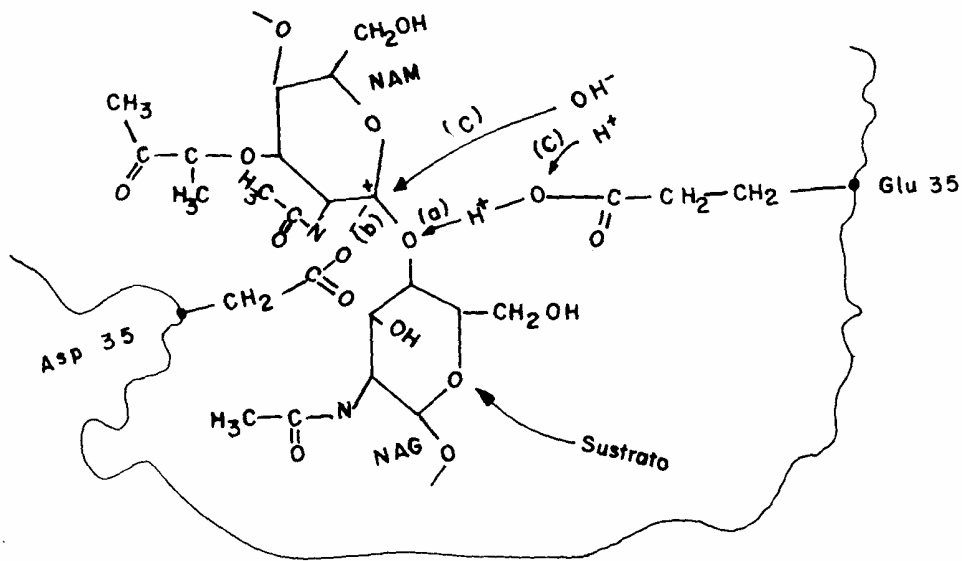


Figura 27: Sitio activo de la lisozima

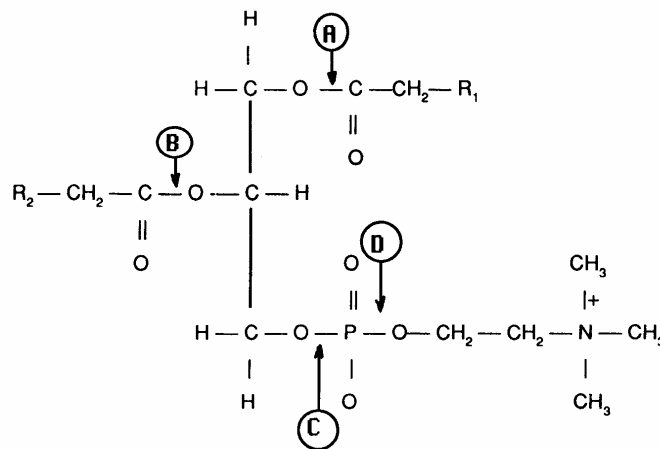
Actividad 3

1. Si se tiene el péptido indicado. Cuáles serán los fragmentos resultantes del ataque con:

- Quimotripsina
- Carboxipeptidasa A (2 ataques sucesivos)
- Tripsina
- Aminopeptidasa (3 ataques sucesivos)
- α - amilo-1, 6-glicosidasa

Glu-Leu-Ala-Phe-Arg-Met-Val-Lys-His-Trp-Gly-Ala

2. En la subclase de las esterases se encuentran las fosfolipasas A,B,C y D que atacan las lecitinas en los sitios indicados:



¿Cuál de las características de la acción enzimática se evidencia en este caso?
 ¿Cuáles serían los fragmentos resultantes en cada caso? Nómbralos.

3. Al frente de cada una de las siguientes enzimas coloque la clase y subclase a la que pertenecen.

Enzima	Clase	Subclase
Tripsina		
Quimotripsina		
α -amilasa		
Lisozima		
Carboxipeptidasa		
Lipasas		
Celulasa		

4. En la hidrólisis de β - Glicerofosfato con fosfatasa intestinal (pH 9,2 a 37°C), se determinó el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. La determinación del fósforo resultante a los 20 minutos de hidrólisis se realizó colorimétricamente obteniéndose los siguientes datos:

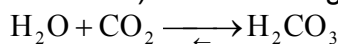
(β -glicerofosfato) μ moles/ml	(Fosfato) nano moles/ml (10^{-9} moles/ml)
2	186.7
3	311.2
8	470.1
12	646.6
16	706.5
20	742.9
40	1189.7

Calcule la velocidad para cada concentración de sustrato, y con el método de Lineweaver-Burk determine los valores de K_M y V_{max} .

5. En una preparación de α -amilasa bacteriana se encuentra que 1,4 mg de proteína producen a partir de almidón, 35 milimoles de maltosa en 12 minutos, realizando la experiencia en un buffer de pH 6,9 a 30°C.

Calcule la actividad específica, teniendo en cuenta que para esta enzima la unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que libera (a partir de almidón) 1 μ mol de maltosa/ min a pH 6,9 y 30°C.

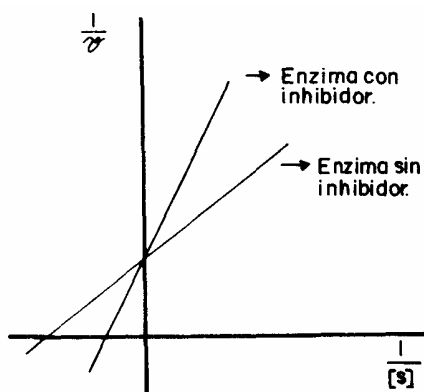
6. La anhidrasa carbónica (PM 30.000.) cataliza la siguiente reacción:



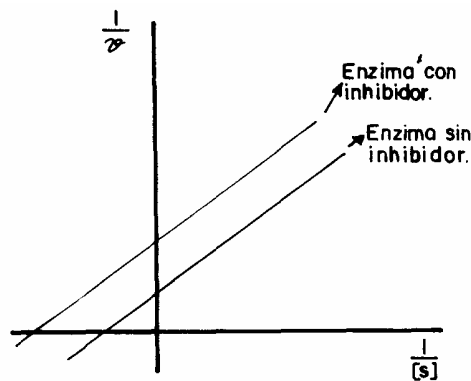
Si 75 μg de enzima pura catalizan la hidratación de 2,28 g de CO_2 en 1 minuto a 37°C , ¿cuál es el número de transformación de la misma?

7. Teniendo en cuenta las características de los diferentes tipos de inhibición, deduzca de cada una de las siguientes gráficas:

- Tipo de inhibición
- Cómo cambian los valores de K_M y V_{max} respecto a los obtenidos sin inhibidor. ¿De qué otra manera podría representar gráficamente estas inhibiciones?



Gráfica 1



Gráfica 2

8. Muestre cuáles de los siguientes sustratos son atacados por las enzimas indicadas:

Sustrato	Enzima
a. Hb	1. Fosfatasa
b. Amilosa	2. Oxidorreductasa
c. Triglicérido	3. Quimotripsina
d. Lisozima	4. Lipasa
e. Celulosa	5. α 1,4-glicosidasa
f. Insulina	6. Carboxipetasa

¿Cuáles son los productos resultantes en cada caso?

Autoevaluación No. 6

- Escriba las características que sirven para identificar la acción de las enzimas. ¿Dé ejemplos en cada caso?
- Teniendo en cuenta el tipo de reacción que catalizan, ¿cómo se pueden clasificar las enzimas?
- Analice las diferentes zonas que se pueden presentar en la catálisis enzimática.

4. ¿Cómo se pueden caracterizar cinéticamente las reacciones enzimáticas? Explique el significado físico de los parámetros involucrados en este análisis.
5. Explique cómo influyen el pH, la temperatura y los efectores en la actividad de las enzimas.
6. Compare entre sí los distintos tipos de inhibición enzimática
7. Dé ejemplos de algunos de los sitios activos mejor conocidos, identificando la enzima correspondiente.

Lecturas recomendadas

Usted puede profundizar algunos de los temas estudiados en este capítulo consultando las siguientes referencias:

1. Enzyme Kinetics /R.A. Alberty. -- **Advances in Enzymology**. -- Vol 17, 1956.-
- p1
2. La estructura tridimensional de una enzima / D.C. Phillips.- -En: Las bases moleculares de la vida/ R.H. Haynes; P:L. Hanawalt.- - San Francisco: Freeman Co, 1968.
3. Serine proteases. Structure an mechanism of catalysis /J.Kraut.- - **Annual Review Biochemistry**. -- Vol 46, 1977.-- p331
4. Biochemistry / D. E. Metzler. -- New York: Academic press, 1977.-
- p 374-379.

UNIDAD 2: ÁCIDOS NUCLÉICOS Y BIOENERGÉTICA

CAPÍTULO 1: ÁCIDOS NUCLEICOS

Objetivos

- Diferenciar las clases de ácidos nucleicos existentes con base en sus propiedades estructurales y funcionales.
- Identificar los nucleótidos constitutivos de los ácidos nucleicos.
- Explicar las características de los diferentes niveles estructurales del DNA.
- Reconocer las diferencias más notorias en lo referente a la complejidad y organización supramacromolecular del DNA en virus, procariotes y eucariotes.
- Describir las características más notables de la estructura primaria, secundaria y terciaria del t-RNA.

WATERMATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 7

1. Cuál es el significado de los términos:
 - a. Bases purínicas
 - b. Desoxirribosa
 - c. DNA
 - d. Bases pirimidínicas
 - e. Nucleótido
 - f. RNA
2. ¿Cuál es la importancia del DNA?
3. Explique cuál es la relación existente entre genes, DNA y herencia.
4. Dado que las purinas y pirimidinas son bases orgánicas, ¿cuáles propiedades químicas podría asignarles usted?
5. En cuáles partículas subcelulares se localizan el DNA y el RNA en:
 - a. Bacterias
 - b. Hongos
 - c. Células animales y vegetales (células eucarióticas)
6. Explique las características más importantes de la estructura en α -hélice.
7. ¿Cuál es el significado del término unidad de repetición?

MATERIAL
EN
REVISIÓN

1 Características generales y clases

Los ácidos nucleicos tienen, en términos generales, la función de conservar y transmitir el mensaje genético que caracteriza cada organismo vivo. La expresión tangible de ese mensaje se realiza a través de la síntesis de proteínas que actúan como catalizadores, componentes estructurales, funcionales o reguladores en el organismo.

Los conceptos anteriores son una síntesis que involucra múltiples procesos de gran complejidad que iremos discutiendo a lo largo de varios capítulos. Por lo tanto, trataremos de exponer en ésta las características y las propiedades estructurales más sobresalientes de los ácidos nucleicos.

Estos biopolímeros se caracterizan por poseer (con excepción de una clase de RNA) pesos moleculares muy elevados que se sitúan entre 10^6 y 10^9 daltons. Esto ya los diferencia de las proteínas (cuyos pesos moleculares rara vez superan los 5×10^5 daltons) y de los polisacáridos (con PM menores o iguales a 10^6 daltons).

Debido a la presencia de un altísimo número de grupos fosfato, los ácidos nucleicos tienen una gran densidad de carga negativa y en consecuencia se comportan como polianiones, esta carga se neutraliza, según sea el tipo de ácido nucleico, con poliaminas, histonas o Mg^{+2} .

La hidrólisis completa de los ácidos nucleicos produce característicamente:

- Bases purínicas y pirimidínicas.
- Pentosas correspondientes a la ribosa o desoxirribosa.
- Grupos fosfato.

Tomando como criterios su composición química y función, además de otras propiedades, los ácidos nucleicos se pueden diferenciar en dos grandes tipos:

- El ácido desoxirribonucleico o DNA (o ADN).
- El ácido ribonucleico o RNA (o ARN).

La tabla 13 nos muestra las diferencias existentes en términos de los parámetros indicados. Las diferencias señaladas son aplicables a las moléculas de DNA y RNA aisladas de la célula por los procesos convencionales ya que existen excepciones como son los precursores de RNA cuyo tamaño y localización original, difieren de los RNA clásicos que discutiremos más adelante.

2 Estructura de bases, nucleósidos y nucleótidos

Para comprender mejor la estructura y las propiedades de los ácidos nucleicos es conveniente discutir previamente las estructuras de sus constituyentes.

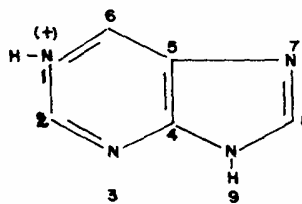
Parámetro	DNA	RNA
Composición - Pentosa - Bases	Deoxirribosa Timina	Ribosa Uracilo
PM (daltons)	$10^6 - 10^9$	$\leq 10^8$
Función	Conservación del mensaje genético.	Expresión del mensaje genético
Localización	98% en zona nuclear, 2% extracromosomal	Variada según la clase de RNA

Tabla 13: Diferencias entre DNA y RNA

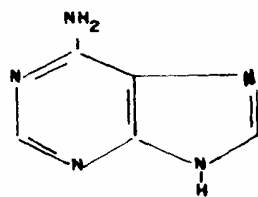
2.1 Bases

En lo referente las bases nitrogenadas tenemos dos estructuras fundamentales de donde se derivan todas las bases constituyentes:

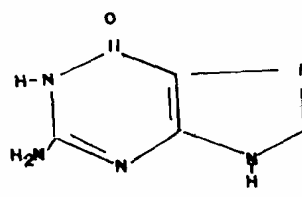
- Bases purínicas, llamadas así por ser la purina la base original, que da lugar a la Adenina (abreviada A) y Guanina (G) como bases comunes (o muy frecuentes).



Purina



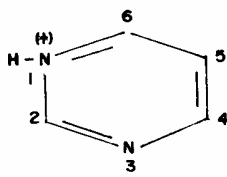
Adenina (A)



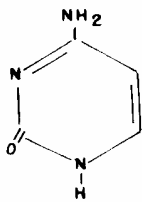
Guanina (G)

Estas bases se encuentran tanto en DNA como en RNA.

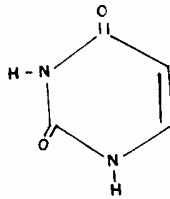
- Bases pirimidínicas, originadas en la pirimidina que genera como bases comunes la Citosina (C); Uracilo (U) que es característico del RNA y Timina (T) que se encuentra en el DNA.



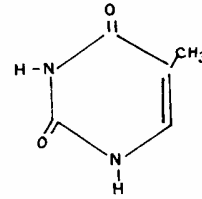
Pirimidina



Citosina (C)

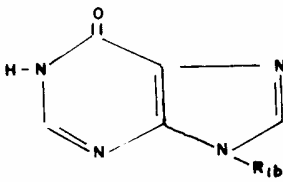


Uracilo (U)

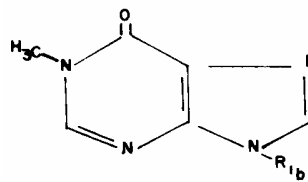


Timina (T)

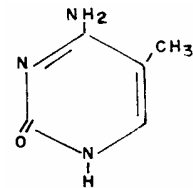
Además de las bases anteriores, se encuentran con alguna frecuencia, especialmente en algunas clases de RNA, las llamadas raras (o poco frecuentes). Generalmente estas bases son derivadas metil, hidroximetil o productos de oxidación o reducción de las bases comunes. Como ejemplos podemos citar:



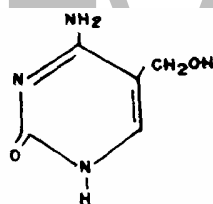
Inosina (I)



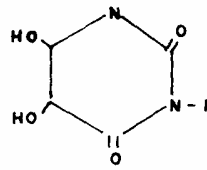
1-Metil-I (Me-I)



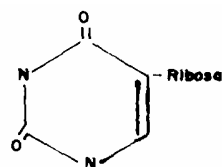
5-metil-C (5-Me-C)



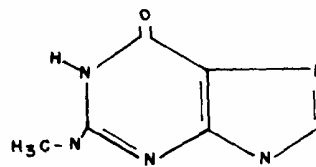
5 Hidroximetil-G (5-OHMe-G)



Dihidrouridina (DHU)



Seudo uridina (ψ)

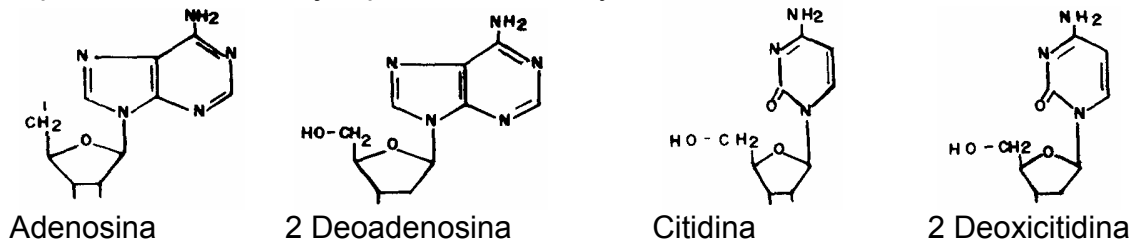


2 Metil-Guanina (2Me-G o G*)

Más adelante veremos cuál es la importancia de estas bases raras. Es conveniente señalar que todas las moléculas anteriores tienen carácter básico y corresponden al tipo de aminas aromáticas.

2.2 Nucleósidos

Se forman por la unión de una pentosa (ribosa o deoxirribosa) a una base purínica o pirimidínica a través de un enlace N-glicosídico en las posiciones 9 y 3 respectivamente. Por ejemplo con Adenina y Citosina tendríamos:

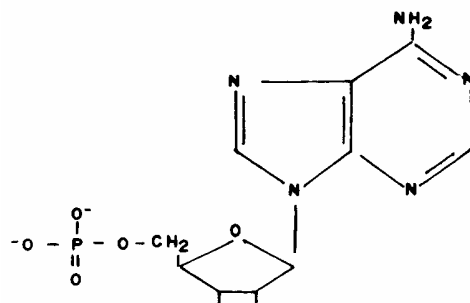


Los nucleósidos con U, T y G son respectivamente: Uridina (o deoxi-Uridina), Tímidina (o deoxi-Tímidina) y Guanosina (o deoxi-Guanosina).

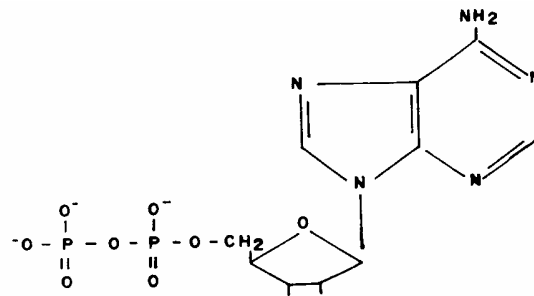
2.3 Nucleótidos

Resultan de la esterificación de un nucleósido por uno o varios grupos fosfato ^(f). Los nucleótidos biológicamente más importantes portan el fosfato en el OH-5' y por convención cuando no se especifica la posición del fosfato, se sobreentiende que está en 5'. Dependiendo del número de grupos que intervengan, se pueden obtener los nucleótidos AMP, ADP y ATP, a partir de la adenosina.

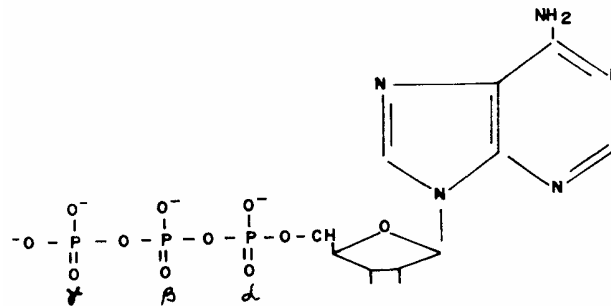
En el caso del trifosfonucleótido la posición relativa de los grupos ^(f) se indica con α , β y γ ; los deoxirribonucleótidos (formados con deoxirribosa) serán entonces d-AMP, d-ADP y d-ATP.



Adenosin monofosfato \equiv AMP



Adenosin difostato \equiv ADP



Adenosin trifostato \equiv ATP

De una manera análoga tendremos GMP, CMP, UMP, GDP, CDP, etc.

Los monofosfonucleótidos (AMP, GMP, CMP, UMP, TMI) son los bloques constituyentes de los diferentes tipos de ácidos nucleicos en forma similar a como los AA son los bloques constituyentes de los péptidos y proteínas; los otros nucleótidos (di, tri y aún tetra) intervienen, como lo veremos en capítulos posteriores, activamente en innumerables reacciones del metabolismo y como precursores en la síntesis de los ácidos nucleicos.

3 Estructura del DNA

En el DNA podemos identificar tres niveles de organización estructural definidos en forma similar a la utilizada con las proteínas. Dado que el DNA proveniente de virus y bacterias es menos complejo que el DNA de células eucarióticas y se puede obtener más fácilmente y en mayor cantidad, se ha avanzado mucho más en los estudios estructurales del DNA de procariotes.

3.1 Estructura Primaria

Tal como lo mencionamos antes, la hidrólisis total del DNA produce grupos fosfato, bases purínicas (A, G) y pirimidínicas (C, T) y deoxirribosa; la hidrólisis química proporciona poca información pues el DNA es resistente a los álcalis y el tratamiento con ácidos causa frecuentemente una depurinación o sea la pérdida de las bases purínicas.

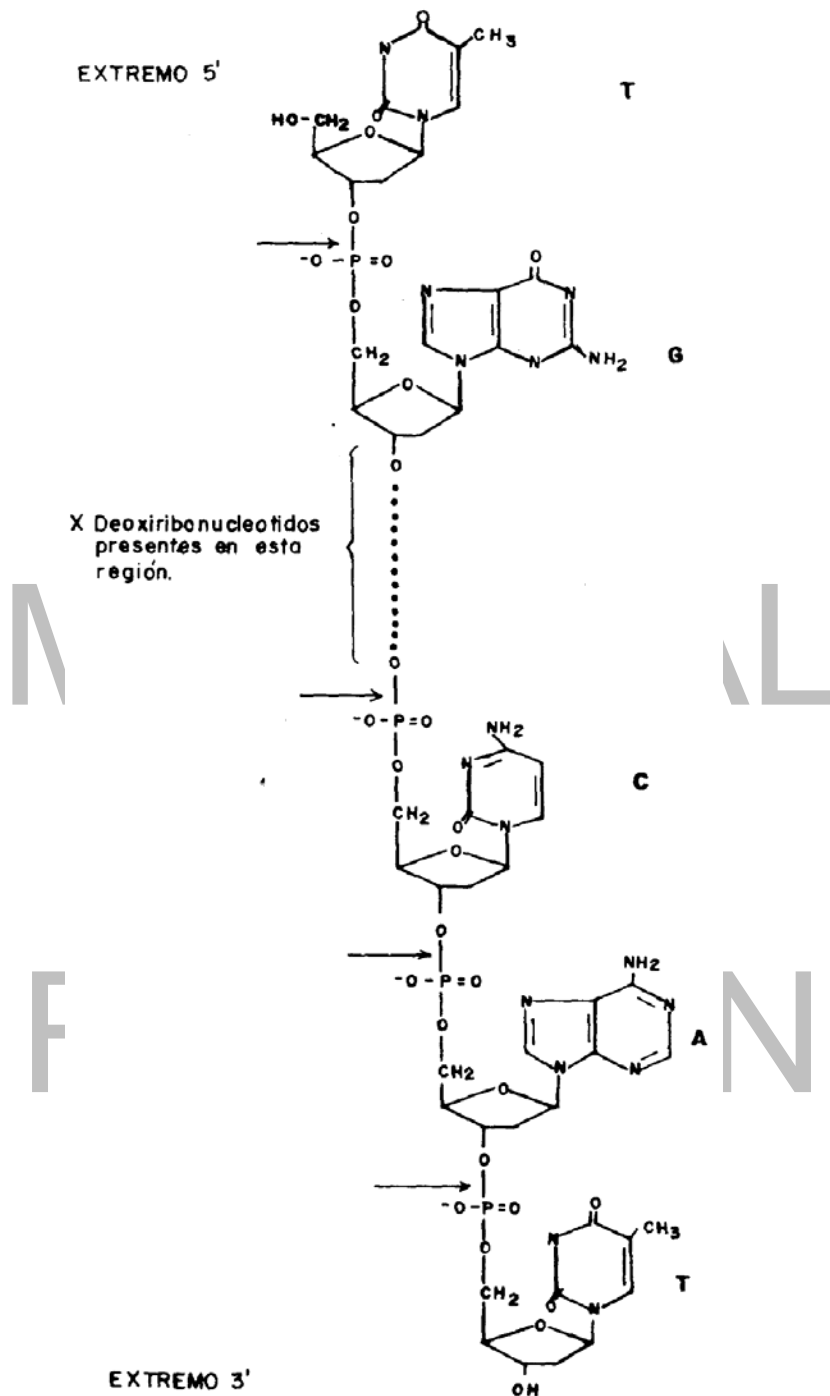


Figura 28: Estructura fundamental de un segmento de una cadena de DNA

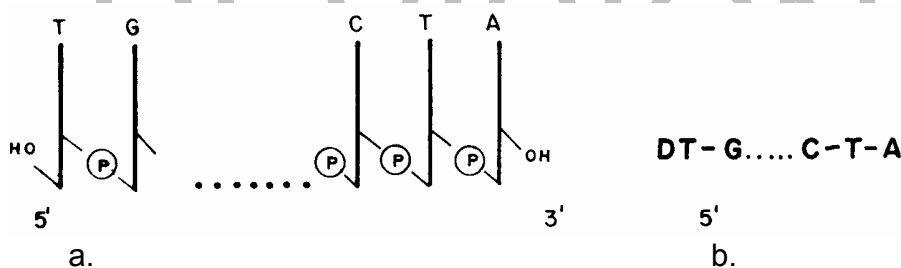
Por ello los datos disponibles sobre la composición en bases han sido obtenidos empleando diversas enzimas con diferente especificidad; se usan endonucleasas (atacan al interior de la molécula) del tipo de las fosfodiesterasas o de las

deoxirribonucleasas (DNAsa) 1 y II y exonucleasas (atacan en las extremidades 3' y 5' de la molécula respectivamente) de tipo a o b. El análisis de los productos de hidrólisis resultantes en cada caso (oligonucleótidos, deoxirribonucleótidos con P en 3', deoxirribonucleótidos con P en 5', etc) ha permitido deducir que la estructura básica de una cadena (o banda) de DNA consiste en la sucesión de mononucleótidos unidos entre sí por enlaces fosfodiéster. La figura 28 ilustra esta situación para un fragmento muy pequeño de una cadena de DNA, con una secuencia hipotética.

Al observar esta figura notamos varias cosas:

- Cada deoxirribosa, con excepción de las terminales, está formando enlaces éster con P a través de sus hidroxilos 3' y 5'. Si imaginamos la acción de una enzima capaz de romper en la posición 3' indicada por las flechas tendríamos al final una mezcla de nucleótidos 5' P y un nucleósido.
- Uno de los extremos corresponde a la deoxirribosa con su OH- 5' no esterificado (extremo 5') y el otro a la pentosa con su OH- 3' libre (extremo 3'). Por convención se considera que la cadena comienza en su extremo 5' libre y termina en su extremo 3' libre.
- Por cada nucleótido presente hay un grupo fosfato con una carga negativa, lo que significa que en un DNA con 1.000 nucleótidos (que sería un DNA muy pequeño) tendremos una altísima densidad de cargas negativas.

La estructura de la figura 28 podemos representarla de varias maneras todas simplificadas:



En (a) la deoxirribosa se indica por la línea vertical con las posiciones 5' y 3' y las bases unidas al azúcar se indican con sus abreviaturas correspondientes. En (b) sólo se muestra el orden de las bases indicando con d que se trata de una cadena formada con deoxirribosa y se sobreentiende que las bases no se unen directamente sino que el esqueleto de la cadena es la sucesión ...deoxirribosa-fosfato-deoxirribosa-fosfato.

Los estudios comparativos realizados por el grupo de Chargaff con DNA de diferentes especies permitieron establecer dos hechos muy interesantes que se conocen como las reglas de Chargaff. El primero consiste en que la cantidad de Adenina es igual a la de Timina y la de Guanina igual a la de Citosina; esto se pudo explicar posteriormente cuando se determinó la estructura secundaria y terciaria del DNA. La segunda regla de Chargaff consiste en que la relación $(A+T) / (G+C)$ posee un valor constante para cada especie y se usa como un criterio para la determinación de especies (bacteriales, animales o vegetales).

El establecimiento de la secuencia de nucleótidos del DNA ha sido muy difícil debido al gran tamaño de la molécula ($PM >10^6$), a la complejidad de los hidrolizados y a la ausencia de segmentos distintivos por no haber sino cuatro bases diferentes. La estrategia es similar a la empleada con las proteínas empleando marcación con radioisótopos, rupturas químicas y enzimáticas específicas y separación y caracterización de los fragmentos.

Recientemente y gracias a nuevas técnicas ha sido posible determinar la secuencia compleja de un virus y la de varios genes de procariotes. En el caso de los eucariotes la mayor complejidad del genoma ha dificultado considerablemente la determinación de secuencias del DNA.

3.2 Estructura secundaria y terciaria

La elucidación de la estructura espacial del DNA fue posible gracias a la información química disponible (1ª y 2ª reglas de Chargaff) y a la suministrada por el análisis por rayos X de las preparaciones para-cristalinas de DNA. Se demostró la existencia de estructuras ordenadas con una unidad de repetición muy estable de 3,4 Å y otra más débil de 34 Å; la cual se parecía a algunas α -queratinas.

Integrando la información disponible y con la ayuda de modelos moleculares, Watson y Crick en 1953, propusieron un modelo tridimensional que luego fue comprobado experimentalmente. El modelo postula que el DNA está formado por dos cadenas enrolladas helicoidalmente entre sí, mantenidas y estabilizadas por la formación de puentes de H_2 entre pares de bases llamadas complementarias, situadas cada una en una banda.

Considerando el tamaño de las bases, el diámetro de la fibra de DNA (20 Å) y la estructura de las bases, se propuso que los pares de bases son A: T (unidos por dos puentes de H_2) y G: C (unidos por tres puentes de H_2); la figura 29 nos muestra cómo se establecen los puentes de H_2 entre las bases complementarias.

Los pares de bases se disponen perpendicularmente al eje de la molécula en número de 10 por cada vuelta de la hélice, que corresponde a la distancia de la unidad de repetición más débil, encontrándose superpuestas con una separación entre cada par del orden de 3,4 Å.

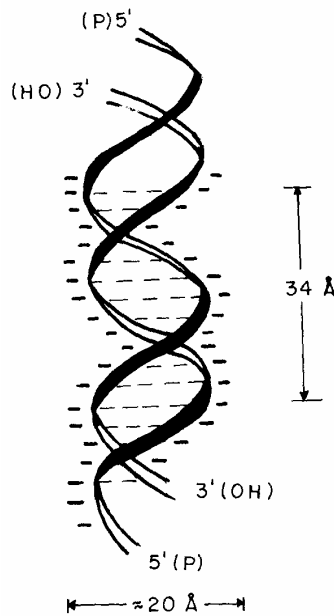


Figura 30: Estructura en doble hélice del DNA

4 Complejidad y estructura supramacromolecular del DNA en el genoma

La complejidad y localización del DNA varía según sea la entidad funcional (virus, procariotes o eucariotes) que consideremos.

En los virus cuyo material genético es DNA (generalmente virus animales o bacteriales y algunos vegetales) tenemos una forma circular donde se han unido los extremos 3' y 5 y en la mayoría están presentes las dos bandas de DNA; en unos pocos por ejemplo: virus Ø x 174 sólo hay una banda y por ello son una excepción a la primera regla de Chargaff pues no existe el apareamiento A : T y G : C. La circunferencia de estos DNA virales (determinada por microscopia electrónica) es mayor que la partícula viral completa; esto implica que el DNA en el virus está empacado en forma muy compacta y recubierta por las proteínas virales de envoltura. El peso molecular de los DNA oscila entre 3 y 120×10^6 lo que facilita el estudio de su secuencia.

En las células procanóticas el DNA es circular, de doble banda y se encuentra anclado en un punto a la membrana celular estando en contacto con el material citoplasmático; asociados a este único cromosoma se hallan enzimas, poliamidas o Mg^{+2} y el DNA existe en una forma superenrollada muy compacta. Los pesos moleculares son considerables, ej. 2.600×10^6 para el DNA de *E. coli*, teniendo la molécula varios millones de bases apareados.

Además de este DNA cromosomal puede haber DNA adicional, más pequeño y también circular, que son los llamados plásmidos; ellos son portadores de unos

pocos genes que confieren a la bacteria ciertas características como la resistencia a los antibióticos.

En los eucariotes la gran mayoría del DNA (aproximadamente 98%) forma parte de la cromatina en el núcleo y el resto está en partículas como las mitocondrias o cloroplastos; éste DNA extranuclear es diferente del nuclear respecto a su composición, propiedades físicas como densidad, viscosidad, etc y asociación con proteínas. En la cromatina el DNA lineal (35%) se asocia con histonas (60% en total) y proteínas ácidas y RNA (5%) dando lugar a una estructura muy compacta con una organización espacial no muy bien conocida.

Una ilustración del grado de compactación se deduce del hecho de que el DNA de una célula eucariote con un diámetro de 10-20 μm , si estuviera extendido tendría una longitud de 2 metros. Cada cromosoma tiene un DNA 4 a 100 veces mayor que el DNA de E.coli, lo que hace que las células humanas tengan 600 veces más DNA que la E.coli.

Los datos anteriores nos muestran la enorme complejidad organizacional que tiene el DNA eucariótico y por ello su estudio es uno de los grandes temas de la biología molecular actual.

5 RNA: Clasificación

Tradicionalmente el RNA se ha clasificado tomando como criterio las especies moleculares más o menos estables, aisladas de la célula por procedimientos de laboratorio bien establecidos.

Estos RNA se dividen en tres clases:

- **t-RNA o RNA de transferencia.** Se encuentra en el citoplasma celular en forma libre o asociado a un AA dado; en consecuencia existen unas 20 especies moleculares distintas; es el más pequeño de los ácidos nucleicos ya que su peso molecular está en el rango 7.000 a 8.000 y se puede aislar con cierta facilidad por ser estable.
- **m-RNA o RNA mensajero.** Se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma como una mezcla muy compleja de moléculas cuyos PM oscilan entre 5×10^5 y 1×10^6 ; esta clase de RNA es bastante lábil y por tanto muy difícil de aislar.
- **r-RNA o RNA ribosomal.** Se localiza en los ribosomas de procariotes y de eucariotes donde representa aproximadamente un 50% del total de estas partículas subcelulares. Hay tres tipos de r-RNA diferentes cuya complejidad (en razón de su mayor tamaño) es mayor en los eucariotes que en los procariotes; algunos r-RNA pueden tener PM entre 5×10^5 y 2×10^6 .

Además de estos tres tipos de RNA que podríamos considerar como los RNA clásicos, se han identificado recientemente otros RNA presentes en el núcleo cuyo período de vida es muy corto y que parece actúan como precursores de los RNA clásicos o durante la síntesis de DNA (Hn-RNA, c-RNA).

Por otra parte, hay una gran cantidad de virus cuyo maten genético es RNA, tales como los bacteriófagos F2, MS2, R17 y Q β cuyo estudio ha permitido entender mejor cómo actúan estos virus y cuáles enzimas están involucradas en su biosíntesis y regulación.

6 Estructura del RNA

De manera análoga a lo discutido con el DNA, el RNA posee estructura primaria, secundaria y terciaria cuyas características son intensamente estudiadas en la actualidad. Los trabajos iniciales se adelantaron indistintamente con las tres clases de RNA y posteriormente para estudiar en detalle la organización estructural se seleccionó el t-RNA puesto que su menor tamaño, estabilidad y relativa facilidad de purificación constituían ventajas apreciables en comparación con las otras clases de RNA.

6.1 Estructura primaria

Aun cuando el RNA es susceptible a la hidrólisis básica, debido a la ribosa presente, el ataque por enzimas como la ribonucleasa (RNAsa), fosfodiesterasas y exonucleasas proporcionan la información que nos permite representar la estructura fundamental del RNA, figura 31.

Como características sobresalientes de la estructura primaria del RNA podríamos citar las siguientes:

- La formación de enlaces fosfodiester se hace a través de los hidroxilos 3' y 5' de la ribosa, quedando siempre libre el hidróxilo 2'; lo cual implica una estructura lineal sin que haya ramificaciones.
- El sentido de la cadena se define igual a lo ya explicado con el DNA (dirección 5' \rightarrow 3').
- La molécula es un polianión con muchas cargas negativas.
- La composición en bases no sigue las reglas de Chargaff y las bases raras son especialmente abundantes en el t-RNA (aproximadamente un 20%).

La secuencia de nucleótidos ha sido establecida en el RNA del virus R17 y en numerosos t-RNA. En otros RNA se conocen fragmentos de su secuencia pero su gran tamaño y las dificultades encontradas en su purificación no han permitido avanzar en estos aspectos.

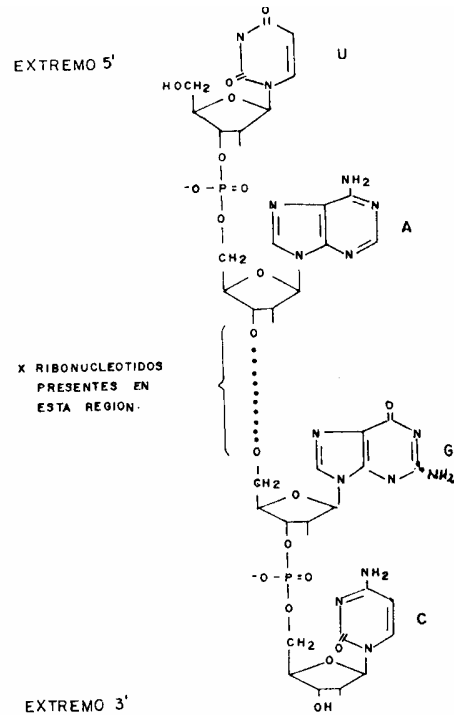


Figura 31: Estructura fundamental de un segmento de RNA

6.2 Estructura secundaria y terciaria

La comparación de secuencias de muchos t-RNA ha sido posible gracias a los trabajos de Holley y ha permitido establecer una estructura general llamada hoja de trébol que se ilustra en la figura 32.

Esta representación estructural es puramente bidimensional y no corresponde, como veremos más adelante, a la conformación de la molécula. Sin embargo su utilidad reside en que permite precisar las siguientes características que son comunes a todos los t-RNA:

- Aunque no hay sino una sola banda con 75-80 nucleótidos (a diferencia del DNA) hay tres segmentos o brazos en que las bases complementarias A : U y G : C forman puentes de H₂, contribuyendo así a estabilizar la estructura.
- Las regiones donde se encuentran las bases raras (G* ψ, DHU) no muestran apareamiento de bases, debido a los sustituyentes de las bases raras, y reciben el nombre de bucles. En uno de los tres bucles existentes se encuentra el triplete de bases que constituye el anticodon que determina cuál AA se une al t-RNA.
- El extremo 3' siempre tiene la secuencia A-C-C y allí se fija el AA que es transportado específicamente por un t-RNA dado.

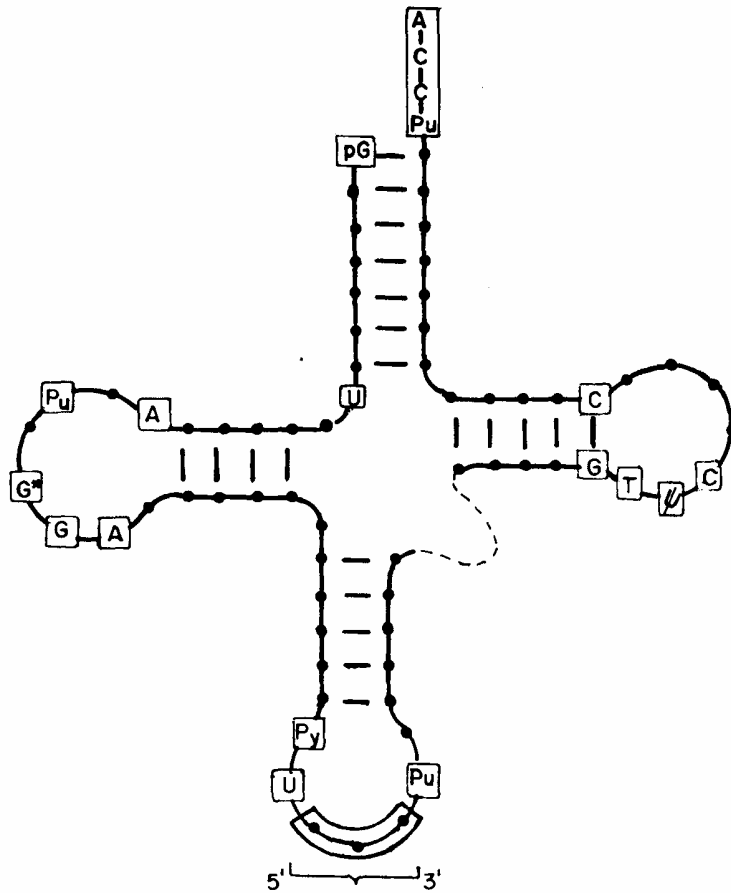


Figura 32: Estructura general en hoja de trébol de t-RNA

Los estudios de difracción de rayos X realizados por el grupo de Rich sobre t-RNA para Phe han mostrado que la molécula tiene una estructura terciaria más parecida a una L invertida y retorcida, que a una hoja de trébol. La figura 33 es una representación simplificada de la estructura terciaria del t-RNA.

En esta representación los brazos, con sus bases complementarias; se indican por las zonas sombreadas y los bucles, por las zonas claras.

La comprensión del funcionamiento de estos t-RNA en la biosíntesis de proteínas, que discutiremos posteriormente, ha sido considerablemente facilitada por estos estudios estructurales. Sin embargo hoy en día se sabe muy poco sobre la organización estructural de m-RNA y r-RNA, debido probablemente a la carencia de técnicas adecuadas para estudiarlas.

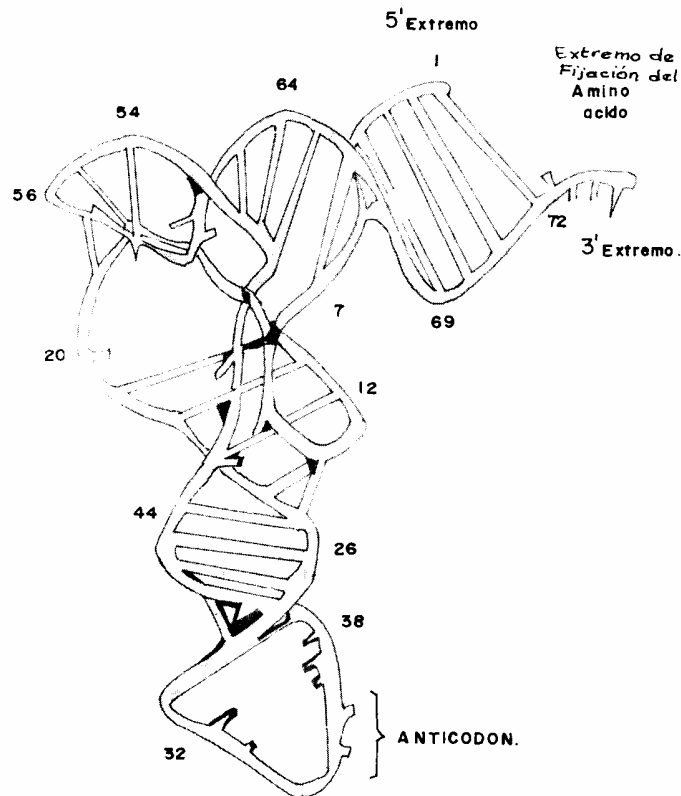


Figura 33: Estructura terciaria del t-RNA para Phe

Actividad 4

1. Elabore una lista de los productos resultantes de la hidrólisis completa del DNA y del RNA.
2. Compare las estructuras de los siguientes compuestos en el orden indicado:

Adenina
Uracilo
Limina
Guanina

Adenosina
Uridina
Timidita
Guanosina

AMP
UDP
TDP
3' GMP

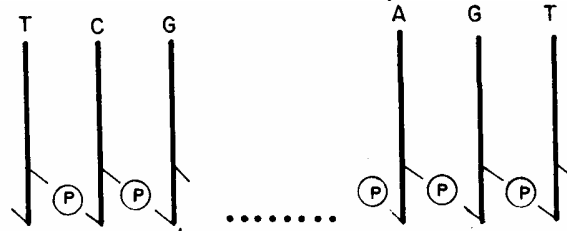
- a. Base vs nucleósido vs nucleótido
- b. Nucleótidos entre sí

Recuerde como se originan los nucleósidos y como se forman los monofosfo y ditosfonucleótidos.

3. Elabore una lista de los nucleótidos que se encuentran en el DNA y en el RNA. Explique las diferencias existentes entre unos y otros. Tenga en cuenta que

hay nucleótidos comunes y nucleótidos que son propios de cada clase de ácido nucleico.

4. A partir de la estructura simplificada del segmento de DNA represente la estructura química correspondiente. Note que el OH⁻ 5' libre está en el extremo izquierdo, de acuerdo con la convención adoptada.



5. Las estructuras en α -hélice y en doble hélice ¿son iguales? Compárelas construyendo una tabla que incluya las macromoléculas que poseen cada una de ellas, los tipos de enlaces presentes, las biomoléculas que se forman y las propiedades más importantes de cada una.
6. ¿Cómo se localizan en la célula los diferentes tipos de RNA? Señale las diferencias existentes entre ellos en relación con su tamaño, estabilidad y heterogeneidad.

Autoevaluación No. 8

- Compare el DNA y el RNA respecto a su composición global, tamaño, función general y distribución subcelular.
- Asocie cada una de las siguientes moléculas con el (los) tipo(s) de estructura(s) correspondiente(s). Puede usarlo una vez, varias veces o ninguna vez.

Molécula	Tipo de estructura
a. CDP	1) Nucleósido
b. CMP	2) Base purínica
c. Timidina	3) Bloque constituyente de DNA
d. UMP	4) Deoxirribonucleótido
e. d-CMP	5) Bloque constituyente de RNA
f. Guanina	6) Difosfonucleótido
g. d-TMP	7) Base pirimidínica

3. Establezca la correspondencia entre las moléculas y la(s) estructura(s) en que se encuentran presentes:

Molécula	Estructura
a. Ribosa	a) Trifosforribonucleótido
b. AMP	b) RNA
c. d-GMP	c) Trifosfodeoxirribonucleótido

d. ATP

e. Grupo fosfato

d) Nucleósido

e) DNA

4. Compare la estructura primaria fundamental del DNA con la del RNA.
5. ¿Porqué la estructura en doble hélice del DNA permite explicarla primera regla de Chargaff y los valores obtenidos para las unidades de repetición? Esquematice esta estructura indicando los apareamientos que se presentan.
6. Explique cómo se organiza el DNA en virus, procariotes y eucariotes.
7. Ilustre las características más sobresalientes de las estructuras secundaria y terciaria del t-RNA.

Lecturas Recomendadas

Para ampliar sus conocimientos en algunos de los aspectos específicos tratados en este capítulo, consulte las siguientes referencias:

1. La estructura del material hereditario /F.H.C., Crick.- - En: Las bases moleculares de la vida: Lecturas del Scientific American / Julio R Villanueva.- - Madrid: Blume, 1971.- - p.86.
2. La estructura de los virus / R. W. Horne. - - En: las bases moleculares de la vida.- - Ibid., p155.
3. The genetic activity of mitochondria and chloroplasts / U. W. Goodenough, R.P. Levine.- - Scientific American.- - Vol.223, 1970.- - p22.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

CAPITULO 2: INTRODUCCION AL METABOLISMO Y BIOENERGETICA

Objetivos

- Explicar las principales actividades que se desarrollan en el metabolismo.
- Ilustrar los principios de compartimentalización y universalidad de las vías metabólicas.
- Reconocer las diferencias existentes en la utilización de la energía y los elementos en la biósfera.
- Identificar los factores que controlan el metabolismo en una célula.
- Utilizar conceptos termodinámicos para predecir la dirección de las reacciones metabólicas.
- Analizar el papel del ATP en las reacciones de fosforilación.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 9

1. ¿Cuál es la diferencia entre organismos autotróficos y heterotróficos?
2. ¿Cuál es el significado en términos descriptivos (no matemáticos) de entalpía, entropía y energía libre?
3. ¿Cómo se puede calcular el cambio en energía libre a partir de la constante de equilibrio de una reacción?
4. ¿Cómo se relaciona el cambio en energía libre con la diferencia de potenciales de reducción estándar de una reacción de óxido-reducción?
5. ¿Cuál es la transformación global que ocurre en la fotosíntesis?

MATERIAL

1 Aspectos generales del metabolismo

El metabolismo es un conjunto altamente integrado de sistemas multienzimáticos que en su forma más sencilla se localizan en la célula y realizan un intercambio permanente de energía y materia con el medio ambiente. Para la discusión posterior vamos a considerar a la célula como el modelo de un organismo vivo y, a menos que se especifique lo contrario, los emplearemos como términos equivalentes.

Podemos considerar que el metabolismo desarrolla cuatro actividades fundamentales:

- Obtiene energía bien a partir de la luz solar, a través de procesos fotosintéticos, o bien a partir de compuestos químicos gracias a reacciones de óxido-reducción.
- Transforma los nutrientes exógenos en sustancias precursoras de las biomoléculas y/o de las macromoléculas. Las diferencias en cuanto a la fuente de donde toman estos nutrientes es lo que nos permite dividir los organismos vivos en autotróficos y heterotróficos.
- Sintetiza (reacciones anabólicas) o degrada (reacciones catabólicas) las biomoléculas por ejemplo: aminoácidos, monosacáridos, lípidos, etc., que necesita para realizar las funciones específicas del organismo.

- Degrada o sintetiza las macromoléculas (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos etc.) que le permiten construir, hacer funcionar o regular el organismo ya sea unicelular o multicelular.

Un aspecto muy importante del metabolismo es lo que se conoce como la universalidad de las vías del metabolismo. Esto significa que las vías metabólicas fundamentales comunes son muy similares en los diferentes organismos vivos ya sean procarióticos o eucarióticos, unicelulares o multicelulares, animales o vegetales. Es previsible que existan pequeñas diferencias entre unas y otras en cuanto a algunas reacciones en particular pero esto no afecta de modo notable ni la transformación global del metabolismo en cuestión, ni la producción o consumo (según el tipo de vía involucrada) de energía.

Esta característica de universalidad de las vías facilita muchísimo el estudio de un organismo vivo en particular y permite localizar rápidamente aquellas reacciones (o vías) que le son propias.

Otra característica del metabolismo reside en el hecho de que la mayoría de los sistemas enzimáticos están localizados en una partícula subcelular dada (u organelo), lo cual facilita la coordinación espacial y temporal de las diferentes vías.

Esta compartimentalización permite la ocurrencia simultánea de vías opuestas (ejemplo: síntesis y degradación de lípidos) dentro de la misma célula y el control de las actividades intracelulares.

Existen varios factores que regulan el metabolismo de una célula:

- Necesidades energéticas. La célula parece operar bajo el principio de la máxima economía y es así como no produce o consume sino el mínimo de energía requerida; es decir desperdicia la menor cantidad posible de energía.
- Condiciones que regulan la actividad enzimática, tales como pH, temperatura y efectores.
- Existencia de enzimas reguladoras. El papel de estas proteínas es el de controlar a través de un mecanismo de retroinhibición, o sea de inhibición por retroalimentación, la actividad de otras enzimas o la ocurrencia de una reacción en particular.
- Control a nivel de los genes, de la velocidad de síntesis de una (o varias) enzima (s) que intervengan en una vía. Este mecanismo regulador se conoce bastante bien en células procarióticas y fue descubierto hace relativamente poco tiempo por Jacob y Monod.

- Actividad de hormonas. Es tal vez el mecanismo más complejo y sofisticado, siendo especialmente importante en organismos multicelulares.

2 Bioenergética

2.1 Flujos de materia y energía

El estudio del metabolismo debe incluir no sólo el análisis de cómo se utilizan los nutrientes, sino también una evaluación de los costos o rendimientos en energía que acompañan esta utilización.

Hay una diferencia fundamental entre la utilización de los diferentes elementos que componen las moléculas precursoras, biomoléculas y polímeros y el aprovechamiento de las diversas formas de energía. Los elementos químicos (exceptuando tal vez el P) circulan en la biósfera de manera cíclica y los organismos vivos son un eslabón de una cadena circular; esta situación podemos ilustrarla con las figuras 34 y 35 para el C, O y N que son algunos de los elementos más abundantes en un organismo.

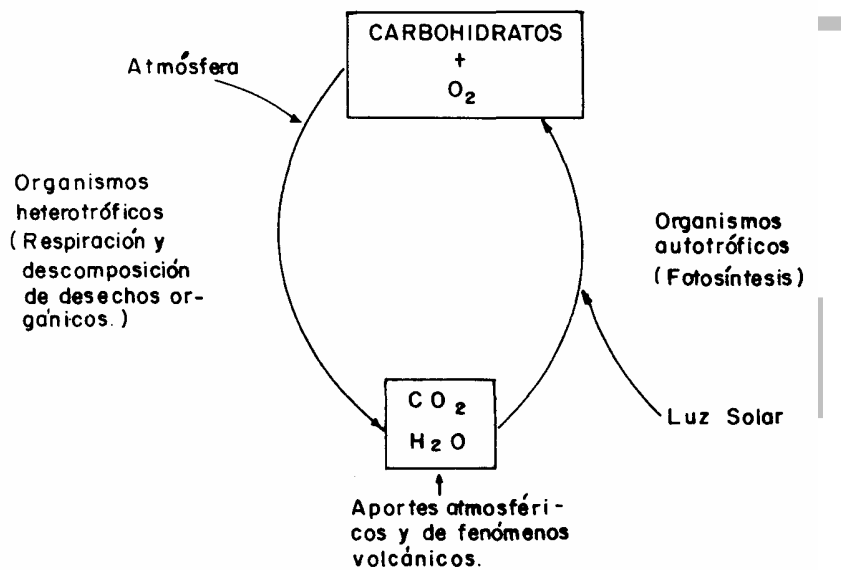


Figura 34: Ciclo global del C yO en la biósfera

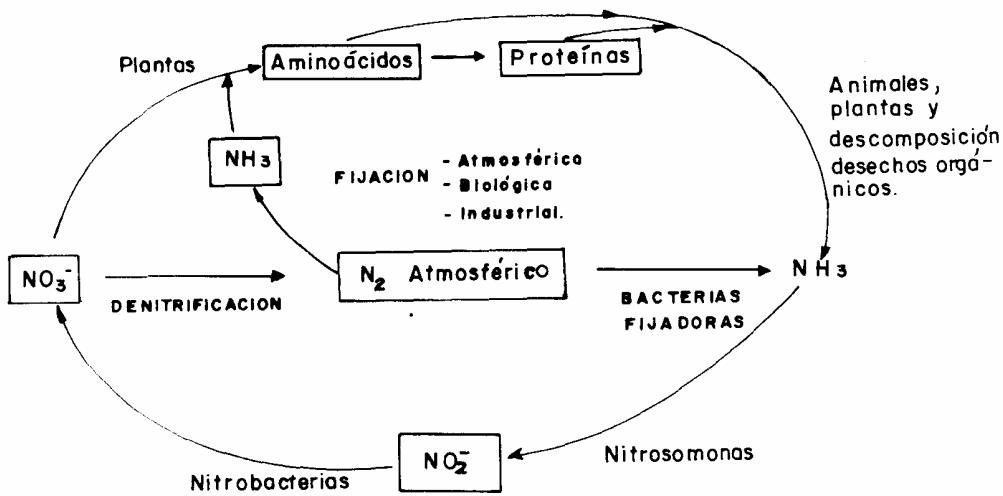


Figura 35: Ciclo global del N en la biosfera

En estas figuras observamos que una cantidad finita de estos elementos sería suficiente para mantener el ciclo en operación. Podemos imaginar entonces que en un sistema muy reducido (ideal) la misma molécula de carbono, oxígeno o nitrógeno es utilizada repetidas veces a lo largo de muchos ciclos.

En el caso de la energía la situación es completamente diferente como podemos ver en la figura 36:

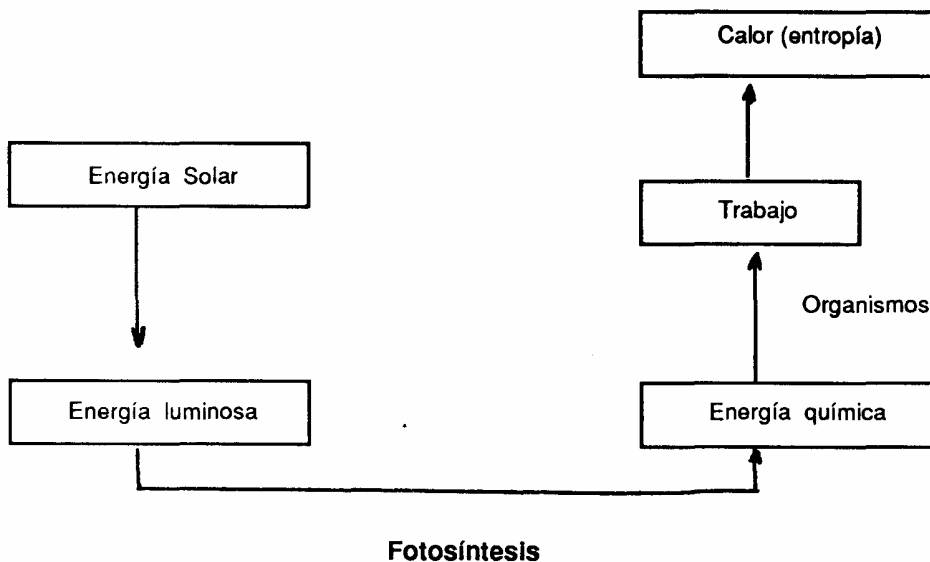


Figura 36: Flujo de la energía en el mundo biológico

La energía generada en el sol proviene de la fusión termonuclear $4H^+ \rightarrow He + 2e^-$ que allí ocurre y una pequeñísima parte de esta energía llega a la superficie de la

tierra en diferentes formas como calor, magnetismo y energía lumínica; esta última se transforma parcialmente en energía química (polisacáridos, ATP) por medio de la fotosíntesis.

La energía almacenada en los enlaces químicos de los productos de la fotosíntesis es utilizada por los diferentes organismos (incluidas las plantas) para realizar distintas clases de trabajo (mecánico: contracción muscular; osmótico: transporte activo en membranas; biosíntesis: formación de nuevos enlaces; etc) y finaliza tarde o temprano como calor o sea como energía no aprovechable.

El flujo de la energía es, pues, unidireccional y en cada etapa donde se pasa de una forma a otra, la cantidad de energía utilizable es solo una fracción del total.

Este hecho nos sirve para entender por qué es tan importante para un organismo transformar y utilizar la energía de la manera más eficiente posible; aquí opera el principio de la máxima economía que ya mencionamos.

En general podemos decir que los organismos autotróficos derivan su energía de la fotosíntesis o de procesos de reducción mientras que los heterotróficos la obtienen a través de la oxidación de los compuestos sintetizados por los autotróficos.

2.2 Consideraciones termodinámicas

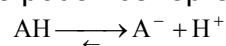
Podemos considerar que en el metabolismo hay tres tipos de reacciones a las que podemos asociar cambios en la energía libre del sistema. Estos tipos son:

- Transferencia de H^+ : reacciones ácido-base.
- Transferencia de e^- : reacciones de óxido-reducción.
- Transferencia de grupos fosfato: Reacciones de fosforilación.

En estas reacciones el cambio de energía libre (ΔG) nos sirve por una parte para calcular las constantes de equilibrio que nos describen el estado de equilibrio y por otra parte como medida de la fuerza impulsora de la reacción; el sentido en que se realice la reacción depende tanto de la magnitud del ΔG como de su signo (como ya se vio en el módulo de Termodinámica).

En los sistemas biológicos es más importante la predicción del sentido de la reacción ya que las condiciones propias de estos sistemas no permiten alcanzar el equilibrio.

En las reacciones ácido-base que podemos representar por:



La constante de disociación (K_a) se relaciona con el cambio en energía libre por medio de la ecuación:

$$\Delta G = \Delta H^0 + RT \cdot \ln(K_a) \quad \text{Ecuación 14}$$

En el equilibrio $\Delta G = 0$; entonces:

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln(K_a) \quad \text{Ecuación 15}$$

Lo que es lo mismo:

$$\Delta G^0 = -2.303RT \cdot \log(K_a) \quad \text{Ecuación 16}$$

Puesto que pK_a se define como $-\log(K_a)$.

$$\Delta G^0 = -2.303RT \cdot pK_a \quad \text{Ecuación 17}$$

Despejando:

$$pK_a = \frac{\Delta G^0}{2.303RT} \quad \text{Ecuación 18}$$

Esta ecuación es válida para sistemas en que las concentraciones molares son 1, es decir $[H^+] = 1 \text{ M}$ lo que equivale a $pH = 0$. Es claro que este pH no se da en sistemas biológicos y si el pH tomara el valor de 7,0, entonces $[H^+] = 10^{-7} \text{ M}$.

Por ello se prefiere usar el término $G^{\circ'}$ que representa el cambio en energía libre del sistema a $pH 7,0$. Entonces la ecuación 14 quedaría:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \cdot \ln(K_a) \quad \text{Ecuación 19}$$

La ecuación 16 sería:

$$\Delta G^{\circ'} = +2.303RT \cdot \log(K_a) \quad \text{Ecuación 20}$$

En las reacciones de óxido-reducción usamos la ecuación de Nernst:

$$\Delta E = \Delta E^0 + \frac{RT}{nF} \ln K \quad \text{Ecuación 21}$$

En el equilibrio $\Delta E = 0$; entonces:

$$\Delta E^0 = -\frac{RT}{nF} \ln K \quad \text{Ecuación 22}$$

Que a $pH 7,0$ sería:

$$\Delta E^0 = -2.303 \frac{RT}{nF} \ln K \quad \text{Ecuación 23}$$

Despejando $\log K$ de las ecuaciones 20 y 23, igualando y despejando $\Delta G^{\circ'}$ tendríamos:

$$\Delta G = -nF\Delta E^0 \quad \text{Ecuación 24}$$

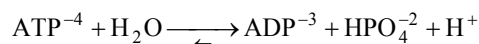
Ecuación que nos muestra cómo es posible convertir una diferencia de potenciales de reducción (por convención) en un cambio de energía libre y predecir el curso de la reacción.

El tercer tipo de reacciones lo examinaremos en detalle a continuación.

3 Energía libre de hidrólisis y potencial de transferencia de grupos fosfato

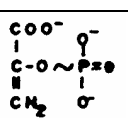
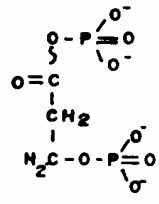

En la discusión que sigue es fundamental tener en claro cuándo las reacciones se realizan en tubo de ensayo (In vitro) y cuándo suceden en la célula (In vivo).

Los trifosfonucleótidos como el ATP pueden sufrir in vitro una hidrólisis que representamos por:



Es decir la pérdida del grupo fosfato P en posición γ , produciéndose ADP y fósforo inorgánico (Pi). En condiciones estándar a pH 7,0 el cálculo de $\Delta G^{\circ'}$ arroja un valor de -7.300 calorías/mol o sea que es una reacción muy exergónica desplazada hacia la derecha; esta energía se conoce como energía libre de hidrólisis. Si se calcula el $\Delta G^{\circ'}$ *in vitro* empleando las concentraciones intracelulares de ATP, ADP y Pi y se tiene en cuenta la formación de complejos con el Mg^{+2} (que es lo que ocurre dentro de la célula) el ΔG° de hidrólisis ($\Delta G_{\text{hidr}}^{\circ}$) del ATP puede subir hasta unas -12000 calorías/mol.

Otros compuestos con grupos fosfato están también presentes en la célula y con ellos se puede calcular *in vitro* su $\Delta G_{\text{hidr}}^{\circ}$. Los valores que se obtienen se muestran en la tabla 14.

Compuesto	Abreviatura	Estructura	$\Delta G_{\text{hidr}}^{\circ}$, calorías/mol	PTG
Fosfoenol Piruvato	PEP		-14800	14.6
3-Fosfogliceril-fosfato	1, 3 DP Glicerado		-11800	11.8
Fosfocreatina	p-Creatina		-10300	10.3

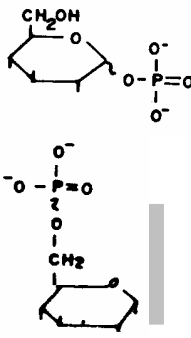
Acetil fosfato		$ \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{N}-\text{H} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{N}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $	-10100	10.1
Adenosin trifosfato	ATP	$ \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	-7300	7.3
Glucosa-1-fosfato	G-1-P	$ \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	-5000	5.0
Glucosa-6-fosfato	G-6-P		-3300	3.3

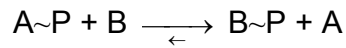
Tabla 14: Valores de ΔG° de hidrólisis y de Potencial de Transferencia de Grupos PTG para algunos metabolitos fosforados

Observamos que hay un amplio rango de valores de ΔG° , siendo el PEP y el 1,3-DP glicerato los que liberan la mayor cantidad de energía cuando se hidroliza *in vitro* el enlace del grupo P^{\ominus} . Por convención, y para distinguirlo de los enlaces con mayor estabilidad, se representa por “~” el enlace que al hidrolizarse libera la energía; este enlace se ha llamado inapropiadamente enlace rico en energía y cuando se usa este término (en lenguaje bioquímico) significa un enlace muy lábil que libera buena cantidad de energía al romperse.

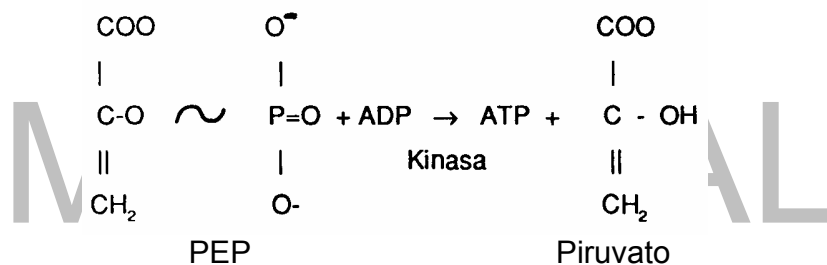
Si expresamos en kcal.mol^{-1} el valor absoluto del $\Delta G_{\text{hidr}}^{\circ}$ obtenemos el valor correspondiente al potencial de transferencia de grupos (PTG), que nos indica la tendencia que tiene un compuesto fosforilado, a transferir su grupo fosfato lábil.

Entre mayor sea el PTG más fácilmente se transferirá el P^{\ominus} .

En la célula (o sea *in vivo*) NO ocurre la hidrólisis directamente sino que se realiza una transferencia de P entre dos compuestos, que en forma general podemos representar por:



La dirección en que se desplace el equilibrio dependerá de los valores de PTG de $A\sim P$ y $B\sim P$; debemos notar además que se requiere que el aceptor de P esté en forma no-fosforilada. Estas reacciones son catalizadas por una subclase de transferasas denominadas kinasas. Consideremos como ejemplo la formación de ATP en la célula a partir de ADP; aunque en teoría cualquiera de los primeros cuatro compuestos de la tabla 14 podría emplearse, utilicemos el PEP. La reacción sería:



Puesto que el PTG para $\text{PEP} \rightarrow \text{piruvato}$ es de 14.8 y el PTG de $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ es de 7.3, la transferencia del P se hace del PEP al ADP para formar ATP y piruvato; la fosforilación no se hace en sentido inverso porque se transferirá el P de un compuesto con PTG menor a un compuesto con PTG mayor. Note que *in vivo* realmente no hay hidrólisis del PEP sino transferencia del P .

Las determinaciones del ΔG° *in vitro* nos sirven entonces para conocer el PTG de un compuesto y predecir la dirección en que la kinasa cataliza la fosforilación.

4 Importancia del ATP

El sistema ATP-ADP es el más empleado por la célula para estas reacciones de fosforilación por varias razones:

- El ATP está situado en una posición intermedia y sirve entonces como puente o Intermediario común para la transferencia de P de compuestos ricos en energía (con ΔG° muy bajos) a compuestos pobres en energía (con ΔG° altos). Esto tiene la ventaja que se conserva mejor la energía pues los ΔG° de cada reacción son menores, ver figura 37.

- En todas las reacciones de fosforilación intervienen kinasas que tienen sitios activos que unen el ATP o el ADP según sea el caso.
- El ADP sirve como aceptor de P provenientes de compuestos con alto PTG.

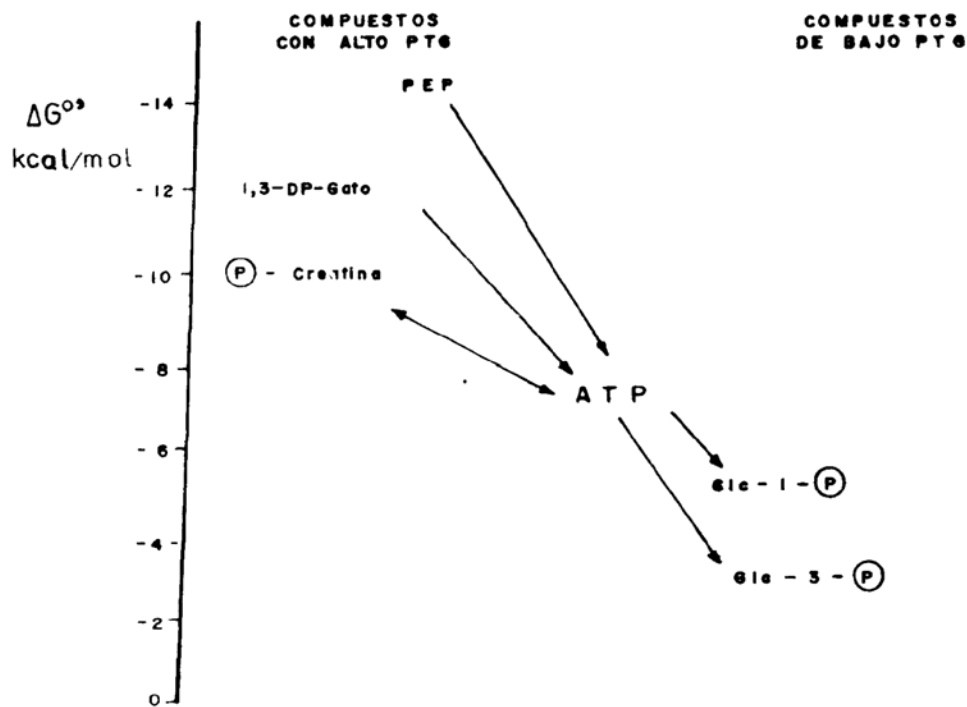


Figura 37: Flujo de grupos P y situación intermedia del ATP

Lo anterior ha conducido a algunos bioquímicos a considerar el ATP como la moneda usada por la célula para transportar la energía. En las unidades siguientes veremos muchos ejemplos de estas fosforilaciones y de aplicaciones del formulismo termodinámico discutido más arriba. La aplicación de estos conceptos a sistemas biológicos está sujeta a varias limitaciones dado que:

- Los valores de $\Delta G^{\circ'}$ y $\Delta E^{\circ'}$ están influenciados por cambios en pH, temperatura fisiológica y concentraciones celulares de Mg^{+2} .
- La célula es un sistema abierto, que intercambia materia y energía con su medio ambiente y estos conceptos de termodinámica se definen a partir de un sistema cerrado.
- Las reacciones *in vivo* están en un estado estacionario y no en equilibrio; por tanto las concentraciones son siempre algo menores que en el equilibrio.

Lo anterior ha conducido al desarrollo de una termodinámica especial o de procesos irreversibles bastante más compleja que la termodinámica clásica. Sin embargo para los fines prácticos de predicción del sentido de la reacción y de la comprensión de por qué ocurren las transferencias de grupos F , lo visto en este capítulo es aplicable y utilizable.

Actividad 5

1. De las siguientes actividades metabólicas ¿cuáles podría señalar usted como las más básicas? Indique aquellas que poseen las características más generales en todos los organismos.
 - a. Utilización de C.
 - b. Síntesis de triptófano.
 - c. Transformación de nutrientes exógenos.
 - d. Catabolismo y anabolismo de macromoléculas.
 - e. Absorción de energía luminosa.
 - f. Transformación de energía.
 - g. Síntesis y degradación de biomoléculas.

Indique las razones de su escogencia y compárelas con la información de este capítulo.

2. Revise los mecanismos que permiten controlar el metabolismo.
3. Qué ventajas tiene la compartimentalización de las vías metabólicas? Recuerde las propiedades de las membranas que permiten seleccionar metabolitos y biomoléculas.
4. Revise los esquemas del ciclo del N, del ciclo del C y del flujo de energía en la biósfera.
5. De las tres reacciones siguientes, ¿cuál tiene lugar realmente?

- a. $\text{PEP} + \text{Glc-6-}\text{F} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{Glucosa}$
- b. $\text{PEP} + \text{Glucosa} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{Glc-6-}\text{P}$
- c. $\text{Piruvato} + \text{Glc-6-}\text{P} \rightarrow \text{PEP} + \text{Glucosa}$

Recuerde como se usa el concepto del potencial de transferencia de grupos. Consulte la tabla 14.

Autoevaluación No. 10

1. Explique brevemente cuáles son las actividades fundamentales que tienen lugar en el curso del metabolismo.
2. Cite los factores que permiten controlar el metabolismo.
3. En qué consiste:
 - La compartimentalización.
 - La universalidad de las vías metabólicas.
4. Ilustre con un esquema para cada caso la utilización del nitrógeno y de la energía en la biósfera.
5. Explique en términos generales como se puede prever el sentido de reacciones ácido-base y redox.
6. Explique qué significa el potencial de transferencia de grupos y cómo se usa para predecir el curso de las reacciones de fosforilación.
7. Plantee las razones que señalan la importancia del ATP en el metabolismo.
8. De las reacciones siguientes seleccione aquella que química y termodinámicamente es factible. De sus razones:
 - a. $1,3\text{-DiP Glicerato} + \text{ADP} \rightarrow 3\text{-PG-Glicerato} + \text{ATP}$
 - b. $3\text{-P-Glicerato} + \text{ADP} \rightarrow 1,3\text{-DiP-Glicerato} + \text{ATP}$
 - c. $3\text{-P-Glicerato} + \text{ATP} \rightarrow 1,3\text{-DiP-Glicerato} + \text{ADP}$

Lecturas recomendadas

Complemente algunos aspectos desarrollados en la temática de este capítulo consultando las siguientes referencias:

1. The oxygen cycle/Preston Claud, Aharon Gibor. - - Scientific American.- - Vol. 223, 1970.- -p.110.
2. The carbon cycle / Brt Bolin.- - Scientific American.- - Vol 223, 1970.- - p124.
3. The nitrogen cycle/C.C. Delwiche.- - Scientific American.- - vol223, 1970.- - p.136.
4. The energy cycle of the biosphere / George M Woodwell- - Scientific American. - Vol 223, 1970.- - p64.

UNIDAD 3: CATABOLISMO, BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO

CAPITULO 1: CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

Objetivos

- Describir la secuencia de transformaciones que sufren los carbohidratos en cada una de las vías degradativas, identificando las clases de enzimas que intervienen.
- Ilustrar en las diferentes vías los principios generales que las rigen.
- Identificar en cada vía su localización celular, los metabolitos iniciales y finales, los compuestos intermediarios más importantes, el tipo de transformación sucedida y las enzimas que participan.
- Establecer para cada vía los balances de sustrato carbonado, coenzimas y energía en forma de ATP.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 11

1. Explique el significado del concepto potencial de transferencia de grupo. ¿Cuáles son sus aplicaciones?
2. ¿Qué diferencia hay entre la permeabilidad selectiva y el transporte activo en una membrana? De un ejemplo de cada uno.
3. Describa cómo están constituidas las mitocondrias.
4. ¿Cuál es la función de las mitocondrias? ¿Existen estos organelos en procariotes?
5. ¿Qué significa el concepto paso limitante de una secuencia de reacciones?
6. Dibuje las estructuras de la Glucosa, Fructosa, Galactosa y Sacarosa.
7. ¿Cuáles son las diferencias estructurales más importantes entre amilosa, amilopectina, glicógeno y celulosa?
8. ¿Considera usted posible la interconversión de una diferencia de potencial de reducción (ΔE°) en energía libre (ΔG°)? ¿Cuál sería la expresión para esta conversión?

MATERIAL
EN
REVISIÓN

INTRODUCCIÓN

A través de los capítulos anteriores se han analizado las principales características estructurales y las propiedades de algunas de las biomoléculas y macromoléculas más importantes. Con este bagaje vamos ahora a comenzar el estudio de las variadas maneras como se transforman los carbohidratos, lípidos y proteínas en compuestos más sencillos o sea su catabolismo y luego veremos cómo a partir de moléculas poco complejas son sintetizadas estas macromoléculas.

En este capítulo y en el próximo dedicaremos nuestra atención al catabolismo y a la biosíntesis de los carbohidratos respectivamente, con el propósito de adquirir una visión global que nos permita comparar las vías degradativas y biosintéticas en cuanto a su localización celular, metabolitos iniciales y finales, metabolitos intermedios más importantes, producción o consumo de energía (como ATP) en la vía, clases de enzimas y coenzimas que intervienen etc.

Aunque cada vía será ilustrada en forma relativamente detallada, a través de esquemas, no se espera por ejemplo, que usted aprenda los nombres de las diferentes enzimas sino que a una transformación dada pueda asignarle la clase general de enzima que cataliza esta reacción.

Revise cuidadosamente los objetivos de este capítulo pues allí se plantea el tipo de conocimientos básicos que deben ser aprendidos y manejados por usted.

1 Glicólisis

Iniciaremos nuestro estudio con la llamada vía glicolítica porque a más de ser la primera vía degradativa por la que pasan los carbohidratos es una de las más adecuadas para ser usada como un ejemplo de vía metabólica ya que se conocen con bastante detalle las diversas reacciones que en ella ocurren, así como las enzimas que la catalizan, las transformaciones de energía involucradas y, por si fuera poco, es una de las vías metabólicas que más aplicaciones industriales tiene. De hecho las investigaciones pioneras sobre la glicólisis realizadas por Pasteur, Tauber y otros, se hicieron por su interés en comprender como se realizaba la fermentación alcohólica.

La glicólisis se realiza en el citoplasma celular y las enzimas que intervienen se pueden aislar con relativa facilidad por no estar asociadas a ninguna partícula subcelular; esto ha facilitado muchísimo el análisis individual de las diferentes reacciones como veremos más adelante. En esta vía se realiza una oxidación anaerobia de carbohidratos (almidón, glicógeno, glucosa, fructosa, etc) apareciendo como productos finales alguno de los siguientes compuestos:

- Ácido láctico: tejidos animales (músculo especialmente).
- Etanol y CO₂: levaduras.

- Etanol o ácido pirúvico: plantas y animales dependiendo de las condiciones.

El confinamiento de esta vía en el citoplasma es posible porque todos los metabolitos intermedios son del tipo éster-fosfato, lo cual impide su paso a través de la membrana celular y por tanto no pueden difundirse al exterior de la célula.

En la glicólisis, como veremos luego, se ilustra muy bien un principio general del metabolismo que consiste en que las oxidaciones (aerobias o anaerobias) están acopladas a la formación de ATP; esto sucede porque generalmente el compuesto oxidado que se forma tiene un grupo fosfato F con un potencial de transferencia de grupo elevado y cede este P sobre el ADP para dar lugar al ATP.

La glicólisis es una de las vías más universales que existen pues tiene lugar en organismos aerobios, anaerobios y facultativos; de hecho, por razones que serán claras más adelante, es la vía que permite a los organismos anaerobios obtener la energía que requieren para sus procesos metabólicos. En los otros tipos de organismos es la primera etapa obligada de una secuencia de vías para la degradación de los carbohidratos y de allí su importancia.

Los carbohidratos que alimentan la vía pueden ser:

- Polisacáridos como el almidón, que por acción de las α - y β -amilasas produce maltosa o glucosa, o el glicógeno que en el músculo es degradado por acción de la fosforilasa a (que es una glicosiltransferasa) a Glc-1-P.
- Disacáridos que frecuentemente son:
 - Sacarosa, que por una hidrolasa (invertasa) produce Glc y Frc.
 - Maltosa, que con la maltasa se hidroliza a Glc.
 - Lactosa, que por la lactasa (una hidrolasa) produce Gal y Glc.
- Hexosas que generalmente son Glc, Gal, Frc.

La figura 38 ilustra las reacciones que desembocan en la producción de los monosacáridos.

La vía glicolítica se esquematiza en la figura 39 donde se indican las clases de enzimas que catalizan cada reacción usando la nomenclatura más general; es conveniente tener presente que cada enzima es característica de una reacción dada y así, por ejemplo, la isomerasa de la reacción 3 es diferente de la isomerasa de la reacción 4 y de la isomerasa de la reacción 6 y así sucesivamente. Hemos adoptado este enfoque general para evitar el uso de los nombres de cada enzima que consideramos innecesario para los propósitos de este curso.

Analizaremos en primer lugar las transformaciones químicas que sufren los monosacáridos que nutren la vía, haciendo énfasis en los metabolitos intermedios que sirven como puntos de conexión con otras vías. Luego analizaremos la vía

desde el punto de vista energético y por último resaltaremos la importancia que tiene en diversos organismos.

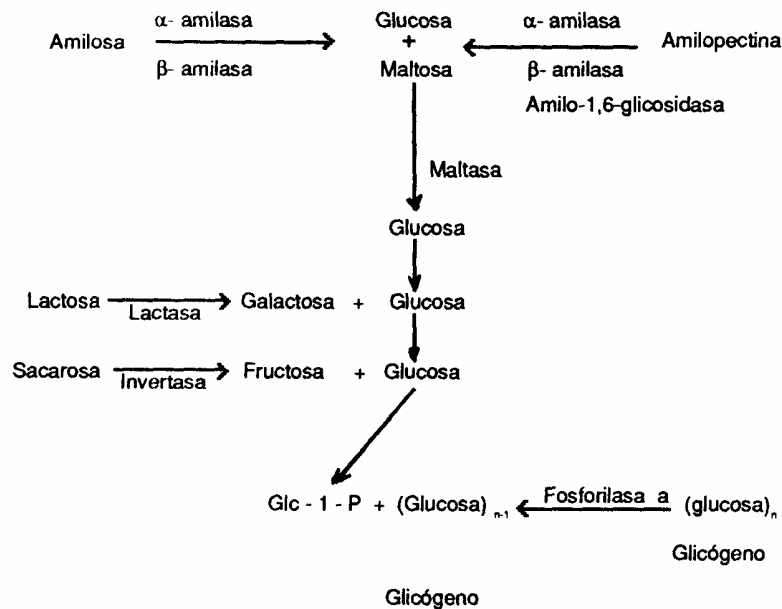


Figura 38: Carbohidratos proveedores de las hexosas que nutren la glicólisis

Vemos en la figura 39 que la Gal, Glc y Frc (ver la lista de abreviaturas) sufren cada una fosforilación por distintas kinasas (reacciones 2, 5 y 7) que resultan en los respectivos derivados esterfosfato; la Gal-1-P es transformada a Glc-1-P (que a su vez puede provenir de la degradación del glicógeno por fosforilasa a) y por reacciones de isomeración (4 y 6) estos monosacáridos convergen a Frc-6-P.

Esta molécula sufre una segunda fosforilación (reacción 8) para dar el diesterfosfato Frc-1, 6-DiP; de todas las reacciones de la vía, ésta es la que se realiza más lentamente y por ello es el paso limitante en la glicólisis, es decir de la velocidad con que se suceda, depende la velocidad global de la vía.

La próxima reacción (9) es muy interesante pues a partir de una molécula de hexosa se obtienen dos triosas que además de ser fácilmente interconvertibles (10) sirven como puntos de enlace de la glicólisis con otras vías.

Dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula la 3-P-DHA puede ser usada para la síntesis de lípidos o puede ser isomerizada (10) a 3-P-Gal si la célula requiere la producción de energía, en este caso prosigue la glicólisis con 2 moléculas de 3-P-Gal y tendremos que hasta aquí se han producido 2 triosas a partir de una hexosa.

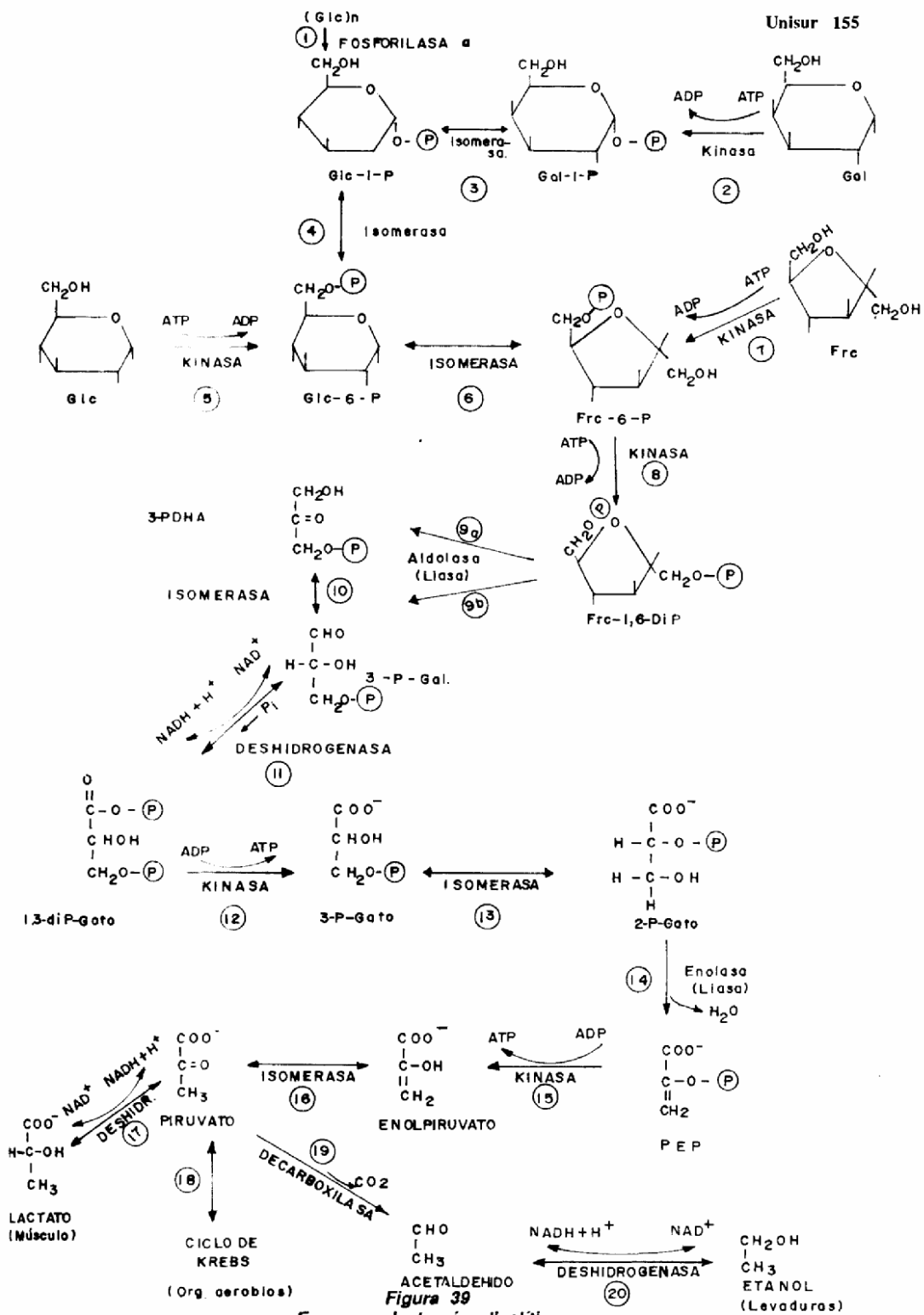
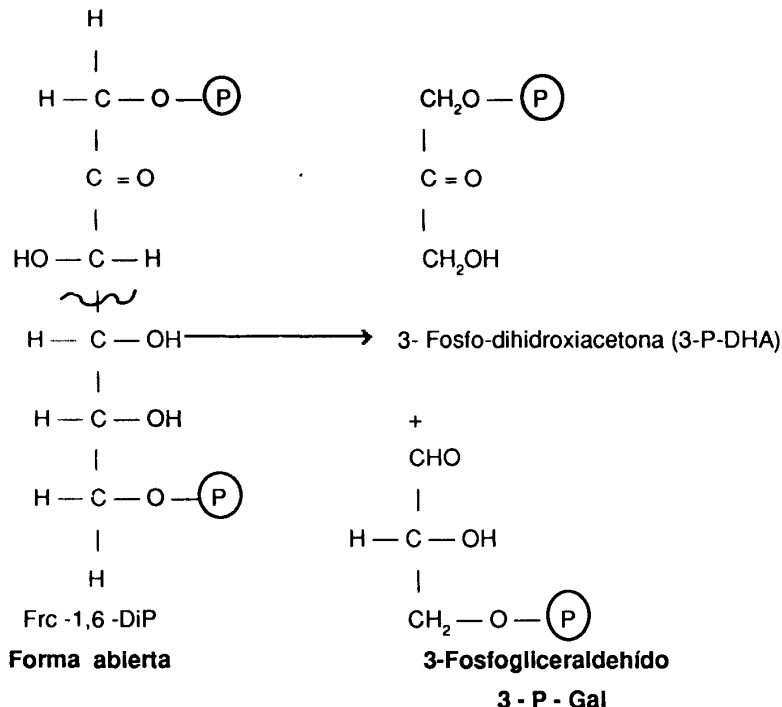


Figura 39: Esquema de la vía glicolítica

La reacción de ruptura podemos también representarla así:



En la siguiente reacción (11) se tiene que, paralelamente con la oxidación del aldehído al ácido, se produce un compuesto con alto PTG ilustrando así uno de los principios generales a que ya nos referimos; la oxidación se cataliza por una deshidrogenasa que emplea como coenzima la nicotinamidaadeninucleótido (NAD).

Esta molécula incluye en su estructura la nicotinamida que es una vitamina del grupo B cuya deficiencia tiene múltiples efectos incluyendo la pelagra; el NAD es una de las coenzimas de las deshidrogenasas y participa reversiblemente en muchas reacciones de óxido-reducción de acuerdo con lo indicado en la figura 40.

En la reacción (11) correspondiente a 3-P-Gal y Aox a 1,3 -DiP-Gato. En la figura 40 se aprecia que en su forma oxidada el NAD tiene una carga positiva y cuando se reduce acepta sólo un hidrógeno, liberándose al medio el otro hidrógeno como H^+ ; la parte de la molécula que acepta el H^+ es la nicotinamida y el resto queda inalterado.

El compuesto rico en energía (1,3-DiP-Gato) cede, gracias a una kinasa, un grupo fosfato (el más lábil) sobre el ADP formando ATP y 3-P-Gato (reacción 12), éste se isomeriza a 2-P-Gato (13) quien por acción de la enolasa sufre una óxido reducción interna al perder H_2O y dar PEP; nuevamente acá se puede demostrar

cómo una oxidación se acompaña de la producción de un metabolito con PTG elevado. El PEP cede su F^- al ADP por acción de una kinasa y se transforma en enolpiruvato (15) que se isomeriza (16) a piruvato.

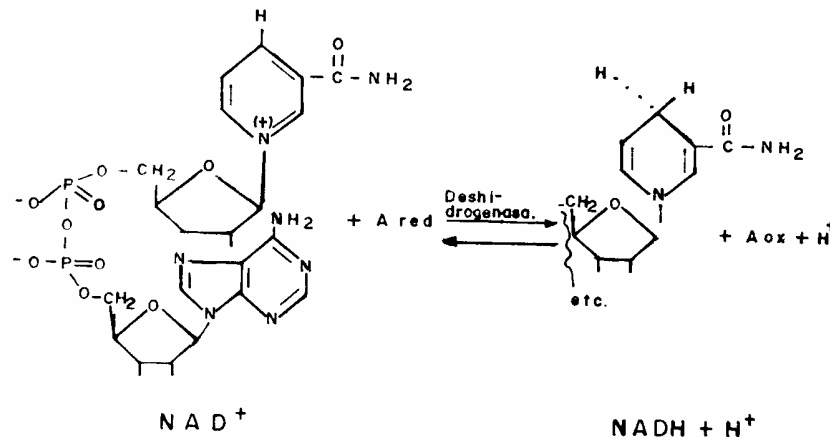


Figura 40: Papel del NAD en las reacciones de óxido-reducción

Hasta aquí la vía glicolítica sucede en igual forma para todos los organismos y dependiendo de si tenemos condiciones anaerobias o aerobias el piruvato se transforma de diferente manera. Por ejemplo, si la glicólisis se está realizando en el músculo, donde predominan condiciones de O_2 bajas el piruvato se reduce (por una deshidrogenasa) a lactato (17) o si se está realizando en levaduras, hay una decarboxilación (19) y posterior reducción a Etanol (20); tenemos entonces una fermentación alcohólica. En los microorganismos anaerobios el piruvato es transformado en diversos productos de fermentación que terminan en metano y otros gases.

En organismos aerobios el piruvato se usa como producto inicial en otra vía degradativa que se conoce como el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos, que estudiaremos posteriormente.

Si hacemos un balance de compuestos carbonados tenemos entonces que a partir de una hexosa (Glc, Gal, Frc) se producen dos moléculas de piruvato, habiendo ocurrido una oxidación (sin intervención del O_2 , o sea anaerobia).

Desde el punto de vista de un balance de coenzimas se han producido $2 \text{NADH} + 2\text{H}^+$ por dos piruvato (o sea por hexosa) que luego son consumidas en la transformación del piruvato a lactato o a etanol.

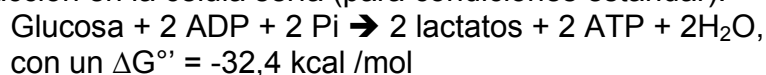
El balance energético de la glicólisis nos muestra que si una hexosa es la materia prima se consumen 2 ATP (reacciones 2 y 8 ó reacciones 5 y 8 ó reacciones 7 y 8)

y se producen 4 ATP (12 y 15) por 2 piruvatos producidos; la ganancia neta es de 2 ATP por hexosa oxidada.

Si consideramos la reacción: Glucosa → 2 lactatos

Lo que no permite un balance cero de NAD^+ y no altera el balance neto de ATP, tenemos que su $\Delta G^{\circ\prime} = -47 \text{ kcal/mol}$.

La reacción en la célula sería (para condiciones estándar):



La diferencia de $\Delta G^{\circ\prime}$ es entonces de $-14,6 \text{ kcal/mol}$ que corresponde a la energía acumulada en los 2ATP ($7,3 \text{ kcal/mol} \times 2$) y en consecuencia la eficiencia energética de la glicólisis es de un 31% ($14,6 \times 100/47$); vale la pena anotar cómo esta eficiencia es muy superior a la del rendimiento energético de cualquier motor mecánico.

En algunas células, como el eritrocito, debido a las concentraciones intracelulares de los diversos metabolitos de la glicólisis la eficiencia puede subir hasta un 53% y por eso estas células pueden derivar únicamente de la glicólisis toda la energía que requieren para su metabolismo.

Si la materia prima es el glicógeno (caso del músculo y del hígado) un examen de la figura 39 nos muestra que el balance neto es de +3ATP lo que significa una eficiencia superior al 31%.

De lo anterior podemos deducir la enorme importancia que reviste la glicólisis como proceso que permite obtener energía en forma anaerobia para todos aquellos microorganismos anaerobios y como proceso inicial de oxidación en los organismos aerobios; una discusión detallada del papel de la glicólisis en la contracción muscular la encuentra en la lectura recomendada No. 1.

Las reacciones de la glicólisis además de estar en la base de procesos industriales como las fermentaciones alcohólica, láctica, acética, de producción de glicerol, etc., proveen también la explicación de algunos métodos usados para el control de la proliferación de microorganismos como son la clorinación del H_2O (ya que el Cl_2 inhibe las enzimas que catalizan los pasos iniciales de la glicólisis), la adición de ion F^- (que inhibe la enolasa, reacción 14) o la adición de agentes acomplejantes de metales (ya que las enzimas que catalizan las reacciones 14,15, 9 requieren metales para ser activas).

2 Ciclo de Krebs

Esta vía también recibe el nombre ciclo de los ácidos tricarboxílicos porque en ella aparecen algunos ácidos de este tipo; la secuencia de reacciones que la integran fue propuesta por el bioquímico austriaco Hans Krebs quien recibió el premio Nobel en 1953. Su propuesta original coincide básicamente con el ciclo tal como lo conocemos hoy y estaba fundamentada en una gran cantidad de evidencia experimental.

La vía se realiza en la cara interna de las membranas mitocondriales de los eucariotes y en la membrana celular de los procariotes donde se encuentran las enzimas y coenzimas participantes; esto tiene varias consecuencias importantes derivadas de la permeabilidad selectiva que poseen las membranas.

El ciclo de Krebs tiene como función primordial oxidar completamente hasta CO_2 y H_2O , el acetato (que se encuentra bajo una forma activada) que proviene directa o indirectamente del catabolismo de carbohidratos, lípidos o proteínas; esto, aunado al hecho que muchos de los metabolitos intermedios del ciclo se usan como precursores en varias rutas biosintéticas, pone de relieve la gran importancia del ciclo de Krebs y su posición central en el metabolismo celular. Este punto se irá haciendo evidente a medida que estudiemos las vías metabólicas.

En todos los organismos aerobios se ha demostrado la existencia de este ciclo lo cual demuestra su universalidad y la importancia de conservar esta vía a lo largo de la evolución. Comúnmente se inicia la discusión del ciclo de Krebs a partir del metabolito que conecta esta vía con la glicólisis.

Veamos entonces que sucede con el piruvato obtenido como producto final de la glicólisis en las células aerobias. Este piruvato, que se encuentra en el citoplasma, es oxidado hasta una forma especial del acetato llamado acetil-coenzima A o acetilCoA por medio de un sistema multienzimático conocido como el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Esta reacción de oxidación es un requisito para la entrada del esqueleto carbonado de los carbohidratos (a través del piruvato) en el ciclo de Krebs. El complejo de la piruvato deshidrogenasa está constituido por varias deshidrogenasas y transferasas acompañadas de sus respectivas coenzimas; nosotros nos limitaremos a mencionar la secuencia en que actúan estas coenzimas, lo cual se muestra en la figura 41 donde se indican solo las partes funcionales de las enzimas. Tenemos entonces:

- Pirofosfato de tiamina (PTT) que corresponde a la vitamina B que asociada a una deshidrogenasa provoca la decarboxilación del piruvato en $\text{CH}_3-\text{C}-$ (radical acetilo) que se une temporalmente al PTT.



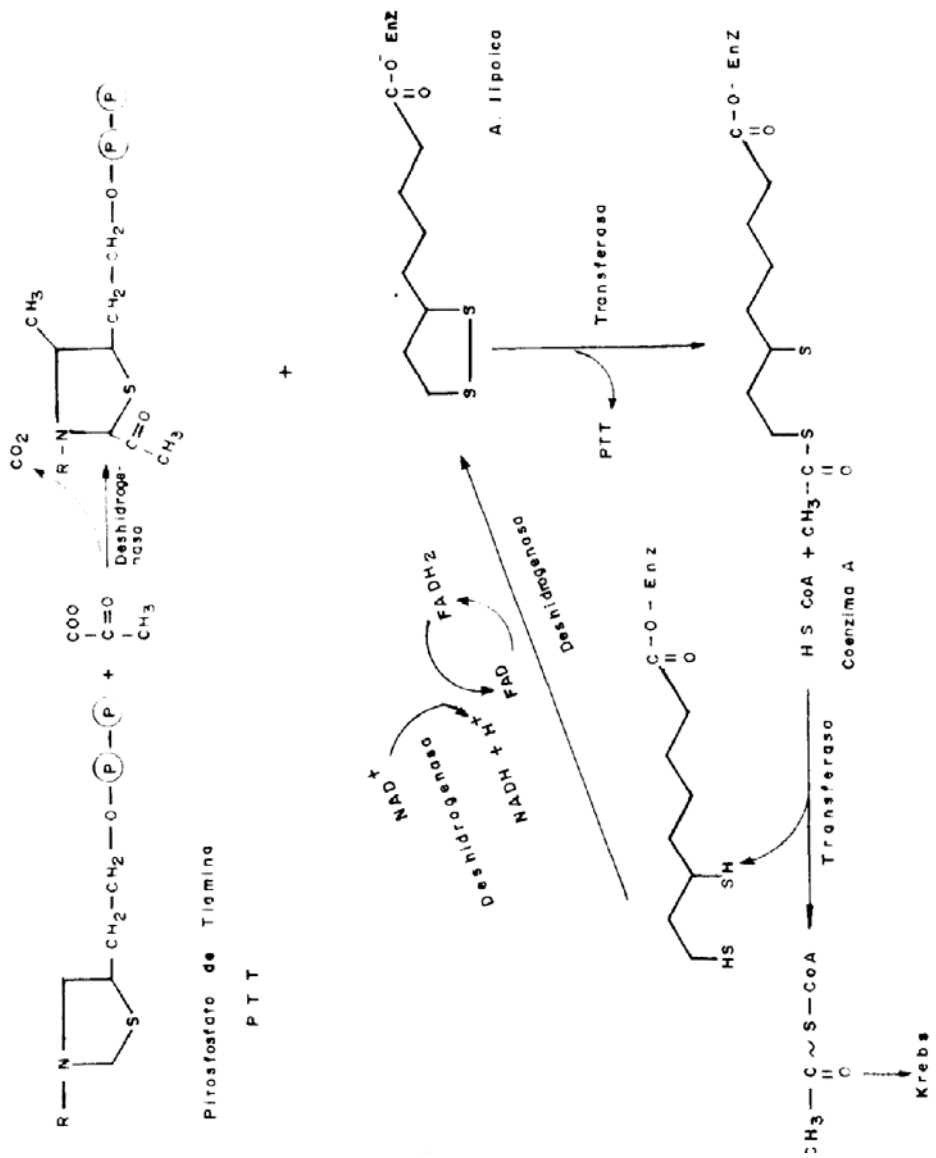


Figura 41: Oxidación del piruvato en acetato por acción del complejo de la piruvato deshidrogenada

- El ácido lipoico, vitamina del complejo B asociada a una transferasa que recibe $\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-$ del PTT, regenerado este último.
- La coenzima A, unida a una transferasa; la parte funcional de esta coenzima es un grupo tiol (-SH) capaz de entrar a formar un enlace tioéster (rico en energía) con el acetilo ligado al lipoico dando lugar al acetil-CoA y liberando el ácido

lipoico en su forma reducida. De aquí en adelante las siguientes reacciones tienen por objeto reoxidar las coenzimas reducidas.

- La flavinadenin-di nucleótido (FAD) de cuya estructura hace parte la riboflavina (vitamina B2). Esta es una coenzima de deshidrogenasas y recibe los dos hidrógenos del lipoico regenerando la forma oxidada de éste y quedando como FADH₂.
- El NAD⁺ que por intermedio de una deshidrogenasa reoxida al FADH₂, quedando como aceptor final de los electrones en forma de NADH + H⁺

La acción de este sistema multienzimático la podemos resumir en la reacción 1 de la figura 42. De esta manera se oxida el piruvato y el acetil-CoA queda situado en la membrana interna mitocondrial donde está disponible para entrar en el ciclo de Krebs.

La vía se inicia (figura 42) con la condensación de una molécula de oxalacetato y una molécula de acetil-CoA (reacción 2) catalizada por una sintetasa formándose el citrato; este ácido se isomeriza (3 y 4) hasta isocitrato y luego se oxida con una NAD⁺ deshidrogenasa (5) hasta oxalsuccinato siendo esta reacción el paso limitante. Si observamos la estructura del oxalsuccinato apreciamos que es un α -ceto ácido con un carboxilo vecinal y por eso sufre fácilmente una decarboxilación (6); el α -ceto glutarato resultante es decarboxilado a su vez por un complejo multienzimático muy similar al que actuó en la reacción 1 y se produce la succinil-CoA (7).

Este compuesto tiene un enlace rico en energía (enlace tio ester) y aquí nuevamente podemos demostrar el principio de que una oxidación está acoplada a la formación de un compuesto con alto PTG. Esta energía se aprovecha para fosforilar el ADP a través del par GDP-GTP (reacción 8); esta producción de ATP es lo que se conoce como fosforilación a nivel de sustrato y en la glicólisis se presenta también cuando se pasa del 1,3-DiP-Gato a 3-P- Gato (reacción 12, figura 39) o del PEP a piruvato (reacción 15, figura 39).

El succinato producido se oxida a fumarato (9) por medio de una deshidrogenasa que tiene como coenzima FAD; la estructura y la reacción de óxido-reducción en que participa se muestra en la figura 43.

Note que el FAD puede aceptar dos hidrógenos y no se liberan H⁺ al medio, a diferencia de lo que ocurre con el NAD⁺.

El fumarato se hidrata para formar malato (reacción 10) que se oxida a oxalacetato con una NAD-deshidrogenasa. De esta manera se cierra el ciclo regenerándose el oxalacetato consumido en la condensación con el Acetil-CoA (reacción 2)

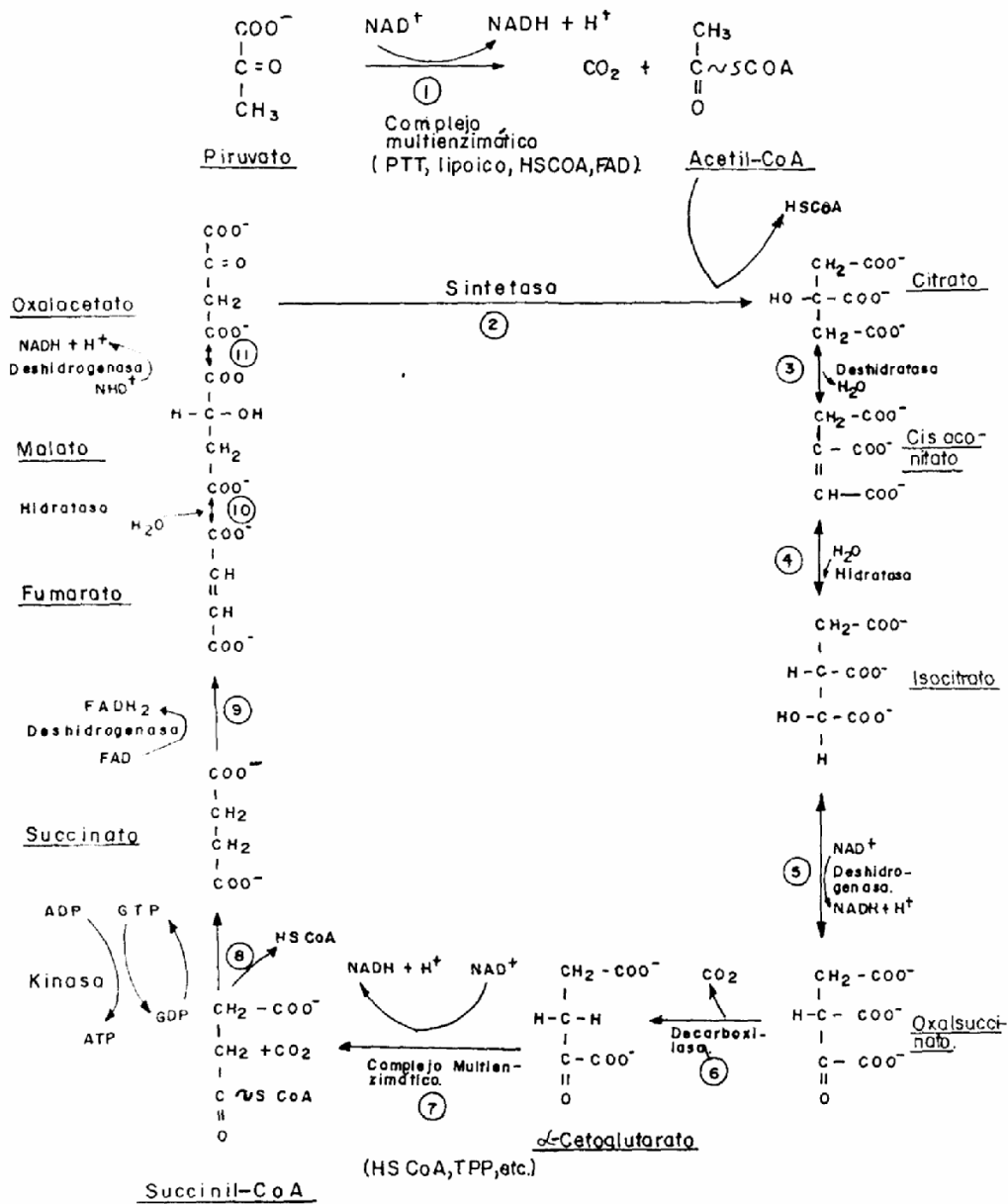


Figura 42: Esquema del ciclo de Krebs

En esta vía encontramos un gran número de metabolitos que sirven como sitios de enlace con otras vías y es más breve enumerar aquellos que no cumplen tan frecuentemente esta función; estos metabolitos son fundamentalmente los ácidos tricarbóxicos citrato y cis-aconitato cuyas conexiones directas con otras rutas metabólicas son escasas.

Tiene especial importancia el acetyl-CoA pues allí convergen productos del catabolismo de carbohidratos (como hemos visto), de lípidos (en lo que respecta al metabolismo, los ácidos grasos) y de algunos aminoácidos; el α -cetoglutarato, fumarato, malato y oxalacetato son también compuestos que conectan con vías degradativas o biosintéticas de aminoácidos y carbohidratos.

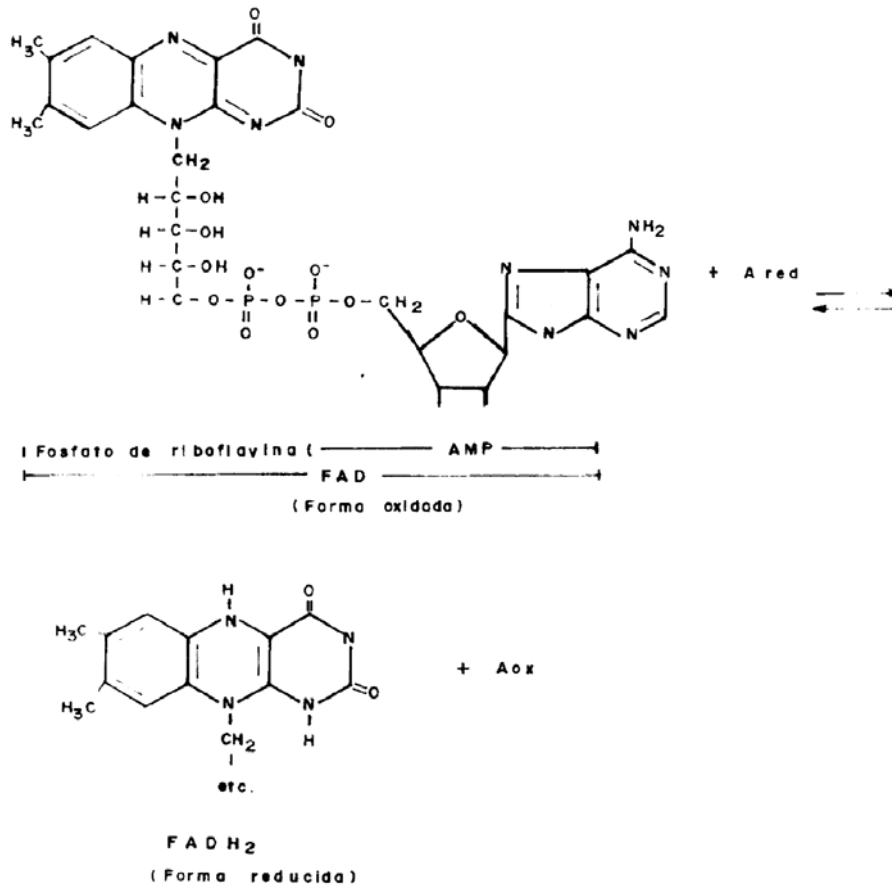


Figura 43: Estructura y modo de acción de la Flavinadenin dinucleótido (FAD)

Al intentar hacer un balance de los compuestos que intervienen en esta vía, observamos que por su naturaleza cíclica sólo se requiere un aporte extremo de acetyl-CoA, de coenzimas de deshidrogenasas y de ADP, puesto que los intermediarios del ciclo se regeneran continuamente.

En lo referente al carbono un examen de la figura 42 muestra que por cada acetyl-CoA que entra se producen 2CO_2 o sea que podemos considerar que el acetyl se ha oxidado hasta CO_2 y H_2O ; esta oxidación lleva aparejada la producción de $3\text{NADH} + 3\text{H}^+$ y de 1FADH_2 que por existir en pequeñas cantidades al interior de la mitocondria y no poder difundir a través de la membrana (por la permeabilidad selectiva de ésta), deben ser reoxidadas para que el ciclo siga operando. Esta

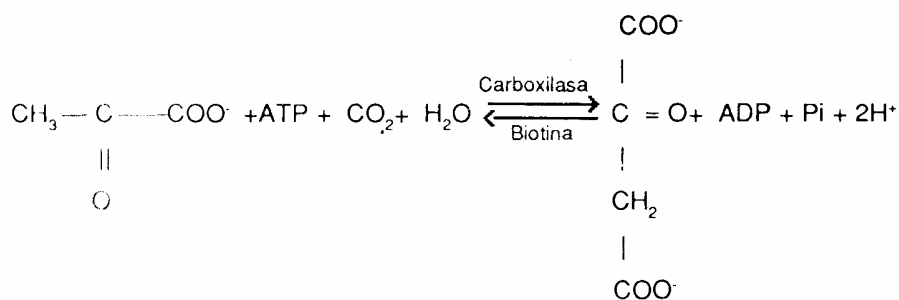
reoxidación se efectúa por medio de la fosforilación oxidativa que es una vía íntimamente asociada, tanto temporal como espacialmente, al ciclo de Krebs.

Con excepción del $\text{NADH} + \text{H}^+$ las coenzimas que participan en los sistemas multienzimáticos de las reacciones (1) y (7) se regeneran por las reacciones indicadas en la figura 41.

Desde el punto de vista energético, el ciclo de Krebs no es un gran productor directo de ATP pues por acetato oxidado solo se obtiene un ATP (reacción 8); es en la fosforilación oxidativa donde la reoxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 producirá buenas cantidades de ATP tal como veremos más adelante.

Al igual que en la glicólisis es posible estudiar *in vitro* las diversas reacciones y calcular sus ΔG° empleando las concentraciones determinadas *in vitro*; se encuentra así que varias reacciones del ciclo (1,2,7,11) tienen ΔG° del orden de -8 kcal/mol, es decir son muy exergónicas y su equilibrio está fuertemente desplazado en la dirección que en la figura 42 corresponde al sentido del giro de las manecillas del reloj; estos valores explican por qué las reacciones que en principio son fácilmente reversibles (3, 4, 5), en la célula no ocurren en dirección opuesta.

Es importante recordar que el ciclo de Krebs no es únicamente una vía degradativa sino que a partir de algunos de sus metabolitos, se pueden sintetizar otras biomoléculas. Si por alguna razón alguno de sus metabolitos intermedios es consumido, es posible restaurar su concentración inicial por medio de las llamadas reacciones anapleróticas. Por ejemplo, si hay deficiencia en oxalacetato la reacción:



$$\Delta G^\circ = -0,5 \text{ kcal/mol}$$

permite su síntesis a expensas del consumo de ATP y CO_2 utilizando el piruvato que es un metabolito fácilmente disponible. Puesto que el oxalacetato se usa cíclicamente se puede renovar con esta reacción cualquiera de los intermediarios que participan en el ciclo. El bloqueo de estas reacciones anapleróticas puede conducir a la paralización del ciclo y por ende del metabolismo.

La actividad del ciclo se puede controlar a través de varios factores:

- **Niveles enzimáticos.** Las enzimas están presentes en proporciones constantes y muy seguramente hay un mecanismo de control genético que regula su biosíntesis.
- **Niveles de sustrato.** Las concentraciones de los sustratos son del orden de 10^{-4}M en hígado o en riñón y de 10^{-5}M en células procarióticas (ej. E. coli).
- **Niveles de coenzimas.** Generalmente son cercanos a 10^{-4}M - 10^{-5}M y su disponibilidad es crítica para el funcionamiento de la vía.
- **Accesibilidad o permeabilidad de la membrana.** Es un resultado de las propiedades de la membrana y tiene como efecto el que el NADH, FADH_2 citoplasmáticos no puedan penetrar a la mitocondria para ser reoxidados. A su vez el acetil - CoA intramitocondrial no difunde al exterior (o sea al citoplasma).
- **Control respiratorio.** Este factor resulta del acoplamiento respiración fosforilación. El control se origina en el valor de la relación ADP/ATP. Si el ADP \gg ATP, aumenta la respiración (o sea el catabolismo de acetil-CoA y la fosforilación); si hay exceso de ATP se tiene el efecto inverso debido a la inhibición de la deshidrogenasa que actúa en el paso limitante del ciclo, es decir la oxidación de isocitrato o oxalsuccinato (reacción (5) en la figura 42). Este mecanismo de control es una demostración más del principio de máxima economía que se discutió previamente.

3 Fosforilación oxidativa

Dada la asociación entre esta vía y el ciclo de Krebs, su localización es a nivel de las crestas mitocondriales de los eucariotes y de las membranas celulares de los procariotes; es obvio que tiene lugar sólo en organismos aerobios obligados o facultativos.

La función de la fosforilación oxidativa es doble: por una parte reoxida las coenzimas reducidas ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2) producidas en el ciclo de Krebs, transfiriendo los electrones por una serie de transportadores hasta que finalmente son aceptados por el O_2 ; por otra parte, sintetiza ATP aprovechando las diferencias en potenciales de reducción (ΔE°) que existen entre los transportadores y la convertibilidad de estas diferencias de potencial en energía.

Para facilitar la discusión consideremos primero el transporte de electrones y luego la formación del ATP que le está asociada, sin que por ello se quiera significar que son procesos independientes o consecutivos.

3.1 Transporte de electrones

Las reacciones que tienen lugar en este transporte, son de óxido-reducción y en consecuencia se puede determinar sus potenciales de reducción estándar y aplicarles la ley de Nernst. En la tabla 15 se muestran los principales compuestos que intervienen en el transporte con sus valores de E° .

Forma Reducida	Forma Oxidada	E° (Volts)
Piruvato + HSCoA	Acetil-CoA	-0,48
H ₂	2H ⁺	-0,41
Isocitrato	α -cetoglutarato	-0,38
NADH + H ⁺	NAD ⁺	-0,32
Malato	Oxalacetato	-0,18
FADH ₂	FAD	-0,05
Succinato	Fumarato	+0,03
Citocromo b (Fe ⁺²)	Citocromo b (Fe ⁺³)	+0,07
Citocromo c1 (Fe ⁺²)	Citocromo c1 (Fe ⁺³)	+0,23
Citocromo c (Fe ⁺²)	Citocromo c (Fe ⁺³)	+0,25
Citocromo a (Fe ⁺²)	Citocromo a (Fe ⁺³)	+0,29
Citocromo a3 (Fe ⁺²)	Citocromo a3 (Fe ⁺³)	+0,55
H ₂ O	O ₂	+0,82

Tabla 15: Potenciales de reducción estándar de algunos metabolitos y transportadores de la cadena de electrones

Los transportadores de e⁻ más estudiados son de tres tipos:

- NAD⁺ - Deshidrogenasas y NADP⁺ - Deshidrogenasas
- Flavin -deshidrogenasas
- Citocromos

Las deshidrogenasas del primer tipo poseen NAD⁺ (cuya estructura y modo de acción ya fue discutido) o NADP⁺ como coenzimas. Esta última es muy similar estructural y funcionalmente al NAD⁺ ya que solo difiere en que posee un grupo fosfato adicional que esterifica el OH⁻² en la ribosa de la adenosina. La diferencia más importante reside en que las NAD⁺ - deshidrogenasas actúan preferencialmente en reacciones degradativas y las NADP⁺ - deshidrogenasas catalizan reacciones redox biosintéticas.

Las deshidrogenasas del segundo tipo emplean FAD y FMN (flavinmononucleótido) como enzimas. El FMN es un nucleótido en que interviene la flavina como base nitrogenada, con el mismo mecanismo aceptor de H⁺ que el FAD. Si está interesado en la estructura del FMN consulte alguna de las referencias generales.

El tercer tipo de transportadores está constituido por la familia de los citocromos. Estas proteínas globulares además de su cadena polipeptídica poseen un grupo heme cuya estructura es muy similar al heme de la hemoglobina ya que solo cambian algunos de los sustituyentes sobre el núcleo porfirínico; la diferencia

fundamental estriba en la función de este grupo en los citocromos ya que en ellos el átomo de hierro interviene en el transporte de electrones (e^-) pasando de Fe^{+3} (forma oxidada) a Fe^{+2} (-forma reducida) y viceversa. En los citocromos los sitios de coordinación 5 y 6 del Fe están ocupados por residuos de AA y por tanto no están disponibles para unirse con O_2 , CN^- o CO. La tabla 16 muestra las principales características de los citocromos que participan en el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa.

Proteína	Peso Molecular (Daltons)	E (Volts)	Bandas de Absorción (nm) [*]		
			α	β	γ
Citocromo b	30.000	+ 0,07	563	532	429
Citocromo c	370.000	+0,23	554	524	418
Citocromo c	12.500	+0,25	550	521	415
Citocromo a	240.000**	+0,29	600	-	439 (Cu presente)
Citocromo a ₃		+0,55	603	-	443 (Cu presente)

* Bandas de absorción de la forma reducida

** Complejo a +a₃

Tabla 16: Algunas propiedades fisicoquímicas de los citocromos de la fosforilación oxidativa

Estas proteínas, con excepción del citocromo c, están fuertemente asociadas a la membrana mitocondrial lo cual ha dificultado su purificación y caracterización detallada. Sin embargo se conoce su composición en AA y los estudios comparativos de secuencia hechos con el citocromo c han permitido establecer cómo ha evolucionado esta proteína en los diversos organismos aerobios.

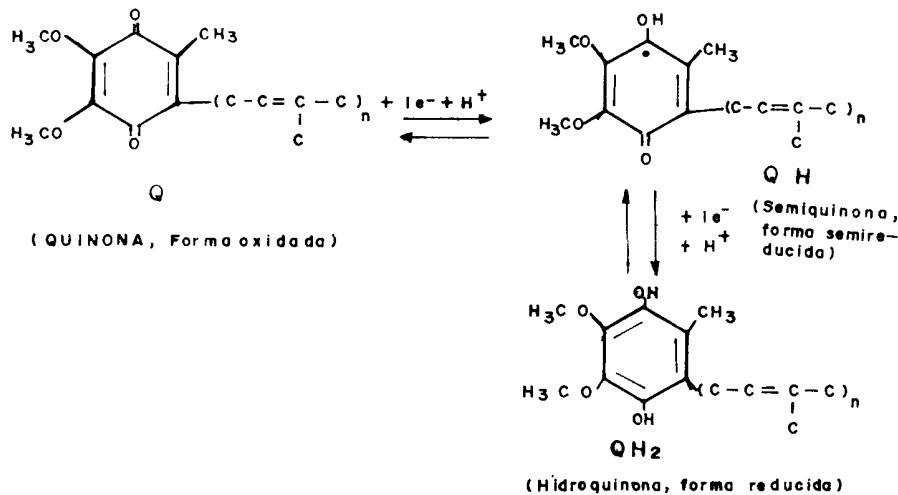
La estrategia seguida para establecer los componentes y su orden, en la cadena de transporte de electrones es un buen ejemplo de cómo la evidencia experimental de diferente naturaleza puede integrarse para construir un modelo de una vía metabólica. En el caso presente se tuvieron en cuenta los siguientes hechos:

- Es factible aislar de las mitocondrias complejos de algunos de los transportadores ej: NAD - deshidrogenasa asociada con citocromo b, coenzima Q y proteínas Fe-S o citocromo c asociado a citocromo c₁. Esto significa que hay una organización de estos componentes en la membrana.
- El orden en que se coloquen los transportadores debe considerar los valores de E° y se irá del más negativo hasta el más positivo o sea hasta el O_2 como aceptor final de los e^- .
- El transporte de e^- puede ser bloqueado selectivamente en varios puntos gracias a la existencia de inhibidores de este transporte; los más estudiados son la rotenona, el amital, la antimicina A y el ión CN^- . Estos inhibidores provocan la acumulación de las formas reducidas de los transportadores que están localizados antes del sitio de acción del inhibidor; los transportadores posteriores están en su forma oxidada y estas dos formas se pueden distinguir espectroscópicamente. Los estudios con inhibidores del transporte de e^- han

sido particularmente útiles para establecer el orden de aquellos transportadores para los cuales no se conoce su valor de E° .

Además de los transportadores ya discutidos, se han aislado:

- Coenzima Q (o ubiquinona). Es una benzoquinona con 8-10 radicales isopreno ($n = 8, n = 10$) que actúa en reacciones redox de la siguiente forma:



- Proteínas Fe-S. Estas proteínas se caracterizan por poseer átomos de Fe unidos a S lábil, que no corresponde al S del Meto o CySH. Intervienen en reacciones redox a través del Fe que pasa de Fe^{+2} a Fe^{+3} o viceversa.

Considerando el conjunto de la evidencia experimental se ha propuesto que la cadena de transporte de electrones se realiza según el esquema de la figura 44.

En este esquema observamos que el donador inicial de $2e^-$ y $2H^+$, es un sustrato (metabolito) que al oxidarse cede sus e^- sobre el NAD^+ (caso del piruvato \rightarrow Acetil-CoA + CO_2 , del isocitrato \rightarrow oxalsuccinato, del α -cetoglutarato \rightarrow succinil-CoA + CO_2 o del malato \rightarrow oxalacetato; reacciones del ciclo de Krebs, ver figura 42, que pasa a $NADH + H^+$ que al cederlos $2e^-$ y $2H^+$ sobre el FMN se reoxida, formándose $FMNH_2$. Esta coenzima cede los $2e^-$ sobre las proteínas Fe-S que se reducen y los $2H^+$ salen de la mitocondria; esta reacción redox permite regenerar el FMN (o FAD según el caso) y constituye un segundo sitio de entrada de e^- a la cadena en el caso en que el metabolito al oxidarse produzca $FADH_2$ (o $FMNH_2$) como sucede en el paso de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs. Vemos que así son reoxidados el $NADH + H^+$ y el $FADH_2$ producidos en Krebs; las reacciones siguientes en la cadena de transporte de electrones tienen como objeto canalizar los electrones a través de una serie de transportadores (coenzima Q, citocromo b, citocromo c_1 , etc) hasta llevarlas finalmente sobre el O_2 y producir H_2O .

En la figura 44 se indican también los sitios donde actúan los inhibidores del transporte de electrones; por ejemplo el CN^- impide la transferencia de e^- del

complejo citocromo $a + a_3$ al oxígeno molecular, provocando un bloqueo de la cadena respiratoria y en consecuencia impidiendo la reoxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 con lo cual se paralizan las vías metabólicas (comenzando por el ciclo de Krebs).

En los procariotes (donde no existen las mitocondrias) el transporte de electrones se realiza en la membrana celular por un mecanismo similar y algo más sencillo como se indica en la figura 45. Aquí la coenzima Q pasa directamente de la forma Q a QH_2 y la salida de los H^+ es hacia el medio circundante de la célula.

Una discusión detallada de los esquemas de transporte de electrones se encuentra en la lectura recomendada No.3.

3.2 Fosforilación - Síntesis de ATP

Como ya dijimos la fosforilación del ADP esta íntimamente asociada al transporte de electrones. Empleando la ecuación: $\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ$

donde $n = 2$ electrones, F (expresado en faradays) cuyo equivalente energético es igual a 23062 calorías podemos calcular la energía teóricamente disponible que tenemos en la cadena cuyos E° van de -0.32 a +0.82 volts.

Entonces: $\Delta G^\circ = -2 \times 23062 \times (0.82 - (-0.32)) = -52.7 \text{ kcal}$, lo que significa que se tiene, en principio, energía suficiente para sintetizar varios ATP ya que la formación de un ATP cuesta 7300 cal /mol.

Usando la misma fórmula podemos calcular cual sería la ΔE° mínima para sintetizar un ATP:

$$\begin{aligned} -7300 &= -2 \times 23062 \Delta E^\circ \\ \Delta E^\circ &= 0.22 \text{ volts} \end{aligned}$$

O sea que en aquellos sitios donde la diferencia en los potenciales de reducción estándar de dos transportadores sea igual o mayor que este valor podemos tener energía suficiente para formar un ATP.

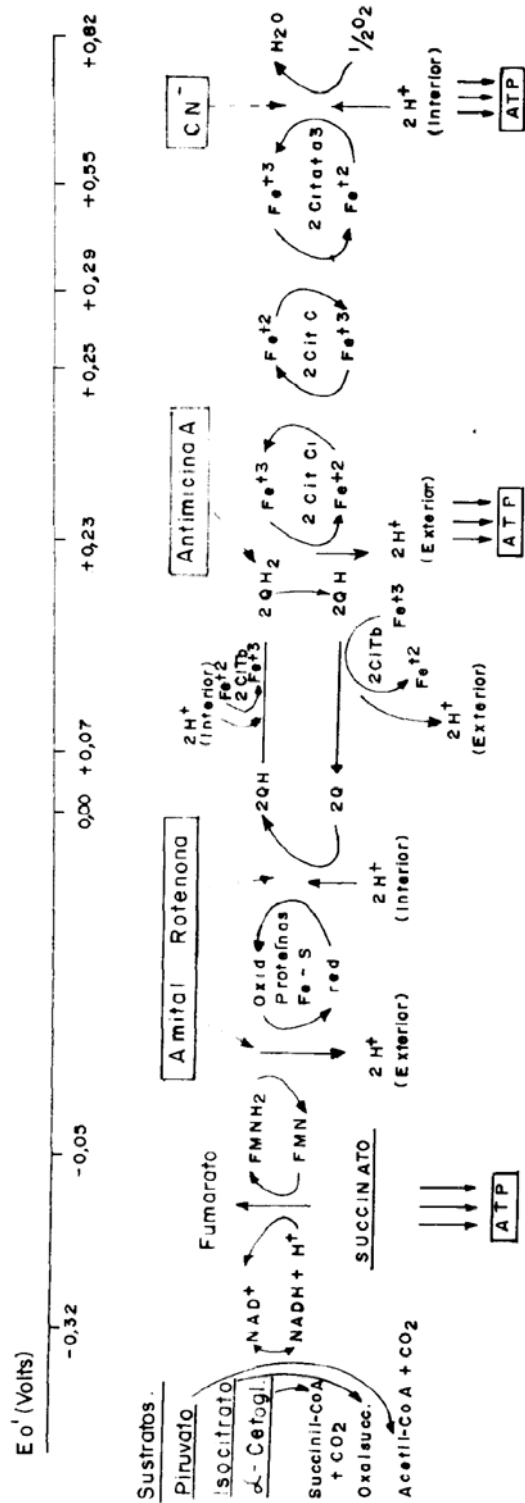


Figura 44: Fosforilación oxidativa en mitocondrias

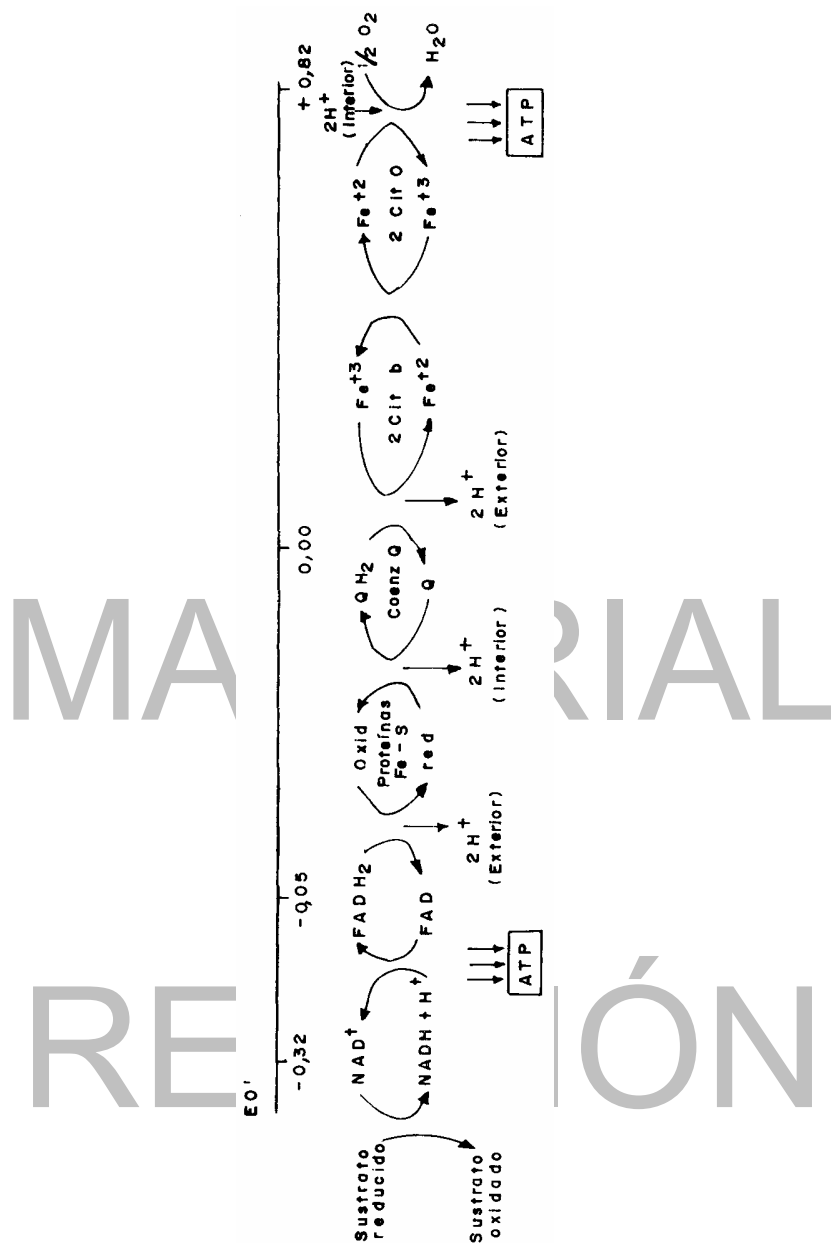


Figura 45: Fosforilación oxidativa en procariotes

El estudio experimental de la fosforilación oxidativa *in vivo* ha permitido establecer como puntos fundamentales:

- La relación P : O (incorporación de Pi como fósforo orgánico, o sea ATP/mol O₂ consumido) es de 3 si se parte de la oxidación piruvato → Acetil-CoA + CO₂ o de isocitrato → α-ceto glutarato + CO₂; cuando se oxida succinato → fumarato, P : O = 2.

- Existen sustancias como el 2,4-dinitrofenol o la valinomicina que permiten el transporte de electrones hasta el oxígeno pero sin que se forme ATP, es decir desacoplan la oxidación de la fosforilación. Estas sustancias no tienen ningún efecto sobre las fosforilaciones a nivel de sustrato que ocurren por ejemplo en la glicólisis o en el ciclo de Krebs, porque allí la producción de ATP no está ligada al transporte de electrones en una cadena.
- Hay una salida de H^+ ($6H^+$ en mitocondrias y $4H^+$ en células procarióticas) como consecuencia del transporte de e^- (ver figuras 44 y 45). Esto genera un gradiente de potencial a través de la membrana, que es impermeable a la difusión simple de H^+ . La entrada de estos H^+ está asociada a la formación de ATP.
- En la membrana existe una ATP asa (o sistema $F_1 - F_0$) que dadas las condiciones apropiadas, es capaz de sintetizar ATP a partir de ADP y Pi.

Reuniendo toda la evidencia experimental disponible y con las consideraciones termodinámicas iniciales, Mitchell ha propuesto la llamada teoría quimio-osmótica para explicar la síntesis del ATP en la fosforilación oxidativa y también en la fotosíntesis¹. (Una discusión detallada la encuentra en la lectura recomendada No. 3) En las figuras 44 y 45 se indican los sitios de la cadena que cumplen las condiciones para la síntesis del ATP.

Si hacemos un balance global de materiales de la fosforilación oxidativa vemos que:

- Se reoxidan las coenzimas $NADH + H^+$ y $FADH_2$ producidas en el ciclo de Krebs.
- Se consume media molécula de O_2 por par de electrones transportados.
- Por cada par de electrones transportados desde el $NADH + H^+$, se producen 3 ATP.
- Por cada par de electrones transferido a partir de $FADH_2$ se sintetizan 2 ATP.
- El rendimiento energético de la vía es de un 40% calculado así:
 - Componente exergónico dado por la reacción:
 $NADH + H^+ + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O, \quad \Delta G^{o'} = -52.7 \text{ kcal/mol}$
 - Componente endergónico dado por la reacción:
 $3ADP + 3Pi \rightarrow 3ATP + 3H_2O, \quad \Delta G^{o'} = +21.9 \text{ kcal/mol}$

$$\text{Rendimiento} = \frac{21.9 \times 100}{52.7} = 40\%$$

Este rendimiento es mayor que los obtenidos en las vías ya discutidas.

4 Vía del glicerol fosfato

La segregación existente entre el NAD^+ / $\text{NADH} + \text{H}^+$ citoplasmáticos y mitocondriales, debida a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial para la entrada de estas coenzimas, plantea la pregunta de cómo se efectúa la reoxidación de las coenzimas presentes en el citoplasma.

La respuesta la constituye la vía del glicerol-fosfato que mostramos en la figura 46 y que además es una excelente ilustración de la permeabilidad selectiva de la membrana mitocondrial.

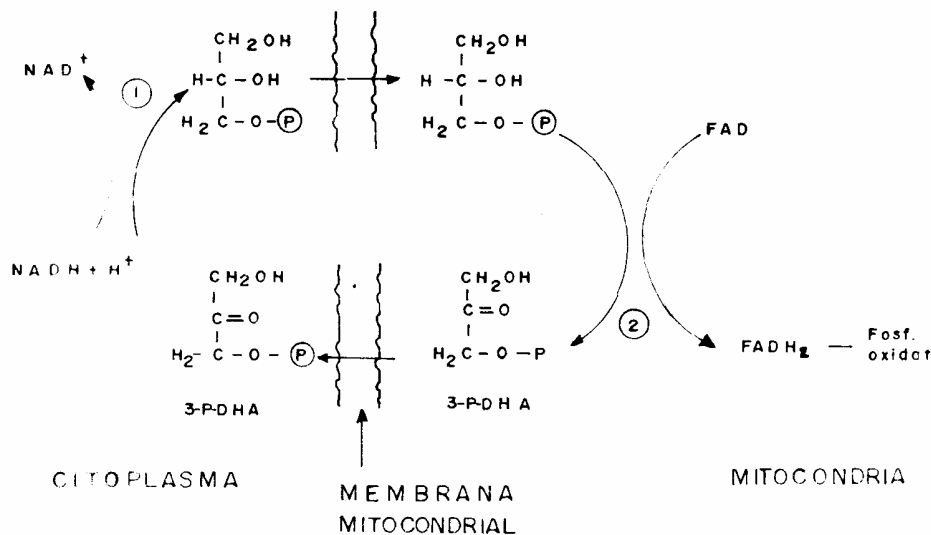


Figura 46: Esquema de la vía del glicerol-fosfato

En la figura observamos que el $\text{NADH} + \text{H}^+$ producido citoplasmáticamente (por ejemplo en la glicólisis) es reoxidado (por una deshidrogenasa, reacción 1) al reducir la 3-P-DHA (que es un metabolito fácilmente disponible en el citoplasma)

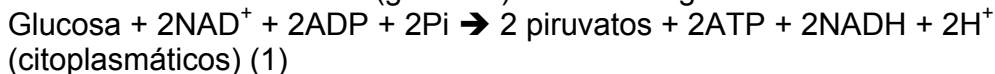
para dar glicerol 3- P ; este compuesto sí puede atravesar la membrana mitocondrial y al interior sufre una reoxidación por acción de una deshidrogenasa que emplea el FAD como coenzima (reacción 2).

El resultado es la producción de FADH_2 que es reoxidado en la fosforilación oxidativa y de 3-P-DHA que difunde al exterior de la mitocondria donde es reutilizado en la reoxidación de una nueva molécula de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Vemos entonces que la triosa es utilizada cíclicamente y que la producción de un $\text{NADH} + \text{H}^+$ citoplasmático resulta en la aparición de un FADH_2 mitocondrial que al ser reoxidado produce 2 ATP/mol FADH_2 .

5 Balance global de la oxidación de glucosa

Comparemos ahora los balances de sustrato carbonado y de ATP cuando la glucosa es oxidada anaeróbicamente o aeróbicamente.

En la oxidación anaerobia (glicólisis) la reacción global será:



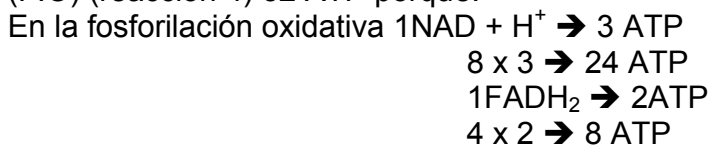
Por tanto se producen 2 moles de piruvato y 2 ATP/mol glucosa oxidada.

En la oxidación aerobia (glicólisis + ciclo de Krebs + fosforilación oxidativa) tendremos:

Citoplasma (Glicólisis)	$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \rightarrow 2 \text{ Piruvatos} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \text{ (1)}$
M I T O C O N D R I A	$2 \text{ Piruvatos} + 2\text{NAD} + 2\text{HSCoA} \rightarrow 2\text{Acetil-CoA} + 2\text{CO}_2 + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \text{ (2)}$
	$2 \text{ Acetil-CoA} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} + 6\text{NAD} + 2\text{FAD} \rightarrow 4\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 6\text{NADH} + 6\text{H}^+ + 2\text{FADH}_2 \text{ (3)}$
	$8\text{NADH} + 8\text{H} + 4\text{FADH}_2 + 6\text{O}_2 + 32\text{ADP} + 32\text{Pi} \rightarrow 8\text{NAD} + 4\text{FAD} + 6\text{H}_2\text{O} + 32\text{ATP} \text{ (4)}$

En la oxidación aerobia los 2 piruvatos son oxidados por el complejo multienzimático de la piruvato decarboxilasa (reacción (2) y por su parte los 2 Acetil-CoA son completamente oxidados en Krebs (reacción 3) hasta 4CO₂ y que con los 2CO₂ de (2) nos dan los 6 carbonos de la glucosa.

Las coenzimas: 8NADH + 8H⁺ = 2 (de la reacción 2) + 6 (de la reacción 3); y 4FADH₂ = 2 (de la reacción 3) + 2 (que se producen por la vía del glicerol 3-**F**) a partir de los 2NADH + 2H⁺ citoplasmáticos) producen en la fosforilación oxidativa (F.O) (reacción 4) 32 ATP porque:



La cantidad total de ATP producido en esta oxidación aerobia de la glucosa será: 2ATP (reacción 1) + 2ATP (reacción 3) + 32ATP (reacción 4) = 36 ATP

Es decir la energía recuperada será: 36 x 7300/686.000 = 40%

El calor de combustión de la glucosa es 686.000 cal/mol y corresponde al 100% de la energía acumulada en un mol de glucosa; se observa que por mol de glucosa la oxidación aerobia produce 18 veces más energía que la anaerobia (36ATP vs 2ATP) lo que significa que, para obtener una cantidad dada de energía, una célula facultativa consume 18 veces más glucosa en condiciones anaerobias que en condiciones aerobias y además acumula lactato en condiciones anaerobias.

Si se pasa a condiciones aerobias (es decir admite O_2) baja el consumo de glucosa y desaparece el lactato; esto es lo que se conoce como el efecto Pasteur.

6 Vía de las pentosas fosfatos

Esta vía degradativa que ocurre en el citoplasma de todos los organismos, constituye una alternativa muy interesante en el catabolismo de los carbohidratos. Gracias a esta vía la célula puede:

- Producir NADPH + H^+ en el citoplasma, lo cual es especialmente importante en aquellos tejidos que realizan biosíntesis que requieren esta coenzima por ejemplo el hígado, tejido adiposo o corteza de glándulas suprarrenales donde se sintetizan ácidos grasos y esteroides. En este aspecto es la única vía por la cual muchas células (excluyendo aquellas que realizan fotosíntesis) obtienen su NADPH + H^+ .
- Obtener pentosas, en especial D-ribosa, que se requiere para biosintetizar los nucleótidos.
- En la etapa oscura de la fotosíntesis, generar metabolitos que sirven como precursores de la glucosa.
- Obtener una serie de monosacáridos C_4 , C_5 y C_7 que emplea como intermediarios para otras vías.

En forma global podemos considerar tres etapas en la vía de las pentosas fosfato:

- Oxidación de la glucosa -6-P (hexosa) hasta ribulosa -5- P (pentosa).
- Interconversión reversible de las pentosas fosfato.
- Transformación de las pentosas fosfato en hexosas fosfato.

Las reacciones que suceden en esta vía se muestran en la figura 47 donde para una mejor comprensión del balance de C y de cómo ocurren las reacciones, consideramos inicialmente 6 moléculas de glucosa-6-P (Glc-6-P).

En esta figura empleamos la representación gráfica de los monosacáridos donde sólo se indica la posición de los grupos OH, sin tener en cuenta los átomos de H unidos al carbono tetravalente. Esta hexosa proviene de una fosforilación de la glucosa o de la fosforilación e isomerización de otras hexosas como fructosa o galactosa (reacciones 2-7 de la figura 39).

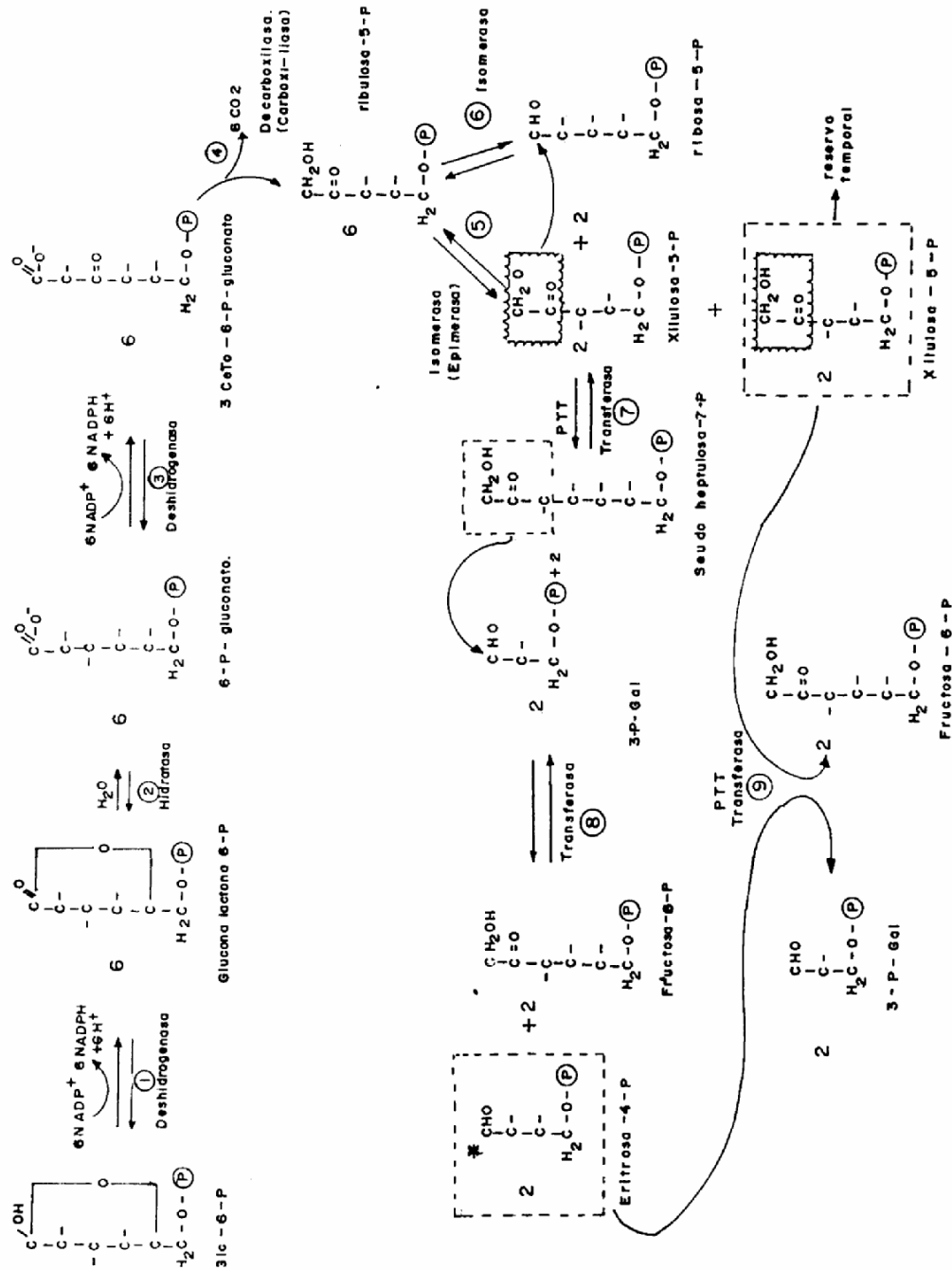


Figura 47: Vía de las pentosas fosfato

En la primera etapa de la vía la Glc-6-P es oxidada en dos pasos por deshidrogenasas que utilizan el NADP^+ como coenzima (reacciones 1, 2, 3) produciendo $\text{NADPH} + \text{H}^+$ y 3-ceto-6-fosfogluconato que por ser un β -ceto ácido

se decarboxila por medio de una decarboxilasa, reacción 4, produciendo 6 moléculas de CO₂ y 6 de una pentosa fosfato que corresponde a la ribulosa -5-P (una cetosa).

En esta primera etapa tiene lugar entonces la degradación de las hexosas y las reacciones de las etapas siguientes, además de producir los monosacáridos intermediarios que alimentarán otras vías, servirán para regenerar parte de las 6 moléculas de hexosa degradadas.

En la segunda etapa (reacciones 5 y 6) se interconvierten reversiblemente las pentosas fosfato entre sí; esta interconversión se realiza gracias a isomerasas que permiten la fácil conversión de unas pentosas en otras.

Dependiendo de las necesidades globales de la célula se puede entonces canalizar la producción hacia una pentosa determinada; si por ejemplo la célula va a iniciar una mitosis, se requerirá una buena cantidad de nucleótidos disponibles para la síntesis de ácidos nucleicos; a su vez ello implica que la ribosa (o deoxirribosa), según el caso, esté disponible para la formación de los precursores (ATP, GTP, CTP, etc). En nuestro diagrama, para facilitar el balance de C, consideramos que las seis moléculas de ribulosa-5-P generan dos de ribosa-5-P (reacción 6) y cuatro de xilulosa-5-P. De estas 4 xilulosa-5-P, dos moléculas se combinarán con dos de ribosa-5-P (reacción 7) y dejamos en reserva las otras dos moléculas de xilulosa-5-P.

La última etapa, que se inicia con la reacción 7, posibilita la obtención de una serie de monosacáridos (tetrasas y heptosas) que no hemos encontrado hasta ahora ni como intermediarios ni como productos de las vías ya estudiadas.

Además las reacciones que ocurren en esta etapa son las reacciones que en sentido contrario constituyen parte de la etapa oscura de la fotosíntesis; por ello su conocimiento y comprensión en este momento nos facilitará el estudio de las reacciones de la fotosíntesis.

Esta etapa comienza con la transferencia de un fragmento de la xil -5-P (indicado en el recuadro) sobre el carbono 1 de la Rib-5-P; esta reacción está catalizada por una transferasa (transcetolasa) que tiene como coenzima el pirofosfato de tiamina (PTT) y es reversible; el paso del fragmento (2) sobre la pentosa (C₅) nos genera la pseudoheptulosa (C₇) y el fragmento residual (C₃ = C₅ - C₂) corresponde al 3-P-Gliceraldehído (3-P-Gal).

En la próxima reacción (8) tiene lugar una segunda transferencia que ahora es un fragmento C₃ (mostrado en el recuadro y se refiere a que el residuo tiene tres carbonos unidos entre sí) de la pseudoheptulosa, sobre el C₁ (carbono número uno de la molécula) del 3-P-Gal; la transferasa que interviene aquí (trans aldolasa) es diferente de la anterior.

Como resultado nos aparece una hexosa ($C_6 = C_3 + C_3$) que corresponde a Frc-6-P y una tetrosa ($C_4 = C_7 - C_3$) que es la Eritrosa-4-P; ya que consideramos anteriormente que esta etapa se inició con dos moléculas de xil-5-P y 2 de Rib-5-P, tendremos hasta aquí, 2 moléculas de Frc-6-P y 2 moléculas de Eritrosa-4-P.

Las dos Eritrosa-4-P se combinan ahora con las dos moléculas de xil-5-P que teníamos en reserva, gracias a una transcetolasa (similar a la de la reacción 7) y el fragmento C_2 de la Xil-5-P (en el recuadro) va sobre el C_1 de la tetrosa formando una hexosa ($C_6 = C_2 + C_4$); el resto es la triosa 3-P-Gal.

Como balance del sustrato carbonado en esta vía tenemos entonces que a partir de 6 hexosas se produjeron $6CO_2$ (reacción 4) y se formaron 2 mol de 3-P-Gal y 4 de Frc-6-P (reacción 8 y 9). Dado que a partir de 2 moléculas de 3-P-Gal se puede formar una molécula de Frc-6-P (reacción inversa a la reacción 9 b de glicólisis), tendremos 5 moléculas de Frc-6-P que se pueden isomerizar a 5 moléculas de Glc-6-P. En resumen, usando 6 mol de hexosa obtenemos por oxidación $6CO_2$ y recuperamos 5 mol de hexosa.

Una discusión detallada de las reacciones de esta vía la encuentra en el artículo de B. Axelrod¹.

En lo referente al balance de coenzimas vemos que por 6 Glc-6-P que entran en la vía, se obtienen $12NADPH + 12H^+$ (reacción 1 + 3) que podrán usarse en biosíntesis que impliquen reducciones y así regenerar el $NADP^+$. En esta vía no hay producción o consumo de ATP y por tanto no es un sistema por el cual la célula puede obtener energía al degradar los monosacáridos; su importancia como ya vimos es otra.

No sobra anotar que en la célula tanto esta vía como la glicólisis ocurren simultáneamente y la magnitud relativa de una de ellas respecto a la otra, depende de las necesidades metabólicas en un momento dado.

Actividad 6

1. Analice la glicólisis, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la vía de las pentosas fosfato en lo que se refiere a:

- Sitio de la célula donde tiene lugar.
- Transformación global que ocurre en cada una.
- Metabolitos iniciales y finales.
- Metabolitos intermedios que sirven como puntos de enlace con otras vías.
- Rendimiento energético.

Para este análisis establezca un cuadro comparativo con los diferentes aspectos, empleando la información dada en cada vía.

2. Considere las siguientes reacciones que ocurren en el eritrocito durante la glicólisis:

			ΔG°
Glc + ATP	→	Glc-6-P + ADP	- 4,0
PEP + ADP	→	Piruvato + ATP	-7,5
3- P-Gato	→	2-P-Gato	+1,06

Si en estado estacionario las concentraciones intracelulares son (en μ Moles):

Glc	5.000	ADP	138	3-P-Gato	118
Glc-6-P	83	PEP	23	2-P-Gato	30
ATP	1850	Piruvato	51		

Calcule el $\Delta G'$ para cada reacción; deduzca si la reacción ocurre o no y determine hacia donde se desplaza el equilibrio. Utilice la ecuación $\Delta G' = \Delta G^{\circ} + RT \ln K$, considerando una temperatura de 25°C.

3. Efectúe el balance de carbono, ATP y coenzimas, cuando una molécula de sacarosa es oxidada anaeróbicamente. Compare los valores con los obtenidos cuando la sacarosa es oxidada completamente. Recuerde que la oxidación completa incluye glicólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

4. Calcule el número de ATP producido por la oxidación anaerobia de 1.5 m moles de Glucosa y compárelos con los obtenidos en la oxidación aerobia de 0,75 m moles de Glucosa. Explique la razón de la diferencia.

5. Analice en forma comparativa la glicólisis con la vía de las pentosas fosfato. Proceda por etapas considerando además de los aspectos mencionados en el primer punto, las reacciones que se suceden.

Autoevaluación No. 12

1. Elabore un cuadro de las vías catabólicas de los carbohidratos comparándolas respecto a su localización celular, compuestos iniciales y terminales, metabolitos intermedios que sirven como puntos de conexión con otras vías y su balance energético en términos de ATP.
2. Demuestre cómo en la glicólisis ocurren reacciones que ilustran uno de los principios generales del metabolismo.
3. Ilustre con dos ejemplos la permeabilidad selectiva de las membranas. Explique las consecuencias que tiene en cada caso este fenómeno.

4. Coloque en orden decreciente las vías catabólicas de los carbohidratos respecto a:
 - Su ocurrencia en diferentes tipos de organismos (universalidad).
 - Grado de importancia como productoras de metabolitos comunes con otras vías.
 - Capacidad de producción de energía (ATP).
 - Grado de complejidad en términos del número y variedad de reacciones, diferentes coenzimas que actúan y variedad de sustratos que alimentan.
5. Explique en qué consisten las reacciones anapleróticas ¿Cuál es su importancia? Cite un ejemplo.
6. Explique cómo está controlada la actividad del ciclo de Krebs.
7. Explique cuál es la diferencia entre fosforilación a nivel de sustrato y fosforilaciones oxidativas. Dé un ejemplo de cada una, señalando la vía en la que tiene lugar.
8. Describa como sucede la fosforilación oxidativa en eucariotes. Indique los principales transportadores de e^- , los sitios de fosforilación y la acción de los agentes desacoplantes.
9. Deduzca a partir de las reacciones que ocurren en la vía del glicerol-3-fosfato, cuál es la utilidad de esta vía.
10. Plantee las finalidades de la vía de las pentosas fosfato.

Lecturas recomendadas

Para ampliar algunos conceptos tratados en este capítulo, consulte:

1. The source of muscular energy/ Rodolfo Margaria.- - Scientific American.- - Vol 226, 1972.- - p84.
2. Cytochrome C and the evolution of energy metabolism/ Richard E. Dikerson.- - Scientific American.- - vol 242, 1980.- - p137
3. How ceil make A TP/ Peter C. Hinkle, Richard. E. McCaity.- - Scientlflc American. - vol 238, 1978.- - p104.

CAPITULO 2: BIOSÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS

Objetivos

- Explicar las diferentes vías por las cuales se realiza la biosíntesis de carbohidratos.
- Ilustrar los principios organizativos de la biosíntesis.
- Identificar en cada vía su localización celular, metabolitos iniciales y finales, metabolitos intermedios más importantes y las coenzimas que participan.
- Realizar para cada vía los balances de compuestos carbonados, coenzimas y energía (como ATP).
- Aplicar los conceptos de bioenergética para explicar la ocurrencia o no de algunas reacciones metabólicas.
- Establecer las analogías y diferencias entre las vías degradativas y biosintéticas de monosacáridos.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 13

1. Ilustrar con dos ejemplos cómo se acopla la oxidación de un metabolito a la producción de compuestos con alto PTG.
2. Identifique la función primordial de las siguientes vías:
 - a. Ciclo de Krebs.
 - b. Pentosas fosfato.
 - c. Glicerol-3- fosfato.
 - d. Glicólisis.
 - e. Fosforilación oxidativa.
3. Explique en qué tipos de reacciones intervienen:
 - a. NAD
 - b. Pirofosfato de tiamina
 - c. Coenzima A
 - d. FAD
 - e. NADPH + H⁺
 - f. Citocromos.Cite una vía (o varias, si es el caso) en la que actúen.
4. ¿Qué es una reacción anaplerótica?
5. Indique la secuencia de reacciones por las cuales el succinato se transforma en oxalacetato; señale las coenzimas que actúan en cada reacción.
6. Explique las transformaciones que ocurren en cada una de las etapas de la vía de pentosas fosfato.

INTRODUCCIÓN

En este capítulo estudiaremos las dos vías biosintéticas más importantes de carbohidratos que son la gluconeogénesis (o biosíntesis de glucosa) y la fotosíntesis.

En general todos los procesos biosintéticos requieren del aporte de energía ya que ella es necesaria para formar los enlaces químicos del precursor o de la biomolécula que se esté formando; si adicionalmente el proceso incluye reacciones de reducción, la coenzima de la deshidrogenasa es casi siempre NADPH + H⁺ que proviene o de la vía de pentosas fosfato o de la fotosíntesis (en el caso de las plantas).

1 Principios organizativos

Las vías biosintéticas o anabólicas transcurren en la célula gracias a varios principios organizativos entre las cuales podríamos enumerar:

- La secuencia de reacciones que constituyen la vía biosintética de una biomolécula generalmente difiere en varios pasos de la vía usada para su degradación. A pesar de que muchas enzimas pueden actuar en la una o en la otra, siempre intervienen algunas enzimas propias de la vía anabólica que no aparecen en la contra parte degradativa. Esta diferencia preserva la integridad del metabolismo global pues así éste no depende de las concentraciones relativas de los metabolitos que podrían, si las vías fueran completamente reversibles, influir en el sentido de las mismas.
- Las vías anabólicas están controladas por enzimas reguladoras diferentes de aquellas que actúan en la vía catabólica correspondiente. Se establece entonces una regulación dinámica que opera de manera recíproca, es decir si se estimula el proceso biosintético de una biomolécula se inhibe su proceso degradativo o a la inversa.
Además las enzimas reguladoras de biosíntesis generalmente actúan en las etapas iniciales de la vía, de manera que se evitan reacciones innecesarias que conduzcan a intermediarios no utilizables o no requeridos por la célula en ese momento. Tenemos aquí una nueva aplicación del principio de la máxima economía celular.
- Las reacciones biosintéticas son consumidoras de energía y están acopladas a la degradación del ATP. Esta degradación tiene lugar de tal manera que el ΔG° de hidrólisis es mayor que el ΔG° requerido para la biosíntesis y por tanto la reacción es esencialmente irreversible. Generalmente el ATP se degrada a AMP y $\text{F} \text{---} \text{F}$ compuesto este último que se hidroliza, por acción de una pirofosfatasa en 2 Pi.

Dicho de otra manera por cada nuevo enlace que se forma, se rompen 2 enlaces ricos en energía.

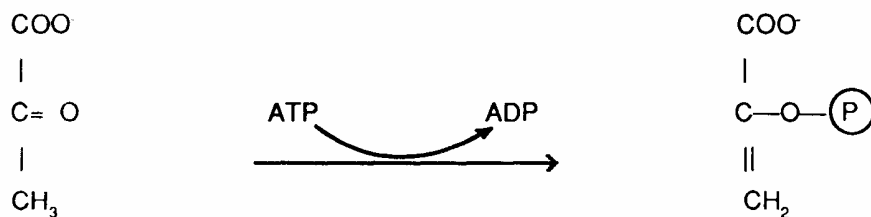
2 Gluconeogénesis

Dada la importancia de la glucosa como sustancia que al ser oxidada produce energía, la célula (o el organismo) tendrá una enorme ventaja si puede sintetizarla a partir de metabolitos que no sean carbohidratos. Esta vía tiene lugar parcialmente en el citoplasma y la mitocondria y en los animales es especialmente importante en tejidos como el hígado y la corteza renal.

La figura 48 muestra las reacciones por las cuales sucede la gluconeogénesis. Observamos en ella que muchas reacciones ya las hemos encontrado en sentido contrario en la glicólisis; específicamente nos referimos a las reacciones 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 14. (Ver figura 39).

La reacción 5 se inicia con el PEP y la reacción 11 y siguientes arranca con la Frc -1,6-Di-P.

Veamos en primer término cómo es posible obtener PEP a partir de piruvato en forma indirecta. La reacción directa sería:



Tiene un $\Delta G^{\circ} = +7,5$ kcal por la cual es muy costosa energéticamente y termodinámicamente está prohibida; es por ello que en la glicólisis se realiza en dirección contraria (reacciones 15 y 16. fig. 39).

La célula utiliza un rodeo para obtener este PEP. En la figura 48 vemos que el piruvato (que proviene de distintas fuentes) entra a la mitocondria y allí por acción de una carboxilasa (reacción 1) y ATP se genera oxalacetato. Este es un ejemplo de una reacción anaplerótica estando regulada la enzima por acetil-CoA que requiere para la reacción. El paso posterior (2) permite obtener malato que puede salir de la mitocondria y en el citoplasma es reoxidado a oxalacetato (3); ahora actúa una carboxikinasa que con GTP como donador de P nos da PEP (reacción 4).

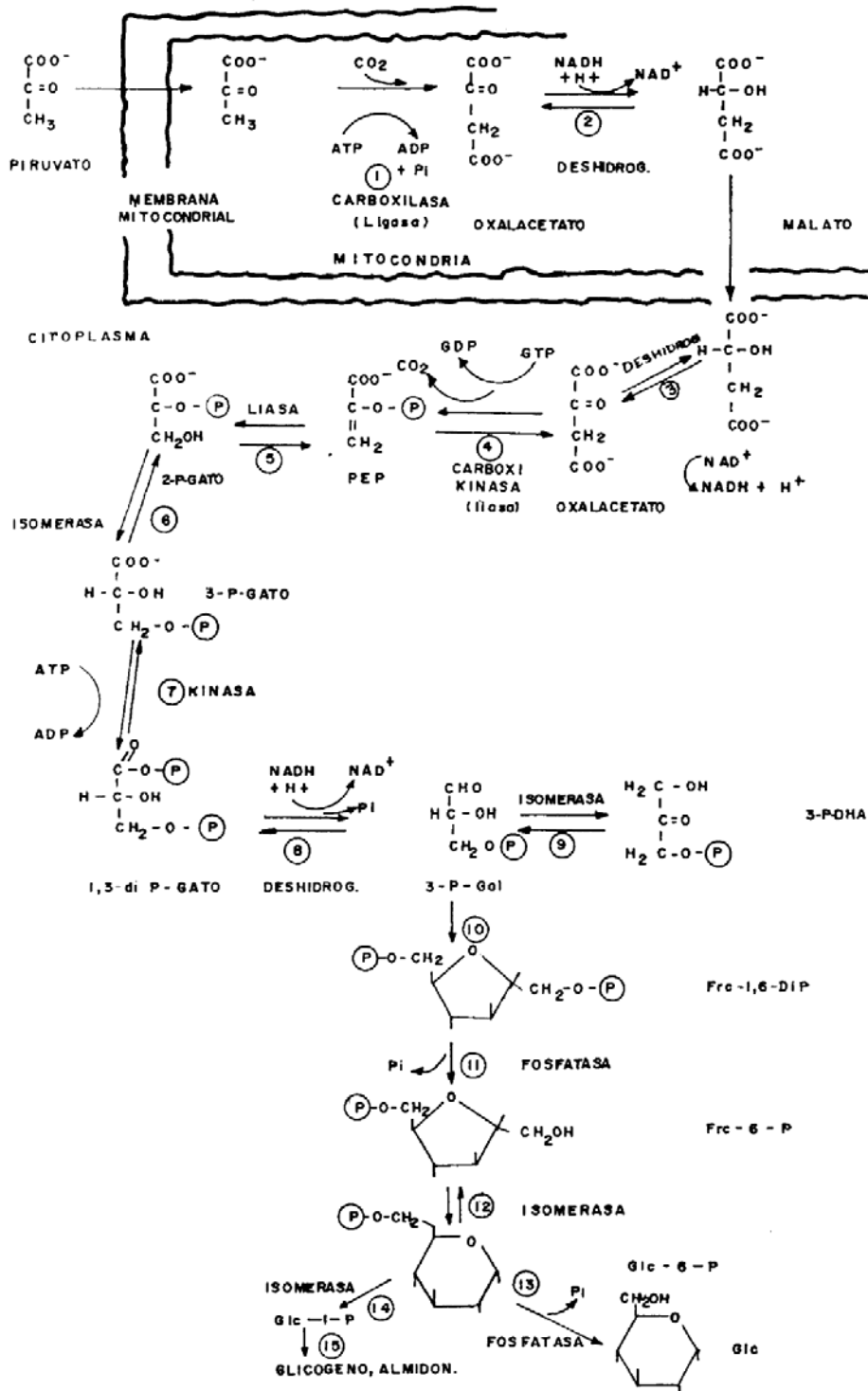


Figura 48: Secuencias de las reacciones de la gluconeogénesis

Si consideramos los cambios en energía libre tendríamos lo siguiente:

Paso No.	Reacción	ΔG° kcal
1	Piruvato + CO ₂ + ATP $\xrightarrow{\text{carboxilasa}}$ Oxalacetato + ADP + Pi	-0.5
2	Oxalacetato + NADH + H ⁺ $\xrightarrow{\text{Deshidrogenasa}}$ Malato + NAD ⁺	-6.7
3	Malato + NAD ⁺ $\xrightarrow{\text{Deshidrogenasa}}$ Oxalacetato + NADH + H ⁺	+6.7
4	Oxalacetato + GTP $\xrightarrow{\text{Liasa}}$ PEP + GDP + CO ₂	+0.7

Globalmente tendremos un $\Delta G^{\circ} = +0.2 \text{ kcal} = (-0.5 - 6.7 + 6.7 + 0.7)$ lo que significa que la reacción global (sumando 1 a 4):



Esta reacción es termodinámicamente posible; hay que anotar que aquí también se ilustra el principio del gasto de dos enlaces ricos en energía por la formación de uno.

Esta formación de PEP a partir de piruvato es un ejemplo del primer principio enunciado al comienzo del capítulo.

Las reacciones 5 a 10 son inversas a las de la glicólisis y por ellas se llega hasta Frc1,6-Di P.

El paso de Frc-1,6-DiP a Frc-6-P (reacción 1) constituye la segunda diferencia con la glicólisis; si la reacción fuese inversa a la de glicólisis se tendría:

Frc-1,6-DiP + ADP \rightarrow Frc-6-P + ATP, con un $\Delta G^{\circ} = +3,4 \text{ kcal}$ lo que la hace irrealizable.

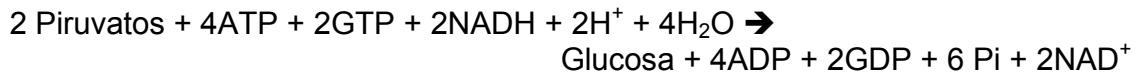
En la glucogénesis actúa una fosfatasa que hidroliza la fructosa-difosfato produciendo Frc- 6-P y libera fósforo inorgánico (Pi) con un $\Delta G^{\circ} = 4,0 \text{ kcal}$.

La actividad de esta enzima reguladora está controlada por la relación ATP/AMP siendo el ATP un modulador positivo (estimula la actividad) y el AMP un modulador negativo.

La tercera reacción diferente a la que ocurre en la glicólisis es la defosforilación de Glc-6-P a Glc (reacción 13); aquí también actúa una fosfatasa que cataliza la reacción:



De esta manera se puede sintetizar Glc a partir de 2 piruvatos. La reacción global sería:



Luego por cada molécula de Glc formada se gastan 6 enlaces ricos en energía; este alto costo implica que la gluconeogénesis es irreversible y por tanto la biosíntesis de glucosa (gluconeogénesis) y la degradación de glucosa (glicólisis) ocurren paralelamente y en forma coordinada. Esta vía es, tal como lo hemos señalado, una de las mejores ilustraciones de los principios organizativos de la biosíntesis y con la glucosa obtenida se puede sintetizar glicógeno o almidón (reacciones 14 y 15) en condiciones controladas por hormonas (insulina en el caso del glicógeno).

La vía está alimentada por:

- Intermediarios del ciclo Krebs puesto que cualquiera de ellas puede dar lugar al malato (ver figura 42) quien al salir de la mitocondria se oxida a oxalacetato (reacción 3) y genera PEP.
- Productos del catabolismo de ácidos grasos. Como veremos más adelante, los ácidos grasos son oxidados hasta acetil-CoA y en las plantas éste es transformado en PEP por medio del ciclo del glioxilato ilustrado en la figura 49.

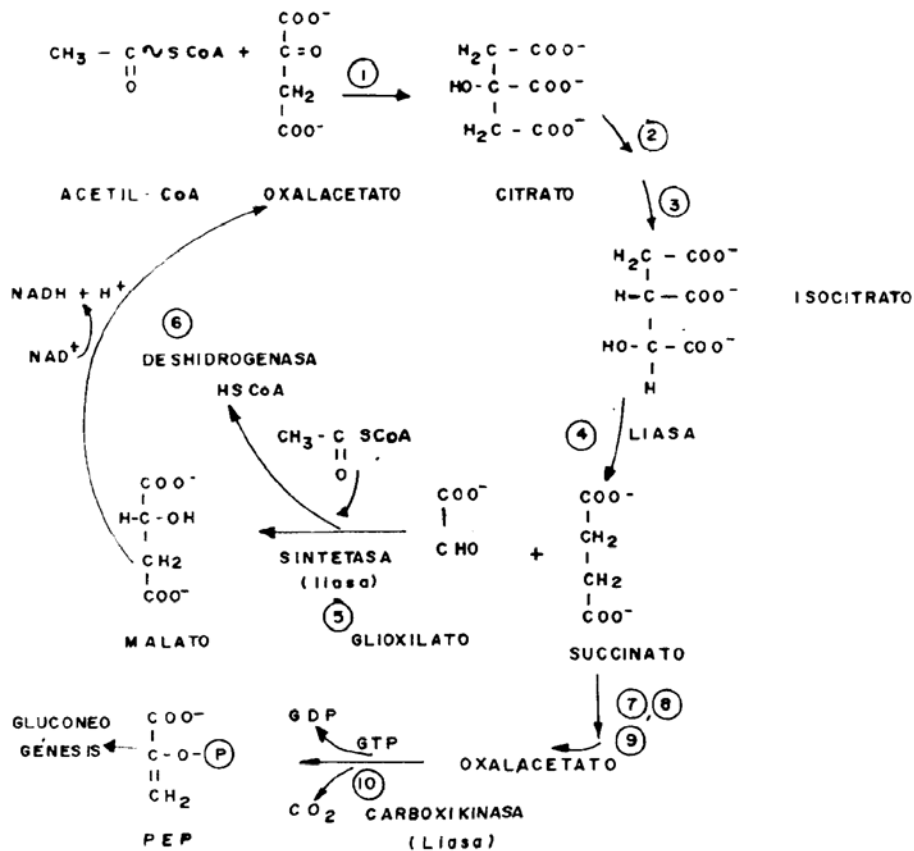


Figura 49: Esquema del ciclo del glioxilato

Este ciclo que ocurre en los glioxisomas en las plantas se realiza por algunas de las reacciones que ocurren en el ciclo de Krebs (1, 2, 3, 6, 7, 8 y 9) y adicionalmente con la intervención de una liasa (reacción 4) y una sintetasa (reacción 5). Como resultado neto dos moléculas de acetil-CoA sirven para sintetizar una de succinato que por las reacciones 7, 8 y 9 (iguales a las del ciclo de Krebs) forma oxalacetato que sirve como punto de partida para la gluconeogénesis (reacción 10).

- Esqueletos carbonados de aminoácidos. Los aminoácidos en su catabolismo producen intermediarios del ciclo Krebs y pueden así servir para sintetizar glucosa.
- Gracias a esta diversidad de fuentes carbonadas que pueden proporcionar precursores, la célula puede sintetizar glucosa fácilmente aunque a un alto costo. Veremos más adelante en este capítulo como puede utilizarse esta glucosa en la síntesis de diversos polisacáridos.

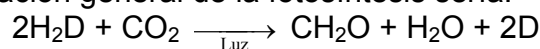
3 Fotosíntesis

Esta vía metabólica posee una singular importancia no sólo para aquellos organismos que son capaces de llevarla a cabo sino también para la realización de los ciclos del carbono y del oxígeno pues es el eslabón que permite en la biosfera la conservación de una atmósfera oxidante donde el O₂ está en amplia disponibilidad.

La fotosíntesis ocurre en una amplia gama de organismos tanto procariotes como eucariotes, tal como lo muestra la tabla 17. En ella indicamos además la fuente de electrones que usa cada organismo de estos para efectuar la reducción del CO₂ y sintetizar así la glucosa.

Esta tabla nos muestra que un buen número de procariotes realiza fotosíntesis usando como donadores de electrones compuestos diferentes al H₂O, por tal razón la fotosíntesis en estos organismos no libera O₂ sino S, compuestos orgánicos oxidados, etc.

Por esta razón la ecuación general de la fotosíntesis sería:



donde H₂D es el donador de e⁻ y D es su forma oxidada (O₂, S, piruvato, acetona, etc); esta situación implica además que en las plantas el O₂ liberado proviene del H₂O y no del CO₂, lo cual ha sido demostrado experimentalmente.

Organismo	Genero	Utilización del O ₂	Fuente de electrones	
P R O C A R I O T E	Algas verde azules	Cianobacteriaceae	Aerobios	H ₂ O
	Sulfobacterias verdes	Chlorobiaceae	Anaerobios estrictos	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ , S
	Bacterias verdes filamentosas	Chloroflexaceae	Aerobios	H ₂ S, compuestos orgánicos
	Sulfobacterias púrpura	Chromatiaceae	Anaerobios estrictos	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ , S
E U C A R I O T E	Bacterias púrpura	Rhodospirillaceae	Aerobios	Compuestos orgánicos (ej: isopropanol, lactato)
	Plantas superiores		Aerobios	H ₂ O
	Algas verdes, pardas, rojas		Aerobios	H ₂ O
	Plankton	Flagelados	Aerobios	H ₂ O
		Diatomáceas	Aerobios	H ₂ O
	Dinoflagelados	Aerobios	H ₂ O	

Tabla 17: Organismos fotosintéticos

La fotosíntesis se sucede en los cloroplastos, partículas subcelulares, más grandes que las mitocondrias (1 - 10 µm) que poseen una compleja estructura con varias clases de membranas. La membrana externa, muy frágil, rodea un sistema de membranas internas y de vesículas (o sacos) llamada tilacoides o discos tilacoides. Estos tilacoides se apilan unos sobre otros formando los grana y allí se encuentran los pigmentos fotosintéticos. Los discos tilacoides están conectados entre sí por filamentos membranosos llamados lamelas y todo está suspendido en un líquido denominado estroma (para una discusión más detallada de la estructura del cloroplasto consulte la lectura recomendada No. 1). La figura 50 muestra esquemáticamente la estructura de un cloroplasto.

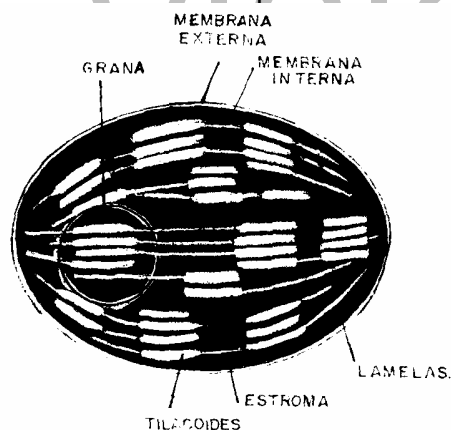


Figura 50: Esquema de un cloroplasto

En los cloroplastos se encuentran todas las sustancias necesarias para la fotosíntesis, que podemos clasificar en dos grupos:

- Componentes fotorreactivos.
- Componentes no fotorreactivos.

Los primeros son pigmentos que por su estructura química son capaces de absorber parte de la energía luminosa y pasar a un estado excitado o sea a un nivel superior de energía. Los más abundantes son las clorofilas, los carotenoides y las ficobilinas; estos últimos están presentes sólo en las algas rojas y verde-azules; los otros dos son de ocurrencia general. La estructura general de las clorofilas y de los carotenos se muestra en la figura 51.

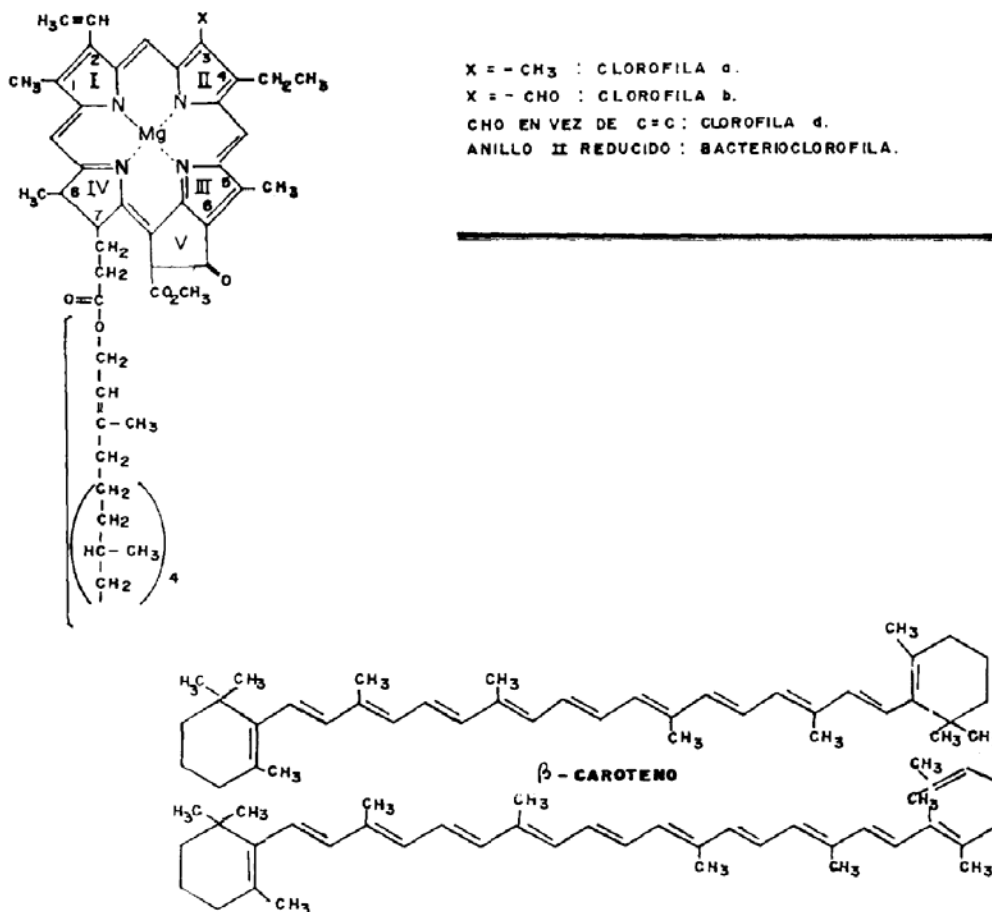


Figura 51: Estructura de clorofilas y carotenos

La máxima eficiencia conjunta en la absorción de la energía luminosa se presenta en las regiones 400 - 500 nm y 600 - 700 nm (o sea en el espectro visible) observándose que los carotenos actúan como receptores complementarios en la región del espectro no cubierta por las clorofilas. En los cloroplastos hay también pequeñas cantidades de pigmentos llamados fitocromos cuya absorción es máxima a 680 nm (P 680) o a 700 nm (P700). (Una discusión detallada del papel de las clorofilas la encuentra en el artículo de Rabinowitch).

Dentro de los componentes fotorreactivos encontramos una gran variedad de compuestos:

- Lípidos: Glicolípidos y fosfátidos.
- Proteínas: Citocromos (t, b₃, b₆); plastocianina (Cu⁺²), ferredoxinas, flavoproteínas.
- Enzimas.
- Quinonas Benzoquinonas (plastoquinona) y Naftoquinonas.
- Coenzimas NADP⁺, NAD⁺.

Los dos tipos de componentes poseen probablemente una organización espacial en los grana de tal manera que hay una considerable complejidad estructural y funcional que permite la ocurrencia de la fotosíntesis que podemos considerar que sucede en dos etapas: la etapa luminosa y la etapa oscura. Por razones de conveniencia discutiremos cada una de ellas por separado, sin olvidar que están íntimamente relacionadas y son interdependientes.

3.1 Etapa luminosa

Esta etapa ha sido estudiada por métodos espectroscópicos ya que ocurre muy rápidamente (10^{-15} a 10^{-13} segundos); en ella se captura un cuanto de luz propia por parte de los pigmentos fotorreactivos que pasan a un estado excitado; de esta forma la energía luminosa se transforma en energía química. Al excitarse, aumentan los potenciales de reducción de las moléculas y esto ocasiona una transferencia de electrones por varios transportadores hasta que finalmente los electrones son aceptados por el NADP⁺; asociadas a este transporte de electrones ocurren varias fosforilaciones (fotofosforilación) de manera análoga a lo que sucede en la fosforilación oxidativa.

En los organismos aerobios hay una fotólisis del H₂O, liberándose O₂ y electrones que son quienes van a ser transferidos por la cadena de transportadores.

En los anaerobios se oxida el donador de e⁻ produciéndose frecuentemente S (molecular) o H₂.

Con base en la evidencia experimental disponible, esta etapa luminosa en los aerobios se ha esquematizado como se indica en la figura 52.

Se considera que en los cloroplastos de estos organismos hay dos centros fotorreactivos: fotosistemas I y II (FSI y FSII) constituidos por clorofila a, carotenos y P700 y por clorofilas a y b, ficobilinas y P680 respectivamente. Tal como lo indica la figura 52 en el FSII ocurre la fotólisis del H₂O y al recibir el cuanto de luz (hv) su valor de E^o se hace más negativo (estado Z) y los electrones provenientes del H₂O son transferidos por reacciones de óxido-reducción a través de la

plastoquinona, cito-cromo b, citocromo f y plastocianina hasta el FSI en su estado fundamental; al ceder los electrones el FS II retorna a su estado fundamental y queda listo para una nueva excitación.

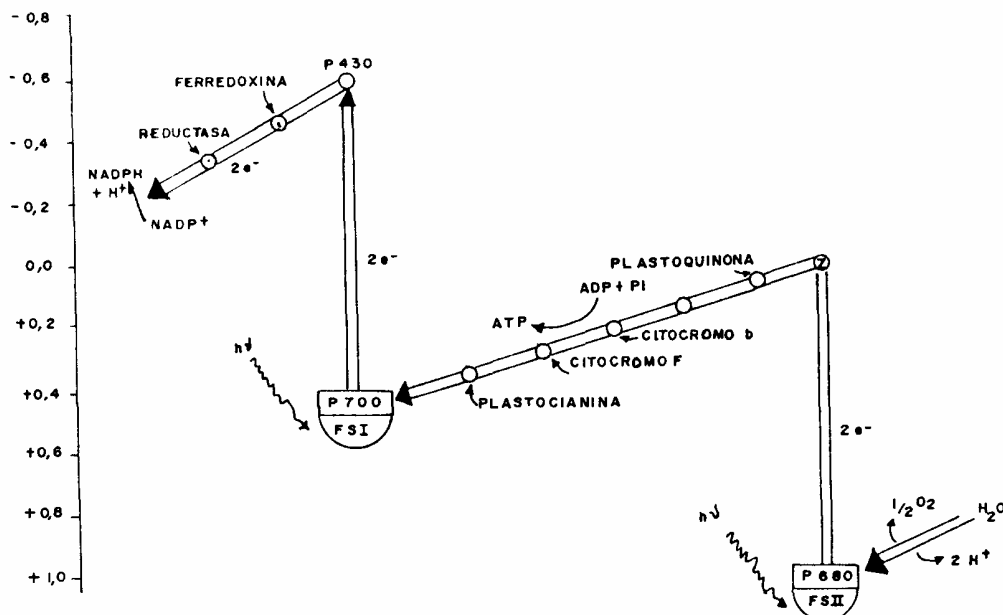


Figura 52: Etapa luminosa de la fotosíntesis

Si observamos con cuidado el esquema vemos que la transferencia de electrones desde Z hasta el FSI se hace de un E° más negativo (0,0) a uno más positivo (+0,6); la diferencia de potencial resultante (aproximadamente 0,5 volts) se aprovecha para sintetizar ATP por un mecanismo similar al ya discutido en la fosforilación oxidativa (para una discusión en detalle consulte la lectura recomendada No.2) que requiere un mínimo de 0,22 volts para sintetizar un ATP.

El fotosistema I que ha recibido los electrones, captura la energía luminosa y pasa a su estado excitado (P430) con un salto en su E°; los electrones son transportados ahora a través de una ferredoxina y una reductasa para ser finalmente aceptados por el NADP⁺ que se reduce a NADPH + H⁺. La cesión de los electrones hace que P430 retorne a su estado fundamental.

Como resultado global de esta etapa luminosa podemos decir que a partir del H₂O se produce O₂ y que por cada par de electrones transferidos se fosforila el ADP (dos moléculas posiblemente) hasta ATP y se reduce el NADP⁺ hasta NADPH + H⁺. La lectura recomendada No. 3 le dará un panorama de esta etapa luminosa.

Es interesante anotar cómo en esta etapa se pueden ilustrar varios de los principios que rigen el metabolismo ya que la oxidación de una sustancia (el H₂O) está aparejada con la producción de ATP y la transferencia de electrones se hace

en el sentido creciente de los potenciales de reducción (de más negativo a más positivo) tal y como ocurre en la fosforilación oxidativa.

Además de proveer el ATP y el NADPH + H⁺ necesarios para la siguiente etapa, la etapa luminosa es una excelente ilustración de un mecanismo biológico que permite transformar energía luminosa en energía química; es por ello y por las potenciales aplicaciones que de aquí se puedan derivar, que ha sido objeto de numerosos estudios que continúan hoy en día.

3.2 Etapa oscura

La elucidación de esta etapa fue posible, en buena parte gracias a los trabajos del grupo de Calvin quien recibió por ello el Nóbel en 1961. Usando ¹⁴C y métodos cromatográficos se estableció que la reducción del CO₂ hasta glucosa ocurre en un breve periodo (10⁻⁴ - 1s) utilizando el ATP y el NADPH + H⁺ generados en la etapa luminosa. Una descripción muy interesante de estos trabajos la encuentra en la lectura recomendada No. 4. Dado que esta etapa de la fotosíntesis es cíclica, se conoce también con el nombre de ciclo de Calvin. La figura 53 nos muestra las reacciones que se suceden.

Para facilitar la comprensión de esta etapa y su balance de C, se considera la intervención de 6CO₂ que por acción de una carboxilasa (liasa), bastante abundante en los cloroplastos, efectúa la carboxilación de la ribulosa-1,5-Di-P (una pentosa) para dar 3-P-Glicerato (3-P-Gato) como producto final de esta reacción (1); es probable que la pentosa (C₅) al recibir el CO₂ origine un C₆ que es inestable y se rompe en 2 moléculas (por pentosa + CO₂) de 3-P-Glicerato. Ya que consideramos 6CO₂ iniciales, se obtienen 12 de 3-P-Gato; este ácido es reducido (reacción 2) por una deshidrogenasa que usa NADPH + H⁺ como coenzimas hasta 12 moléculas de 3-P-Gliceraldehído; la reducción requiere energía que en este caso es provista por el ATP. De las doce moléculas de 3-P-Gal dejemos seis en reserva y consideremos las seis restantes.

Las próximas reacciones (3, 4, 5, 6 y 7) se encaminan a la síntesis de la glucosa y son iguales a algunas de la que ocurren en la gluconeogénesis (ver figura 48 reacciones 9, 10, 11, 12 y 13).

De las seis moléculas de 3-P-Gal, tres son convertidas a 3-P-DHA y por condensación de estas triosas se producen tres moléculas de Frc-1, 6-Di P (reacción 4) que por medio de una fosfatasa se transforman en tres de Frc-6-P (reacción 5); isomerizándose luego una de ellas hasta Glc-6-P (reacción 6); esta hexosa pierde su grupo fosfato por acción de una fosfatasa, convirtiéndose en Glucosa (reacción 7), que ahora sirve como punto de partida para la biosíntesis de varios polisacáridos.

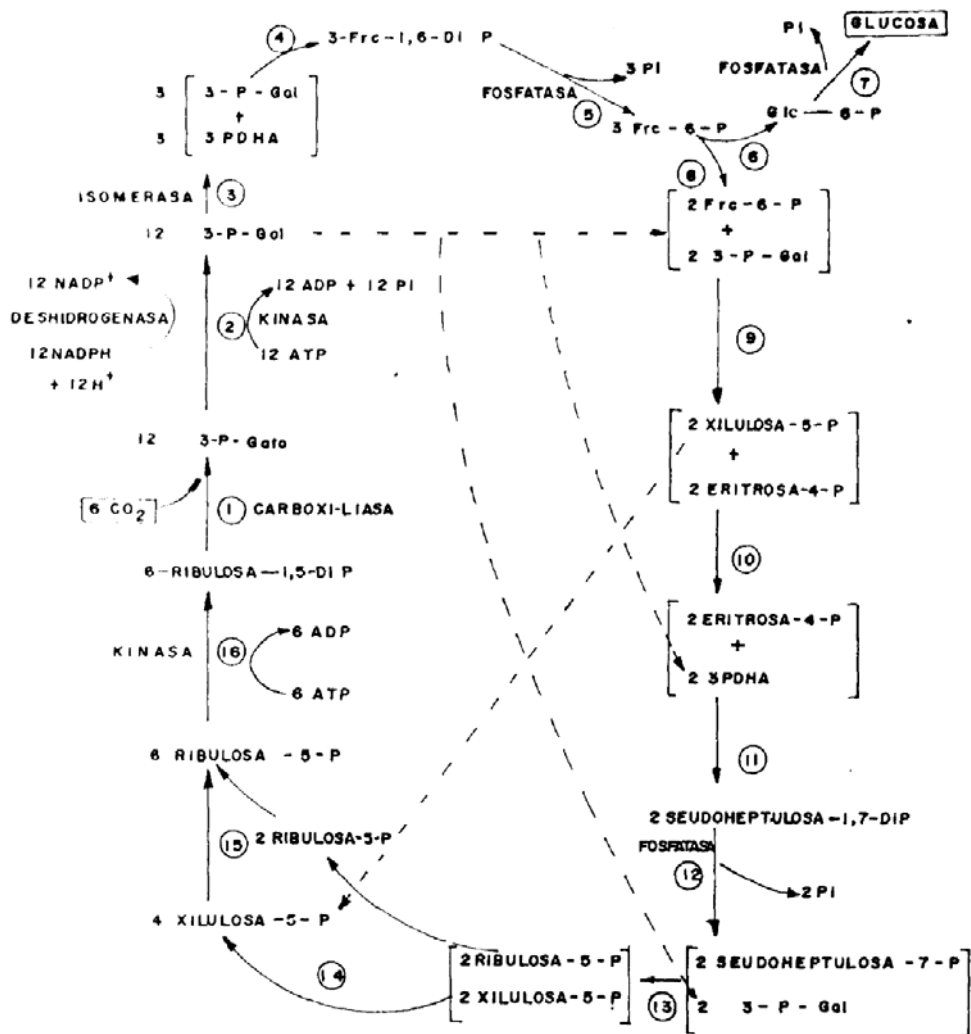


Figura 53: Esquema de la etapa oscura de la fotosíntesis

Las reacciones restantes tienen como objetivo final regenerar las seis moléculas de Ribulosa 1, 5-Di P gastadas en la reacción 1 y para ello se utilizan las dos moléculas de Frc-6-P restante y las seis de 3-P-Gal dejadas en reserva; las reacciones que ocurren en esta porción del ciclo son inversas a las de la parte de la vía de las pentosas fosfato (figura 47 reacciones 5 a 9).

Las dos moléculas de Frc-6-P se combinan con dos de 3-P-Gal (quedando cuatro en reserva) para dar en la reacción (9), dos moléculas Xilulosa-5-P y dos de Eritrosa-4-P ($2C_6 + 2C_3 \rightarrow 2C_5 + 2C_4$); las dos Xilulosas-5-P las dejamos en reserva y las dos Eritrosa-4-P se unen con dos de PDHA (que son equivalentes a dos de 3-P-Gal de las cuatro que había en reserva) para dar en la reacción (11),

dos moléculas de Seudoheptulosa -1,7-DiP ($2C_4 + 2C_3 \rightarrow 2C_7$). Estas reacciones son catalizadas por distintas transferasas.

La heptosadifosfato pierde un grupo fosfato por medio de una fosfatasa (reacción 12) y se obtienen dos moléculas de Seudoheptulosa-7-P que se condensan con las dos últimas moléculas de 3-P-Gal de la reserva para dar (reacción 13), dos de Ribulosa-5-P y 2 de Xilulosa-5-P ($2C_7 + 2C_3 \rightarrow 4C_5$); estas últimas, sumadas con las dos de Xil-5-P que teníamos en reserva, se isomerizan (reacción 15) a 4 de Ribulosa-5-P y en consecuencia tendremos seis de Ribulosa-5-P. Esta pentosa sufre una fosforilación catalizada por una Kinasa (reacción 16) y se producen seis moléculas de Ribulosa -1,5 -Di P.

De esta manera se regenera la pentosa gastada en la fijación del CO_2 y se cierra el ciclo. El funcionamiento del ciclo, o sea de la etapa oscura, sólo requiere del aporte externo de CO_2 , $NADPH + H^+$ y ATP y cantidades relativamente pequeñas de los intermediarios (triosas, tetrasas, pentosas, hexosas y heptosas) son suficientes para mantenerlo en operación, a condición de que no se utilicen en otras vías. Dado que el primer metabolito que aparece en la fijación del CO_2 es un compuesto con 3C, esta fotosíntesis se conoce actualmente como de tipo C_3 .

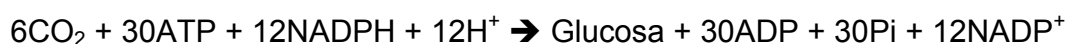
Si realizamos un balance de esta etapa observamos que la reacción neta, descontando los intermediarios cíclicos, será:



es decir hay un apreciable consumo de ATP y de $NADPH + H^+$ para poder reducir el CO_2 , estas moléculas provienen de la etapa luminosa que las producen por la fotólisis del H_2O (con el transporte asociado de los electrones resultantes) y la fotofosforilación.

Aunque esta etapa parece muy complicada desde el punto de vista de las reacciones que ocurren, su comprensión se facilita considerablemente si se conocen bien las reacciones de la gluconeogénesis y de las pentosas fosfato.

Recientemente se ha descubierto que existe un grupo de plantas gramíneas como maíz, caña de azúcar, sorgo etc., y otras en las cuales el primer producto de la fijación del CO_2 (reacción 1) son ácidos dicarboxílicos con 4 carbonos (malato, oxalacetato); en ellas hay algunas reacciones cíclicas previas a las del ciclo de Calvin y el resultado neto es que el balance de la etapa oscura será:



En consecuencia este tipo de fotosíntesis, llamado C_4 , consume más energía pero está compensado porque presenta menor fotorrespiración y por tanto es más

eficiente fotosintéticamente. El artículo de Hatch¹ le dará detalles sobre este tipo de fotosíntesis

4 Biosíntesis de polisacáridos

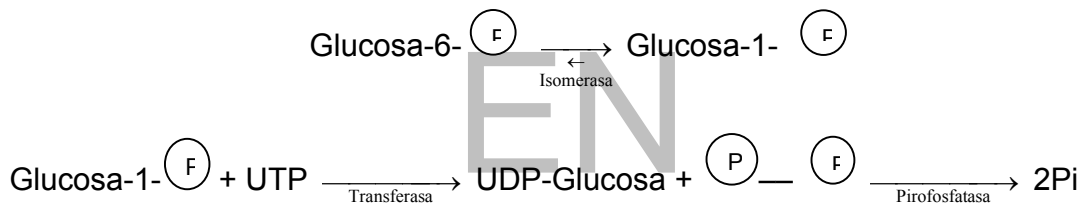
El grupo de Leloir en Argentina ha establecido que los polisacáridos animales y vegetales se sintetizan empleando como precursores compuestos del tipo monosacárido-nucleótido que actúan como donadores del monómero.

Dependiendo del polisacárido que se vaya a sintetizar se usan los compuestos indicados en la tabla 18:

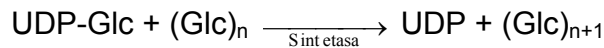
Carbohidrato	Nucleótido - Azúcar
Glicógeno	UDP-glucosa
Almidón	ADP-glucosa
Celulosa	ADP-glucosa, CDP-glucosa, GDP-glucosa

Tabla 18: Precursores usados en la biosíntesis de polisacáridos

Estos precursores provienen de la Glucosa-6-P producida en la fotosíntesis que es transformada en UDP-Glc por la secuencia de reacciones:



En la síntesis del glicógeno (hígado, músculos), la UDP-glucosa es el donador de Glc que es transferido sobre un extremo no reductor de una molécula de glicógeno ((Glc)_n) y éste se alarga en una unidad de glucosa:



Esta reacción forma los enlaces α -1,4 del glicógeno pero la sintetasa del glicógeno no puede formar los enlaces α-1,6; para ello interviene una enzima ramificante que cataliza la transferencia de un fragmento (6-7 glucosas) del extremo no reductor, sobre el OH - 6' de una glucosa interna, creando así el enlace α -1,6.

Cuando se requiere un nucleótido como ADP-glucosa la síntesis es análoga a la de UDP-glucosa por la reacción:



La celulosa y el almidón se sintetizan de manera análoga haciendo uso de una sintetasa o del conjunto sintetasa + enzima ramificante según se trate de formar amilosa o amilopectina en el caso del almidón.

Actividad 7

1. Escriba las reacciones para el paso de piruvato a PEP en la gluconeogénesis; compare su costo energético con el de la reacción inversa. Un examen de la figura 48 le será muy útil.
2. Indique la secuencia de reacciones (incluyendo o no las fórmulas) por las cuales se realiza la gluconeogénesis.
3. Seleccione de la lista siguiente los metabolitos que pueden alimentar la gluconeogénesis. Indique de dónde pueden provenir.
 - Malato
 - Malonato.
 - Etanol
 - Lactato.
 - Acetil- CoA.
 - Succinil-CoA.
 - Ribosa-5-P.
 - Acido glutámico.
 - FADH₂
 - Coenzima A.

Considere cuáles de ellos pertenecen a los grupos citados en las páginas 198 y 199.

4. Identifique en los compuestos siguientes, cuáles son donadores de electrones en la etapa luminosa de la fotosíntesis.

Especifique en cada caso el tipo de organismo (anaerobio o aerobio) que lo utiliza:

- S.
- HCO₃⁻
- O₂.
- H₂O.
- Isopropanol.
- CO₂
- Lactato
- H₂S.

Luego de tratar de resolver este punto, consulte la tabla 17.

5. Seleccione entre los siguientes compuestos, aquellos que actúan en la etapa luminosa de la fotosíntesis; explique brevemente el papel de cada uno.
 - NADP⁺.
 - FAD.
 - O₂.
 - Clorofilas
 - Ribulosa-1,5-di P.
 - Citocromos.
 - Carotenoides.
 - Fitocromos.

6. Calcule cuánta energía se necesitaría para producir por fotosíntesis C₃, 3,8m moles de Glucosa. ¿Cuál sería la diferencia si se produce la misma cantidad de glucosa por fotosíntesis C₄?

ΔG° ATP= -7.300 cal /mol
PM Glucosa 180 g/mol-g

Revise las ecuaciones globales para fotosíntesis C₃ y C₄.

Autoevaluación No. 14

1. Explique los principios generales que rigen las vías biosintéticas.
2. Cite dos reacciones (sin fórmulas) que sirvan para ilustrar los principios organizativos de la biosíntesis.
3. Describa como tiene lugar la gluconeogénesis, indicando cuáles son los pasos diferentes a los que ocurren en la glicólisis.
4. Establezca las analogías existentes entre la fosforilación oxidativa y la etapa luminosa de la fotosíntesis.
5. Explique brevemente qué sucede en las diferentes etapas de la fotosíntesis.
6. Establezca las diferencias existentes entre la fotosíntesis de tipo C₃ y la de tipo C₄.
7. Compare las vías degradativas de la glucosa con sus vías biosintéticas respecto a:
 - Localización celular.
 - Productos iniciales de cada una.
 - Productos finales de cada una.
 - Metabolitos usados como conectores con otras vías.

- Balance de coenzimas.
- Balance de ATP.

Lecturas recomendadas

Usted puede ampliar aspectos de los temas tratados consultando las siguientes referencias:

1. The photosynthetic membrane / Kenneth R. Miller.- - Scientific American. - - Vol 241.1979.- p100.
2. How cells make ATP / Peter C. Hinkle, Richard, E. McCarty.- - Scientific American-Vol 238, 1978.- - p104.
3. The absorption of light in photosynthesis/ Rajni Govindjee Govindjee. - - Scientific American.- Vol 231, 1974.- - p68.
4. The path of carbon in photosynthesis / James A Bassham. - - Scientific American. - Vol 206, 1962.- - p88.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

CAPITULO 3: METABOLISMO DE LIPIDOS

Objetivos

- Ilustrar cómo se realiza la degradación de los triglicéridos, fosfoglicéridos y esteroides.
- Explicar las vías biosintéticas generales de las diferentes clases de lípidos.
- Identificar en cada una de las vías metabólicas su localización celular, metabolitos iniciales, metabolitos intermedios comunes a otras vías, metabolitos finales y las coenzimas que intervienen.
- Establecer los balances de compuestos carbonados, coenzimas y ATP, cuando sea el caso, producidos en el catabolismo y anabolismo de los diferentes tipos de lípidos estudiados.
- Comparar la biosíntesis con la degradación de los ácidos grasos.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 15

1. ¿Cómo se clasifican los lípidos? Ilustre con un ejemplo cada uno de los tipos.
2. ¿Cuáles fuentes carbonadas alimentan el ciclo de Krebs?
3. ¿Qué son las reacciones anapleróticas?
4. ¿Cuáles son los productos de hidrólisis ácida y básica de los triglicéridos?
5. Mencione dos ejemplos de:
 - a. Ácidos grasos saturados.
 - b. Ácidos grasos mono insaturados.
 - c. Ácidos grasos poli insaturados.
6. ¿Cuáles son las principales funciones de la vía de pentosas fosfato?

MATERIAL
EN
REVISIÓN

1 Catabolismo de lípidos

El estudio del metabolismo de los lípidos ha recibido mayor atención en los organismos animales y es por ello que la información disponible en este campo para procariotes y para vegetales es considerablemente menor. En la célula en general los triglicéridos son considerados como material de reserva energética mientras que los fosfolípidos y los esfingolípidos son constituyentes importantes de las membranas.

En los animales superiores los triglicéridos son los componentes lipídicos más abundantes, alrededor de un 65% es tejido adiposo donde se realiza un activo metabolismo tanto de tipo degradativo (glicólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa), como de tipo biosintético. En este tejido, se almacenan en forma de triglicéridos, los ácidos grasos transportados en su forma libre por la albúmina sérica (proteína muy abundante en la sangre) o por los quilomicrones como triglicéridos.

Debido a su alto contenido en energía (del orden de 9 kcal /g), a la ausencia de agua, al menor volumen ocupado y a su disponibilidad, los triglicéridos son la forma más eficiente en que la célula acumula reservas de energía. En un triglicérido, alrededor del 95% de la energía biológicamente aprovechable, proviene de las cadenas carbonadas del ácido graso y sólo un 5% corresponde al glicerol.

En órganos tales como el corazón, hígado y en el músculo esquelético, los triglicéridos proveen cerca de la mitad de las necesidades energéticas. En ciertos animales, particularmente aves migratorias y animales con periodos de hibernación, estos lípidos son la fuente casi única de energía. Dependiendo del tejido donde se encuentren los lípidos, su vida media es diferente. En el tejido adiposo por ejemplo, su vida media es de 15-20 días, en el cerebro es de 10-15 días y en el hígado es de 1-2 días. Algunos lípidos como los fosfoglicéridos perduran en promedio desde 200 días (en el cerebro) hasta solo 1 o 2 días (en el hígado).

En general los lípidos son hidrolizados biológicamente gracias a una gran variedad de lipasas que se encuentran en el intestino delgado, en la superficie de los adipocitos y en los lisosomas. Para cada tipo de lípido (ver la clasificación de los lípidos en el módulo de Química Orgánica1), tenemos un grupo de lipasas muy específicas respecto al enlace que atacan. La carencia de alguna de estas enzimas, (en ocasiones debido a defectos genéticos), ocasiona enfermedades mortales cuyas causas han sido bien establecidas especialmente en la degradación de los esfingolípidos.

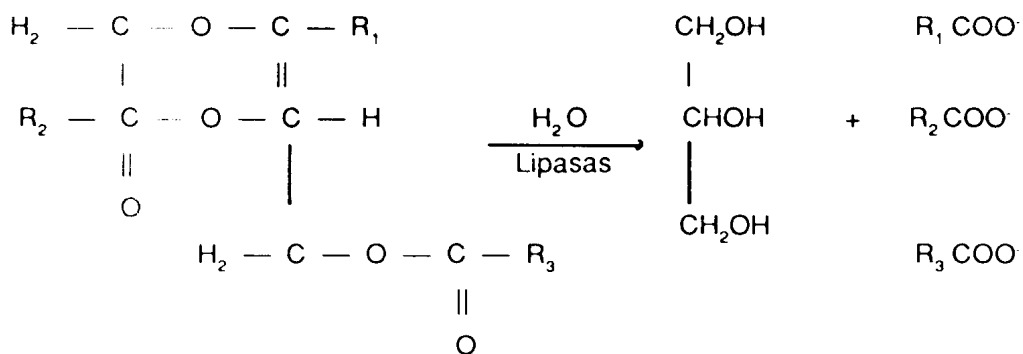
1.1 Catabolismo de triglicéridos

Por las razones expuestas anteriormente, se centrará este estudio en la degradación de los triglicéridos. Se examinará su hidrólisis por las lipasas, la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria y su oxidación completa hasta CO_2 y H_2O . Así mismo, los rendimientos en ATP y las variantes existentes para los ácidos grasos insaturados servirán para comparar las rutas catabólicas más importantes y generales.

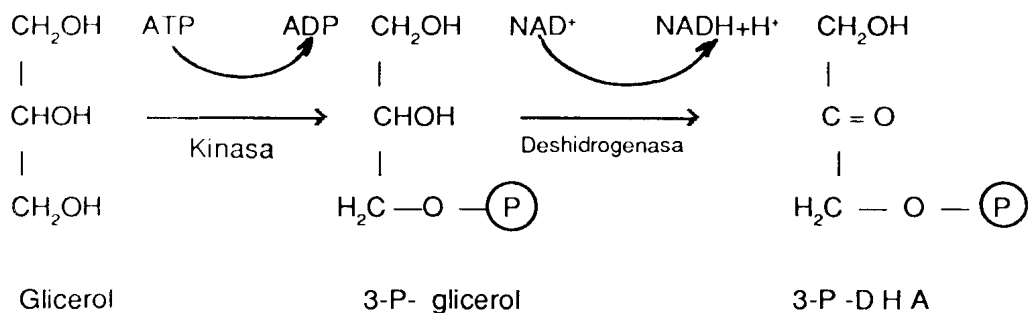
Desde comienzos de siglo XX y gracias a los trabajos pioneros de Knoop, se ha ido acumulando una enorme cantidad de evidencia química (lectura recomendada #1), que aunada a los trabajos posteriores con los sistemas enzimáticos, han permitido disponer de una visión detallada del proceso, que se describe enseguida.

➤ Hidrólisis y entrada de ácidos grasos a la mitocondria

Los triglicéridos (grasas y aceites) ingeridos en la alimentación, son hidrolizados por las lipasas intestinales hasta glicerol y ácidos grasos libres según la siguiente reacción:



El glicerol es absorbido como tal y rápidamente sufre las siguientes transformaciones:

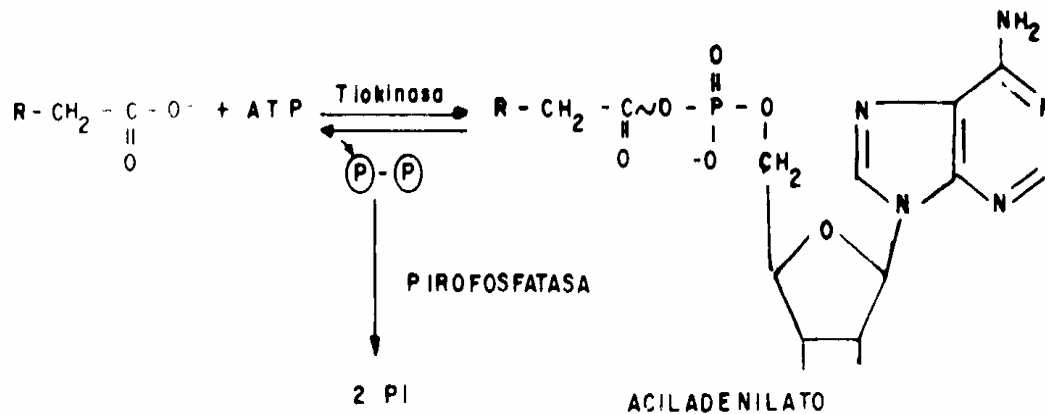


La 3-fosfo dihidroxiacetona (3 P DHA) formada, entra a la vía glicolítica y se oxida finalmente hasta piruvato que luego pasa a Acetil -CoA.

Los ácidos grasos por su parte, se unen a los ácidos biliares y pueden ser transportados como tales por la albúmina sérica, absorbidos, o nuevamente esterificados para formar triacil glicéridos en los quilomicrones. En este caso, al llegar a la célula las lipasas los hidrolizan hasta ácidos grasos y de esta forma llegan al citoplasma.

Debido a que los ácidos grasos no pueden atravesar la membrana mitocondrial, sufren una activación y transferencias sobre diversos compuestos, para finalizar como complejos acil-carnitina.

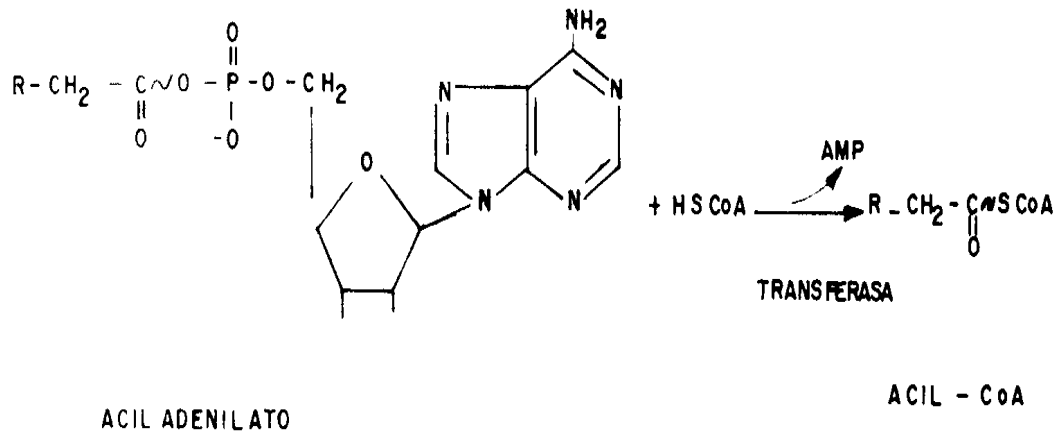
Esta activación se realiza por medio de una tiokinasa y ATP según esta reacción:



Esta transferasa está situada en la membrana externa de las mitocondrias y la reacción es fácilmente reversible pues su $\Delta G^\circ = -0,2 \text{ kcal/mol}$ y solo la acción de la pirofosfatasa hace que el equilibrio se desplace hacia la activación del ácido graso. El ΔG° global es $= -7,1 \text{ kcal/mol}$.

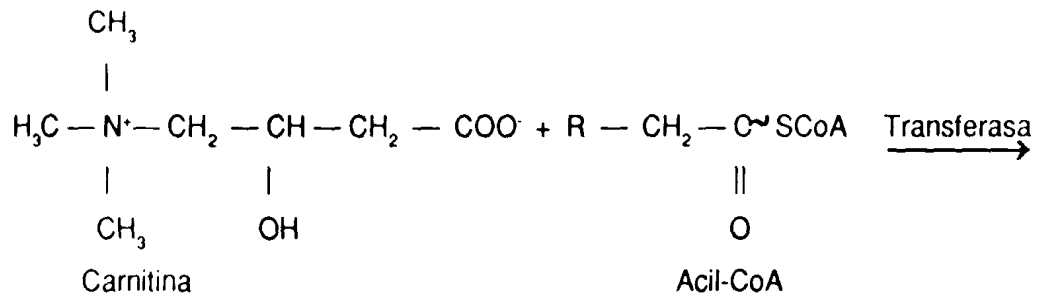
Los aciladenilatos así formados son transferidos sobre HSCoA por medio de transferasas que varían de acuerdo con la longitud de la cadena del ácido graso (grupo R, ver referencia específica # 1).

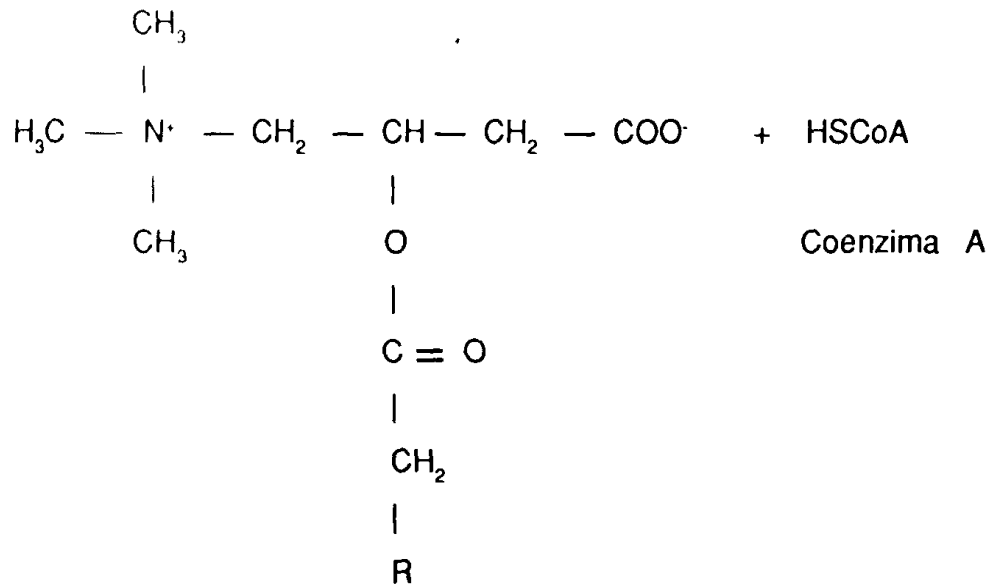
Esta reacción general es:



MATERIAL

Estos acil-CoA tampoco pueden atravesar la membrana mitocondrial y para ello deben ser transformados en un derivado acilcarnitina por medio de una transferasa localizada en la membrana externa. ■

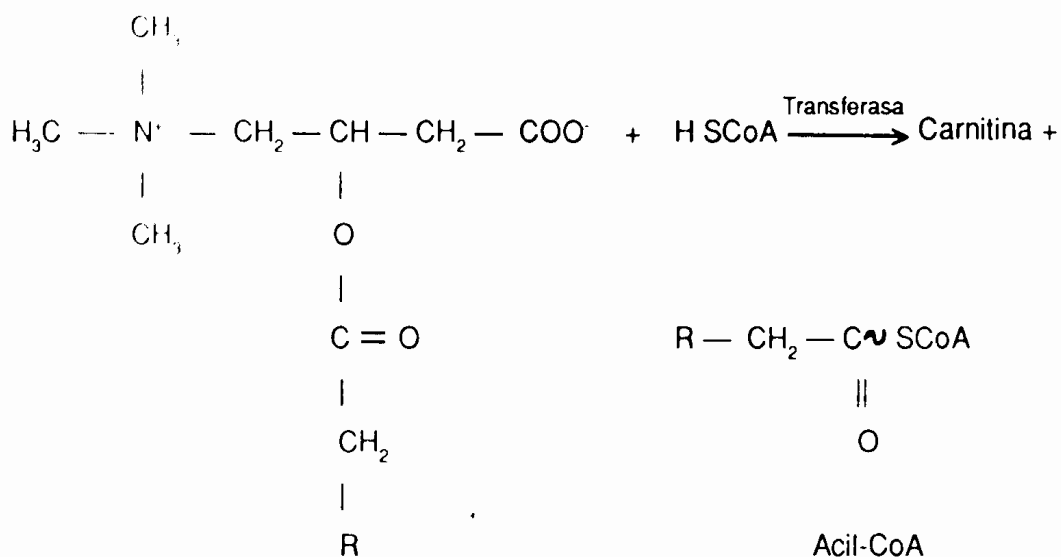




Acil carnitina

El proceso de entrada está regulado por la acción de esta transferasa. Posiblemente la naturaleza anfipática de la acilcarnitina permite su paso a través de la membrana de la mitocondria y una vez en su interior, el ácido graso forma nuevamente acil -CoA por medio de otra transferasa situada en la membrana interna.

Gracias a esta secuencia de reacciones, los diferentes ácidos grasos llegan al interior de la mitocondria donde sufrirán un proceso degradativo conocido como β -oxidación.



➤ **β-oxidación de ácidos grasos pares y saturados.**

La oxidación de los ácidos grasos se realiza en dos etapas.

En la primera, el carbono 3 (carbono beta) es oxidado y se eliminan 2 átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada del ácido, formándose Acetil-CoA.

En la segunda etapa, el Acetil-CoA es oxidado hasta CO₂ y H₂O a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Considere en primer término, cómo ocurre la β-oxidación de los ácidos grasos saturados y con un número par de átomos de carbono. Como ejemplo se empleará el ácido palmítico (C₁₆) que al haber sido transportado al interior de la mitocondria está en forma de palmitoil-CoA. La figura 54 esquematiza la primera vuelta en la β-oxidación.

El acil-CoA (en este caso palmitoil-CoA), es oxidado en una primera reacción por una FAD-deshidrogenasa que remueve específicamente hidrógeno de los carbonos 2 y 3 (α y β), dando lugar a un doble enlace trans (Δ 2,3). Dependiendo de la longitud de la cadena, actúan diferentes deshidrogenasas en forma específica. En la segunda reacción, una hidratasa adiciona una molécula de H₂O sobre el doble enlace. Dado que este enlace es trans, se produce un β-hidroxiacil-CoA de configuración L (note que el carbono 3 es asimétrico), lo cual es fundamental para que continúe el proceso. Si el doble enlace fuese de tipo cis, la hidratación produciría un D-β-hidroxiacil-CoA.

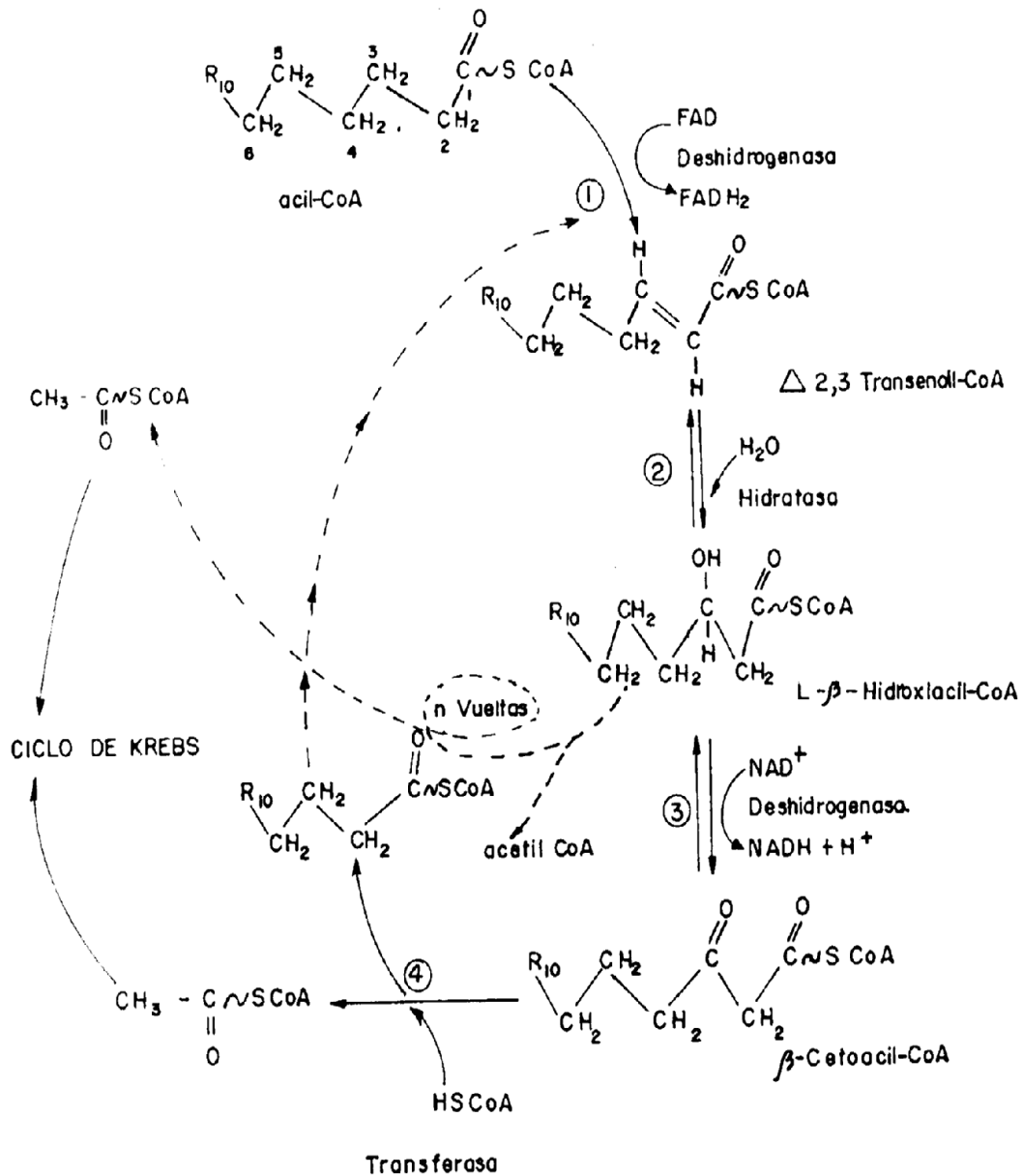


Figura 54: Esquema de la β -oxidación de ácidos grasos saturados

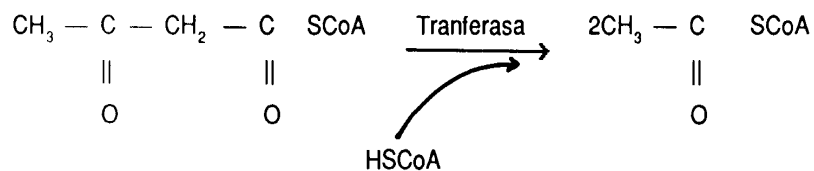
La deshidrogenasa que actúa a continuación (reacción 3), es estereo específica y requiere que el β -hidroxiacil-CoA tenga la configuración L.

La acción de esta enzima, origina que el grupo OH se oxide hasta quedar un grupo C=O, apareciendo un β -cetoacil-CoA (β -cetopalmitoil-CoA en este ejemplo) y $NADH + H^+$.

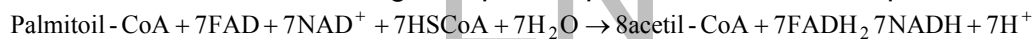
En la cuarta y última reacción de esta primera etapa, actúa una transferasa (Tiolasa), la cual al introducir una nueva molécula de $HSCoA$ libre sobre el

compuesto β -cetoacil-CoA, ocasiona una ruptura del enlace entre los carbonos α y β , produciéndose un acil-CoA con 2 átomos menos de carbono y otra molécula de Acetil-CoA; este último entra al ciclo de Krebs directamente (ya que se encuentra al interior de la mitocondria) y se oxida completamente hasta 2 CO_2 y H_2O .

El nuevo acil-CoA tendrá ahora 14 carbonos y entra en una segunda vuelta de β -oxidación (línea punteada) y luego de sufrir las 4 reacciones enzimáticas, se transforma en una nueva molécula de Acetil-CoA y un acil-CoA con 12 carbonos (C_{12}). Cada acil-CoA entra a una vuelta adicional de β -oxidación y después de un número de vueltas (n) que depende de la longitud inicial del ácido graso se obtiene luego de la reacción 3 (repetida n veces) el compuesto aceto-acetil-CoA (C_4), que por la reacción 4 se transforma en 2 moléculas de Acetil-CoA, de la siguiente manera:



En el caso del ácido palmítico (C_{16}) se requieren 7 vueltas para llegar a esta situación, dado que en general se requieren $(n/z) - 1$ vueltas, si n es el número de carbonos iniciales. La ecuación global para la β -oxidación del ácido palmítico será:



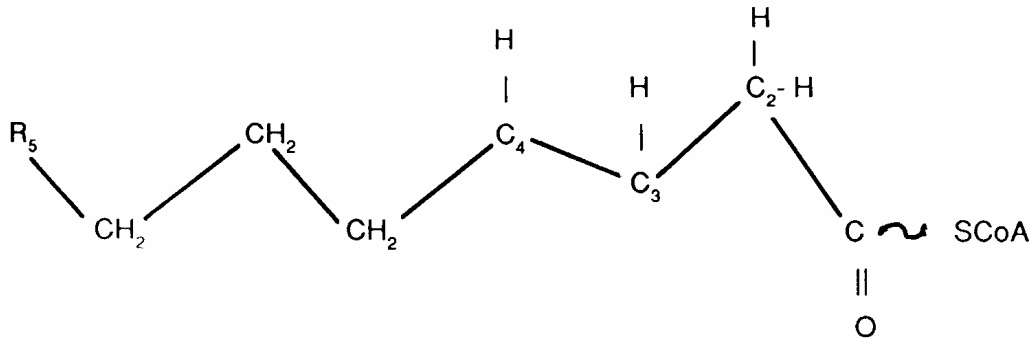
Las 8 moléculas de acetil-CoA son oxidadas totalmente hasta CO_2 y H_2O produciendo una cantidad considerable de ATP en la fosforilación oxidativa (considerar conjuntamente las figuras 42 y 44 del capítulo 6. Catabolismo de carbohidratos).

Por su parte, las coenzimas reducidas (FADH_2 y $\text{NADH} + \text{H}^+$) cuando son reoxidadas en la fosforilación oxidativa, generan también ATP. El balance de C y energía se mostrará más adelante.

➤ β -oxidación de ácidos grasos pares Insaturados

En la β -oxidación de los ácidos grasos de este tipo intervienen algunas enzimas adicionales que permiten resolver los problemas planteados por la pre-existencia de los dobles enlaces que por razones de biosíntesis son de tipo cis. Se considerarán los dos casos a los cuales se puede reducir el problema.

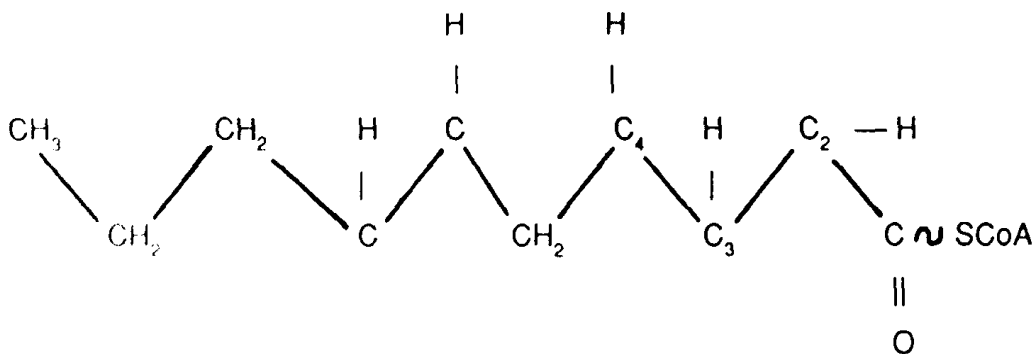
En el primer caso, se toma por ejemplo el ácido oleico (C_{18}), en el cual existe un doble enlace cis entre C_9 - C_{10} y luego de 3 vueltas de β -oxidación, con producción de 3 Acetil-CoA, 3 $FADH_2$ y 3 $NADH + 3H^+$, se llega al acil-CoA siguiente:



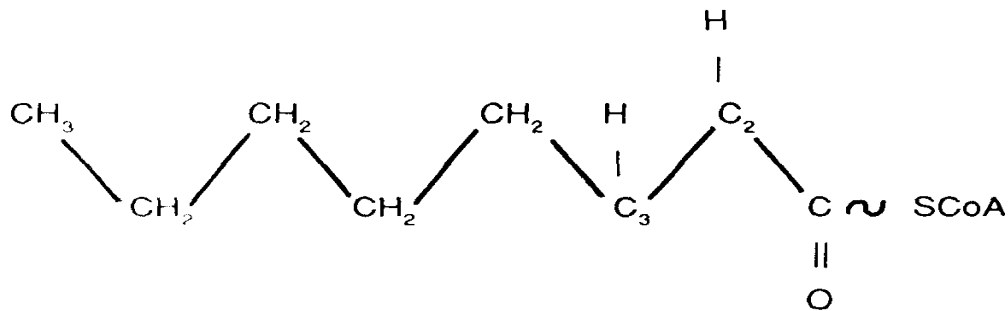
Donde existe un $\Delta^3, 4$ -cis-enoil-CoA que corresponde al $\Delta^9, 10$ -cis original del ácido oleico.

Dado que ya existe la insaturación, no actúa la FAD-deshidrogenasa (reacción 1 figura 54) y no se produce $FADH_2$, interviene una isomerasa que pasa el doble enlace de 3,4 cis- a 2,3 trans- y la vía continúa sin ningún cambio adicional. La diferencia en el balance global será un $FADH_2$ menos que en la β -oxidación del ácido esteárico (C_{18} saturado).

En el segundo caso, están los ácidos grasos poliinsaturados. Se analizará lo que sucede con el linoleico ($\Delta^9, 10, 12, 13$ -cis). Luego de 3 vueltas hay una situación análoga a la del oleico ya que el acil-CoA resultante sería:



Al iniciar la cuarta vuelta, actúa una isomerasa que pasa el doble enlace de 3,4-cis- a 2,3-trans- para luego realizar las reacciones posteriores de la vuelta sin producción de $FADH_2$. Al terminar la quinta vuelta tenemos el siguiente acil-CoA:



En el cual existe un $\Delta 2,3$ -cis- por lo cual no actúa la FAD-deshidrogenasa y al ser hidratado (reacción 2 figura 54), produce el D- β -hidroxiacil-CoA; puesto que la NAD-deshidrogenasa es absolutamente específica para L- β - hidroxiacil-CoA. Esta enzima no actuara, paralizándose la β -oxidación.

El problema se resuelve con la intervención de una enzima isómera (epimerasa) que transforma el D- β - hidroxiacil-CoA en L- β -hidroxiacil-CoA y la degradación continúa.

Los ácidos grasos poliinsaturados restantes (linolénico y araquidónico, entre otros) son degradados de manera similar recurriendo a estas isomerasas.

➤ **β -oxidación de ácidos grasos de cadena impar o ramificada**

Los ácidos grasos de cadena impar o ramificada son poco frecuentes en la naturaleza y más bien aparecen como productos de la degradación de algunos compuestos (ejemplo: Val, Ile). Estos ácidos son degradados de la manera usual hasta que se llega a la ramificación o al radical propionil.

La secuencia de las reacciones que suceden de ahí en adelante se muestra en la figura 55.

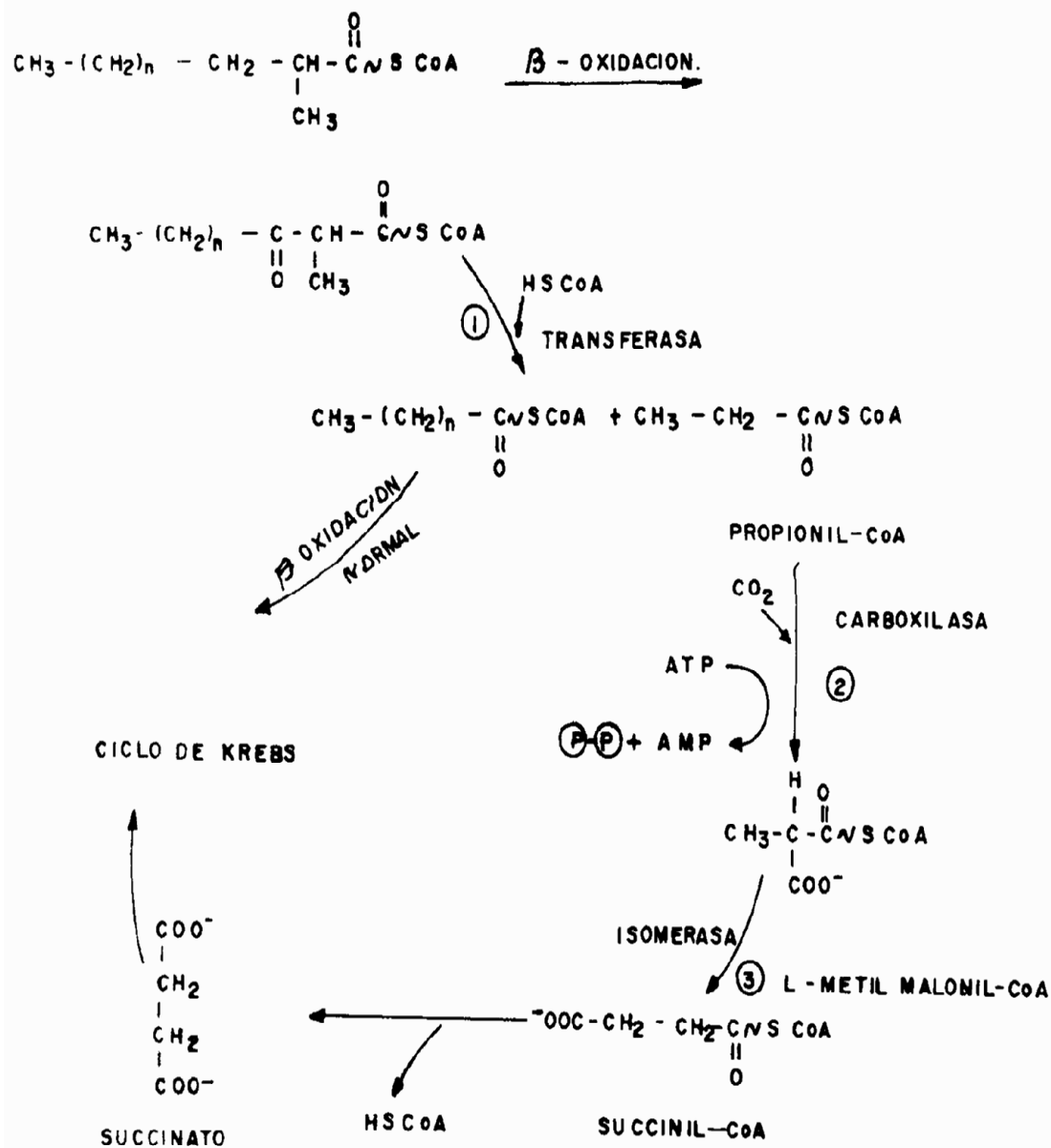


Figura 55: Esquema de β -oxidación de ácidos grasos ramificados

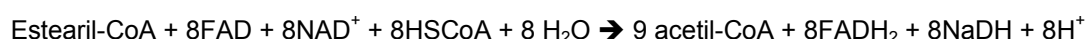
En primer lugar actúa una transferasa (reacción 1) que al incorporar HSCoA produce propionil-CoA este compuesto sufre una carboxilación (reacción 2) que requiere ATP y biotina (vitamina del grupo B) como coenzima; se produce inicialmente D-metilmalonil-CoA que es isomerizado a L- metilmalonil-CoA que a su vez se isomeriza (reacción 3) a succinil-CoA que por ser uno de los intermediarios del ciclo de Krebs continúa por esa vía. Se tiene aquí un nuevo ejemplo de una reacción anaplerótica y la posibilidad de degradar ácidos grasos poco comunes.

➤ **Balance de la degradación de ácidos grasos**

Con el objeto de ilustrar como se efectúan los balances de carbono y energía al considerar el catabolismo de los ácidos grasos, se presentan 2 casos:

- Catabolismo del ácido esteárico.
- Catabolismo del ácido linoleico.

En el primer caso tenemos un ácido graso con 18 carbonos, saturado. En su activación se consume 1 ATP y su β-oxidación requiere 8 vueltas, es decir (18/2) - 1. Por tal motivo, se tomará como ecuación global:



Los 9 acetil-CoA al ser oxidados en Krebs producen:



(ver figura 42)

La reoxidación de las coenzimas reducidas en la fosforilación oxidativa producen 3 ATP por cada NADH + H y 2 ATP por cada FADH₂ en consecuencia tendremos:

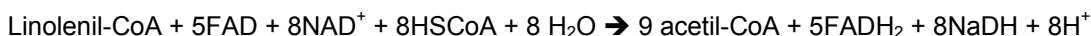
$$\frac{8 \text{ NADH} + 8 \text{ H}^+}{\beta\text{-oxidación}} + \frac{27 \text{ NADH} + 27 \text{ H}^+}{\text{Krebs}} = 35 \text{ NADH} + 35 \text{ H}^+$$

$$\frac{8 \text{ FADH}_2}{\beta\text{-oxidación}} + \frac{9 \text{ FADH}_2}{\text{Krebs}} = 17 \text{ FADH}_2$$

	35 x 3	=	105 ATP	Reoxidación NADH + H ⁺
	17 x 2	=	34 ATP	Reoxidación FADH ₂
			9 ATP	Krebs (fosforilación a nivel sustrato)
Total ATP producidos:			148	
Menos ATP gastados:			1	
Producción neta:			147 ATP	

En resumen 1 mol de ácido esteárico (PM=284,5) al ser oxidado hasta CO₂ y H₂O nos produce 147 ATP o sea 1073100 cal (147x7300). Dado que el calor de combustión de 1 mol de esteárico es de 2.698 kcal, la recuperación de energía es del 39,8%.

En el segundo caso, un ácido graso de 18 carbonos con 3 insaturaciones, gasta para su activación 1 ATP y con las 8 vueltas necesarias su ecuación global es:



En este caso, se producen 5 FADH₂ (comparados con los 8 FADH₂ producidos en la β-oxidación del esteárico) debido a las 3 insaturaciones preexistentes. Los

cálculos son similares a los efectuados para el esteárico y luego de la oxidación por el ciclo de Krebs se obtiene:

$$\frac{8 \text{ NADH} + 8 \text{ H}^+}{\beta\text{-oxidación}} + \frac{27 \text{ NADH} + 27 \text{ H}^+}{\text{Krebs}} = 35 \text{ NADH} + 35 \text{ H}^+$$

$$\frac{5 \text{ FADH}_2}{\beta\text{-oxidación}} + \frac{9 \text{ FADH}_2}{\text{Krebs}} = 14 \text{ FADH}_2$$

35 x 3	=	105 ATP	Reoxidación NADH + H ⁺
14 x 2	=	28 ATP	Reoxidación FADH ₂
		<u>9 ATP</u>	Krebs (fosforilación a nivel sustrato)
Total ATP producidos:		142	
Menos ATP gastados:		<u>1</u>	
Producción neta:		141 ATP	

Comparando con el esteárico, el catabolismo del linolénico, y en general de los insaturados, tiene un rendimiento en ATP algo más bajo. Si el calor de combustión de 1 mol de linoleico fuese de 2.625 kcal, la energía recuperada sería:

$$\begin{array}{r} 265 \\ 141 \times 7.3 \end{array} \quad \begin{array}{l} 100\% \\ X \end{array}$$

$$X = 39.2\%$$

Entonces, la cantidad de energía (en términos de ATP) obtenida por la oxidación de los ácidos grasos es muy superior a la obtenida de los carbohidratos. Esta es la razón por la cual el organismo acumula triglicéridos como material de reserva energética.

La cantidad de ATP proveniente de la oxidación completa de un triglicérido es considerable obteniendo 3 moléculas de ácidos grasos además del glicerol que a través de la glicólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, también contribuyen a la producción de ATP.

1.2 Catabolismo de fosfolípidos

Los fosfolípidos son constituyentes muy importantes de las membranas celulares cuyas propiedades biológicas dependen en buena medida de la presencia y composición de esta clase de lípidos. Algunos de ellos como la esfingomielina son especialmente abundantes en el tejido nervioso y en el cerebro.

Cuando se considera la estructura global de los fosfoglicéridos y de los esfingolípidos (ver el módulo de Química Orgánica 1), es evidente la enorme diversidad estructural que poseen estos lípidos. Por ello se presentarán solamente los mecanismos más generales para su degradación.

En el catabolismo de los fosfolípidos intervienen hidrolasas que pueden ser fosfolipasas, fosfodiesterasas y fosfomonoesterasas; cada una con un alto grado de especificidad. Por ejemplo, cuatro tipos de enzimas fosfolipasas presentes en los tejidos, producen específicamente los compuestos señalados en la figura 56, donde el sustrato es una lecitina.

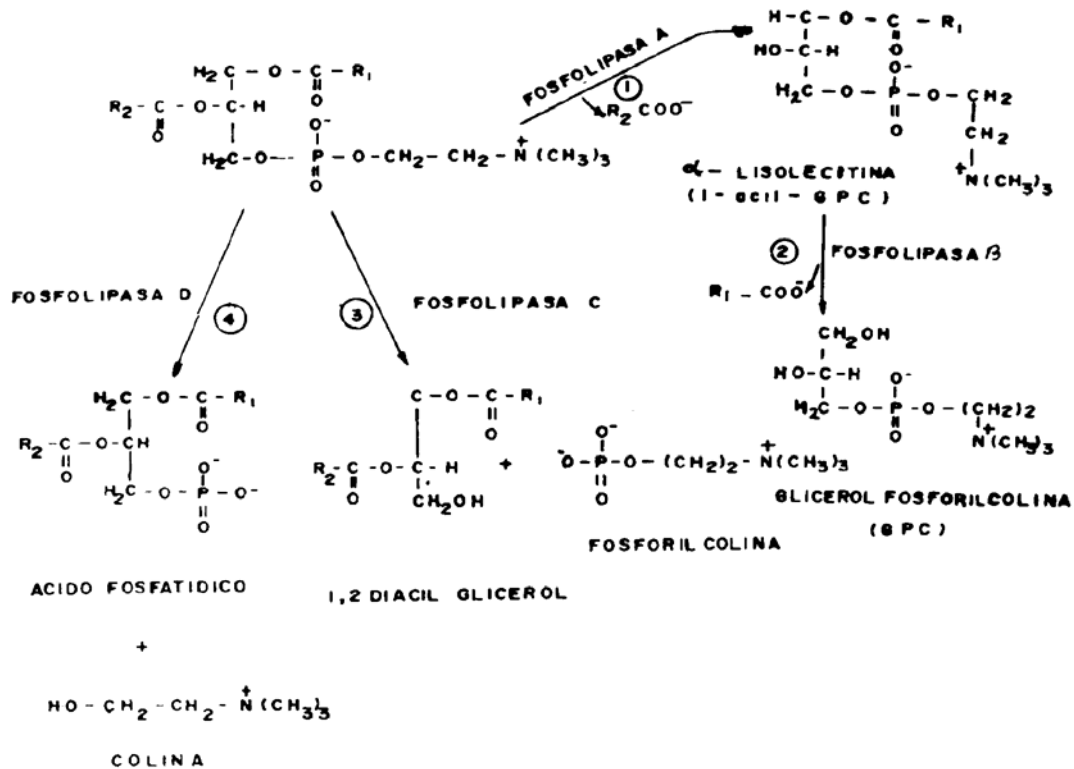
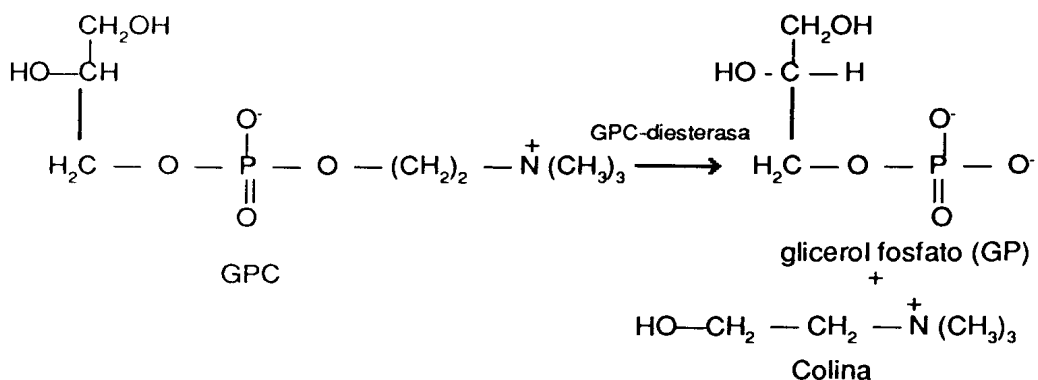
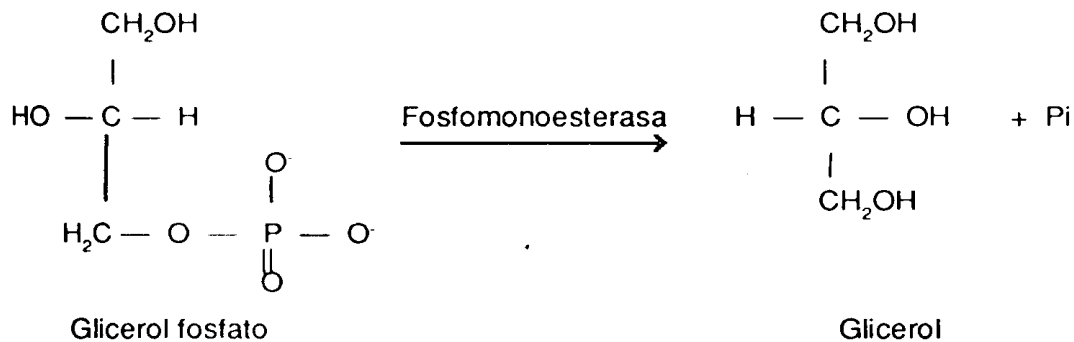


Figura 56: Productos resultantes de la degradación de la Lecitina por fosfolipasas

Adicionalmente, una fosfodiesterasa puede liberar colina a partir de glicerolfosforil colina (GPC) según la reacción:



A su vez, una fosfomonoesterasa hidroliza el glicerol-fosfato (GP) a fosfato inorgánico (Pi) y glicerol que puede ser catabolizado por la vía glicolítica:



Otros fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, entre otros, son catabolizados de manera semejante y en conjunto los diferentes productos participan en un ciclo metabólico por medio del cual se efectúa también la biosíntesis de estos compuestos.

1.3 Catabolismo de colesterol

El colesterol presente en los organismos superiores (peces, aves, mamíferos) es excretado en forma de esteroides neutros (con 27 átomos de carbono, C₂₇) o como ácidos biliares (C₂₄).

La figura 57, muestra las características estructurales del colesterol.

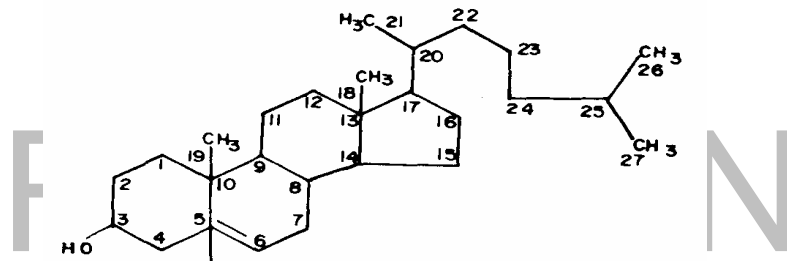


Figura 57: Estructura del colesterol

Los esteroides neutros presentes en las heces son una mezcla bastante compleja y en el hombre constituyen un 30 - 80% de los esteroides excretados. Se ha calculado que alrededor de 500 - 700 mg/día de esteroides neutros son excretados a través de la bilis; células de la mucosa intestinal y secreciones intestinales; la cantidad varía con cada especie y con la dieta, siendo mayor para dietas ricas en grasas insaturadas. El componente mayoritario de la mezcla es el coprostanol (cuya estructura se muestra en la figura 58) acompañado de otros esteroides saturados en las posiciones 5,6 y de esteroides de origen vegetal como sitosterol y estigmaesterol.

Los ácidos biliares más abundantes son el ácido cólico, el deoxicólico y el quenodeoxicólico cuya similitud estructural se aprecia en la figura 58.

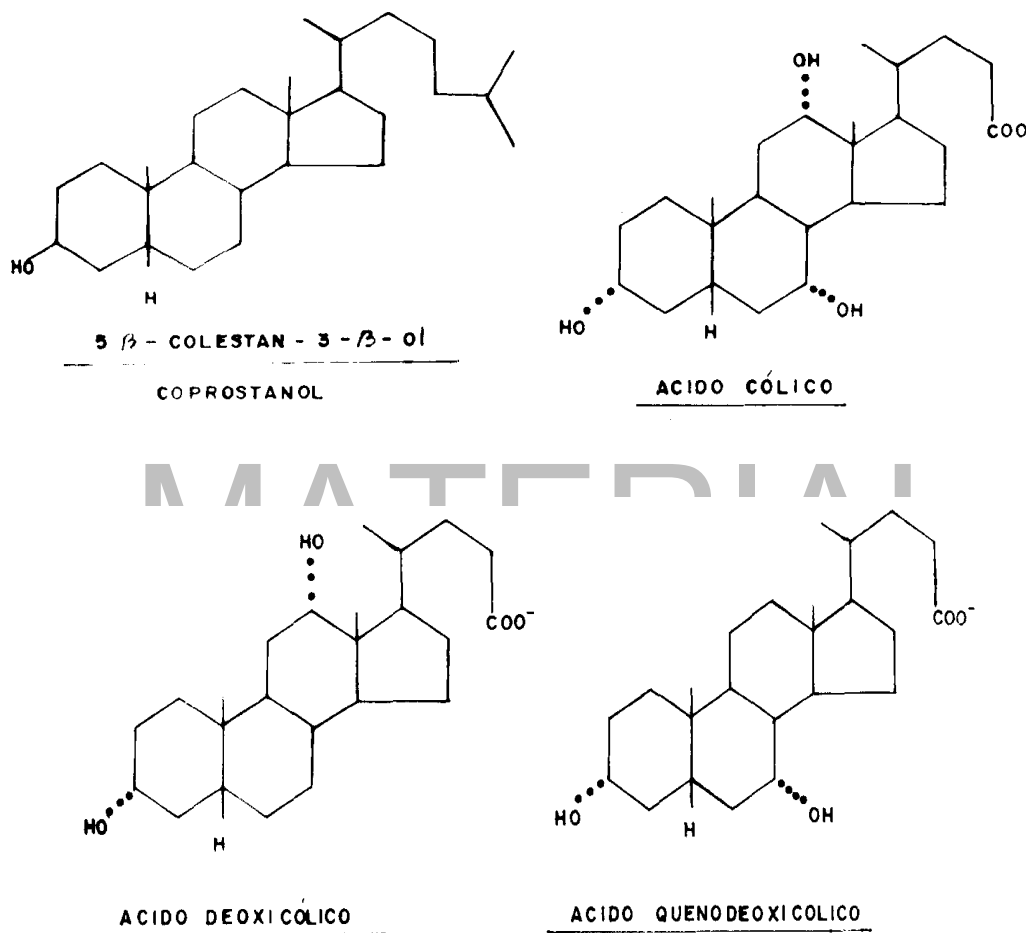


Figura 58: Principales productos del catabolismo del colesterol

El catabolismo de los ácidos biliares incluye como transformaciones más importantes, la saturación del doble enlace presente en los carbonos 5,6 del colesterol, la isomerización del hidroxilo 3β -a 3α - la hidroxilación (oxidación) de los carbonos 7 y/o 12 y la degradación de la cadena lateral hasta obtener un carboxilo en el carbono 24.

Las estructuras de los ácidos biliares reflejan esta secuencia de reacciones, que son discutidas en detalle en el artículo de Danielsson¹.

¹ Steroid metabolism/ H. Danielsson, T.T Tchen. – In: Metabolics Pathways / David M. Greenberg. – 3 ed. – London: Academic Press, 1968. – Vol 2, p 132 – 168.

Los ácidos biliares se conjugan con glicina o taurina para formar las sales biliares, las cuales juegan un papel muy importante en la digestión y absorción de los lípidos por sus propiedades emulsificantes. La formación de estas sales está influenciada por la dieta, por el estado de salud del individuo y por los niveles de algunas hormonas.

En el tracto intestinal las sales de los ácidos biliares se hidrolizan a su forma libre y luego de sufrir oxidación de los hidroxilos a grupos ceto, son reabsorbidas en la parte inferior del íleon y pasan al hígado donde luego de conjugarse con glicina o taurina son reexcretados a la bilis y de allí pueden pasar a las heces; este procesamiento está controlado homeostáticamente por la concentración de ácidos biliares en la sangre que va al hígado por la vena porta.

2 Biosíntesis de lípidos

En los organismos vivos la capacidad de almacenamiento de polisacáridos es bastante limitada mientras que los lípidos y especialmente los triglicéridos representan una fracción considerable del peso. Un adulto de 70 kg puede almacenar hasta 12 kg de triglicéridos, lo cual es suficiente para mantener su energía basal durante 8 semanas.

Los procesos de biosíntesis de lípidos son particularmente activos en el hígado y en el tejido adiposo de los animales, mientras que en las plantas se localizan principalmente en el fruto y semillas.

La mayoría de la discusión subsiguiente estará dedicada a la biosíntesis de triglicéridos, dada su importancia como material de reserva y luego se discutirán los fosfoglicéridos, por ser constituyentes de la membrana celular y los esteroides por el papel hormonal que tienen algunos de ellos.

2.1 Biosíntesis de triglicéridos

➤ Biosíntesis de ácidos grasos

Se estudiará en primer lugar como se sintetizan los ácidos grasos. Los trabajos en este campo han demostrado que el primer ácido graso sintetizado es el palmítico (C₁₆) y que a partir de él se derivan por alargamiento y formación de dobles enlaces, si es el caso, los otros ácidos grasos.

Las reacciones tienen lugar en el citoplasma a donde es transportado el grupo acetilo presente en las mitocondrias como AcetilCoA; éste metabolito proviene del catabolismo de carbohidratos, de ácidos grasos o de algunos aminoácidos y cuando se encuentra en exceso (como resultado de este catabolismo) es exportado al citoplasma empleando la secuencia de reacciones ilustrada en la figura 59.

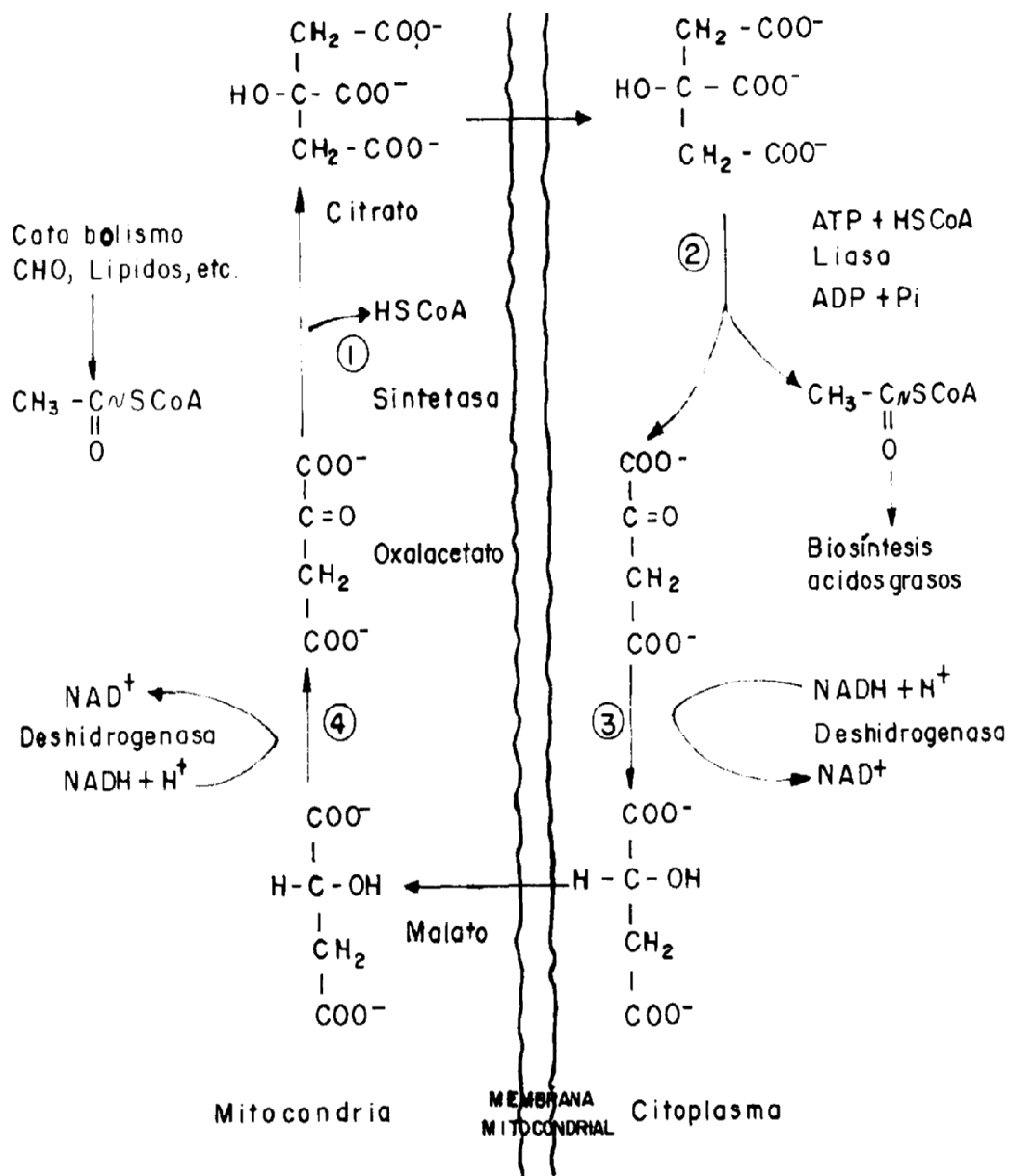
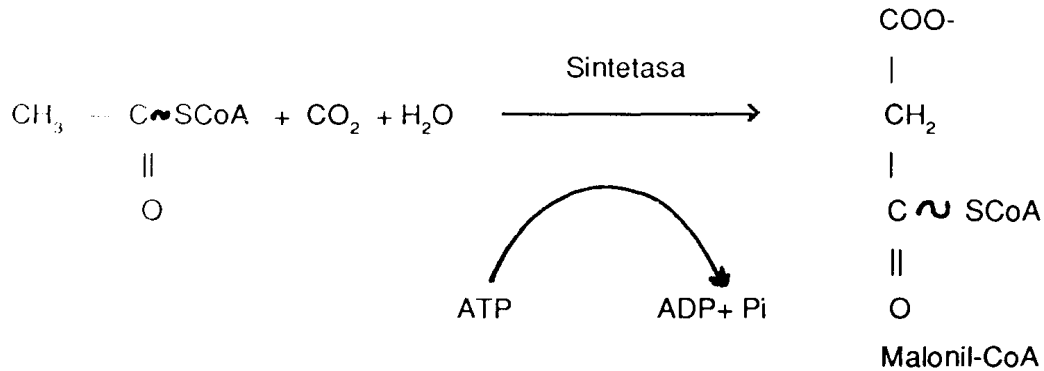


Figura 59: Transporte de Acetil-CoA mitocondrial al citoplasma

La reacción (1) corresponde a la primera reacción del ciclo de Krebs y el citrato es llevado al citoplasma por medio de un sistema transportador presente en la membrana mitocondrial. En el citoplasma es degradado por una liasa para dar oxalacetato y acetil CoA (reacción 2); la energía necesaria para formar el enlace éster proviene del ATP que se degrada. El Acetil-CoA citoplasmático va a la biosíntesis de ácidos grasos y el oxalacetato a través de la formación de malato, su entrada a la mitocondria y posterior reoxidación (reacciones 3 y 4), regeneran el

oxalacetato gastado en la primera reacción y el resultado neto es que el grupo acetato inicialmente presente en la mitocondria está ahora en el citoplasma donde sufre una carboxilación por medio de una sintetasa que requiere biotina (vitamina del grupo B) y ATP.

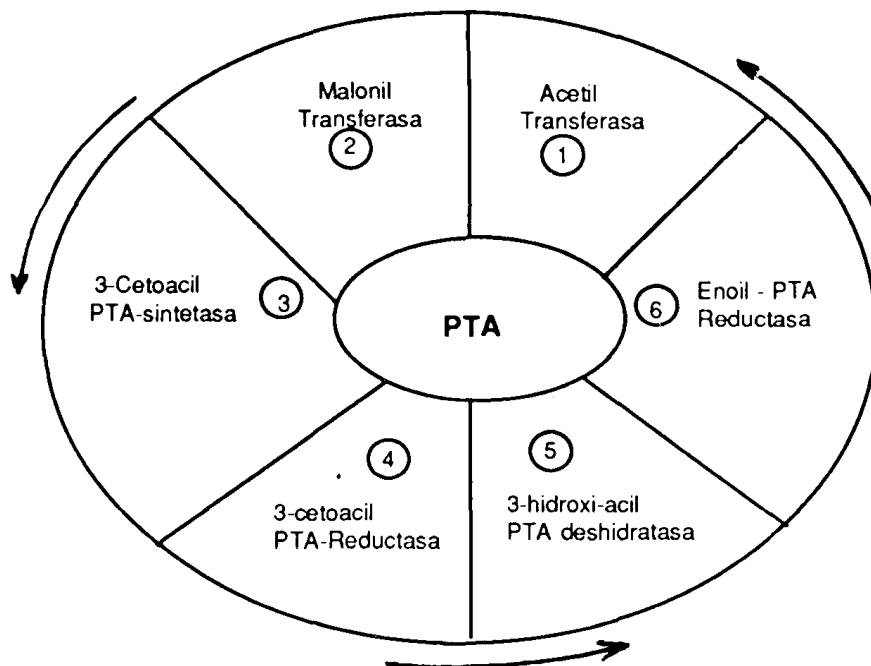
La reacción es la siguiente:



Esta sintetasa es una enzima reguladora cuya actividad aumenta con citrato; por consiguiente la velocidad global de la vía depende de la velocidad con que se efectúe esta carboxilación.

Una vez que se ha formado el malonil-CoA, interviene en los pasos restantes un complejo de siete enzimas (en células animales), conocido como la sintetasa de ácidos grasos que se abreviará como E (de enzima) y que en forma esquemática se considera constituido por las enzimas asociadas que se indican en el siguiente esquema:

REVISIÓN



El componente PTA (Proteína Transportadora de Acilos) es una enzima pequeña (PM 9000) que tiene la 4-fosfopanteteína como grupo prostético; esta molécula tiene en uno de sus extremos un grupo -SH que forma enlaces tio éster de manera similar a como lo hace la HSCoA y sirve así como un transportador de grupos R-(CO)⁻ (acilo); la enzima está también presente en procariotes² donde el complejo multienzimático ha sido parcialmente estudiado.

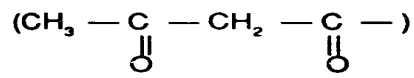
La participación de la sintetasa de ácidos grasos en la biosíntesis se lleva a cabo a través de una serie de pasos esquematizados en la figura 60.

La primera enzima que actúa es la acetil transferasa que lleva el grupo CH₃(CO)- sobre una cisteína de la sintetasa de ácidos grasos (E) (reacción 1) y luego el grupo malonil (OOC — CH₂ — (CO) —) es colocado por la malonil transferasa sobre el HS de la PTA (reacción 2).

Como resultado, los 2 grupos acilo están muy cerca en la sintetasa (E) y en el siguiente paso (reacción 3) son condensados recibiendo el C⁺ el grupo acetil y saliendo como CO₂ el COO⁻ marcado con **. Este mecanismo se estableció gracias al empleo de ¹⁴C como marcador.

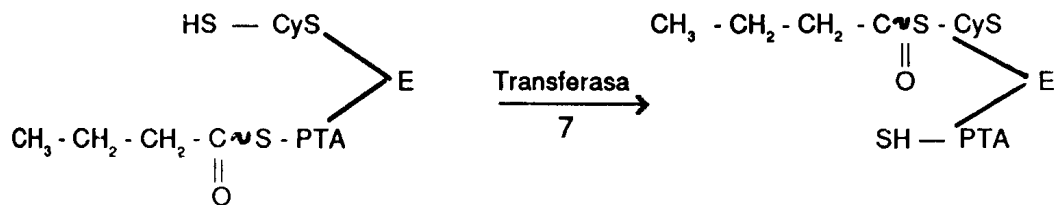
La proteína PTA, es quien ahora tiene el grupo 3-ceto acil.

² Lipid metabolism / W. J Lennarz, - Anual review in Biochemistry. – Vol 39, 1970. – p359.



Este es reducido por una enzima que usa NADPH+H⁺ como coenzima (reacción 4); este dinucleótido proviene de la vía de pentosas fosfato y esta reacción regenera la forma reducida necesaria para la operación de la vía (ver capítulo 6, Catabolismo de Carbohidratos de este módulo). El D-3- hidroxiacil PTA producido pierde una molécula de H₂O por medio de una deshidratasa formándose un doble enlace 2,3-trans- (reacción 5) que es reducido por otra NADP- deshidrogenasa (reacción 6).

El butiril SPTA unido a la sintetasa (E), es transferido enzimáticamente sobre la CySH (reacción 7)



En esta primera vuelta de la biosíntesis, la reacción global sería:



EN
REVISIÓN

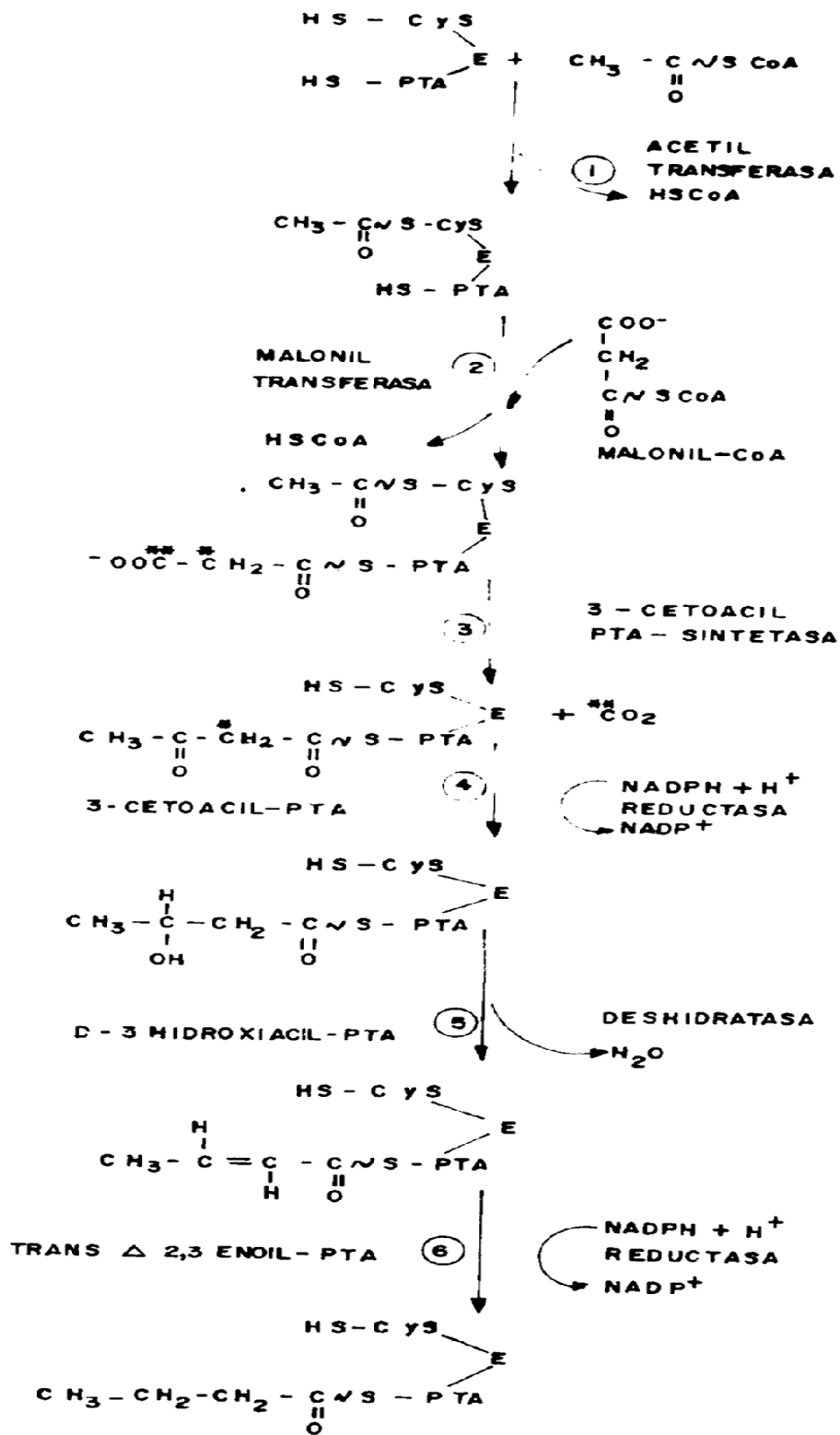
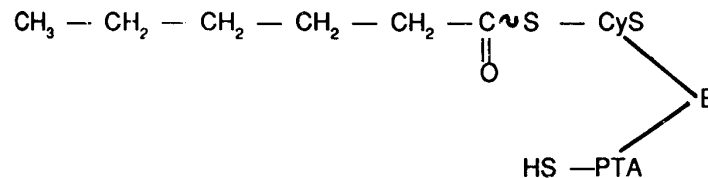


Figura 60: Esquema de las reacciones de biosíntesis de ácidos grasos

En la segunda vuelta, un nuevo malonil- CoA se transfiere al HS de la PTA (reacción 2) y luego se repiten las reacciones 3, 4, 5, 6 y 7 terminando el complejo como:



En cada vuelta se añaden 2 carbonos sobre el acilo ya formado, actuando el malonil CoA como el donante de C.

El palmítico requiere 7 vueltas en total y la ecuación global sería



El proceso de alargamiento de los ácidos grasos se efectúa por medio de sistemas enzimáticos localizados en la mitocondria donde el Acetil-CoA es el donante del par de carbonos recibidos por el acil-CoA; o también en el retículo endoplasmático, donde en forma muy activa se adiciona malonil-CoA sobre el acil-CoA.

Para la biosíntesis de los ácidos grasos monoinsaturados, el palmítico y el esteárico sirven como precursores ya que por acción de una oxigenasa mixta (emplea NADPH + H⁺ y O₂) se crea el doble enlace cis en la posición 9,10.

Los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolénico) no pueden ser sintetizados por mamíferos, quienes no disponen de las enzimas necesarias; por esta razón se consideran como esenciales y deben ser ingeridos en la dieta.

Los procariones y las plantas sí pueden sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados por medio de oxigenasas propias de cada tipo de organismo.

➤ Biosíntesis de triglicéridos y fosfoglicéridos

Estos tipos de compuestos comparten en su biosíntesis, varios intermediarios y algunas reacciones. Los intermediarios comunes son acil-CoA y glicerol-3-fosfato; este último puede provenir o de glicólisis (ver figura 39) o de la fosforilación del glicerol así:

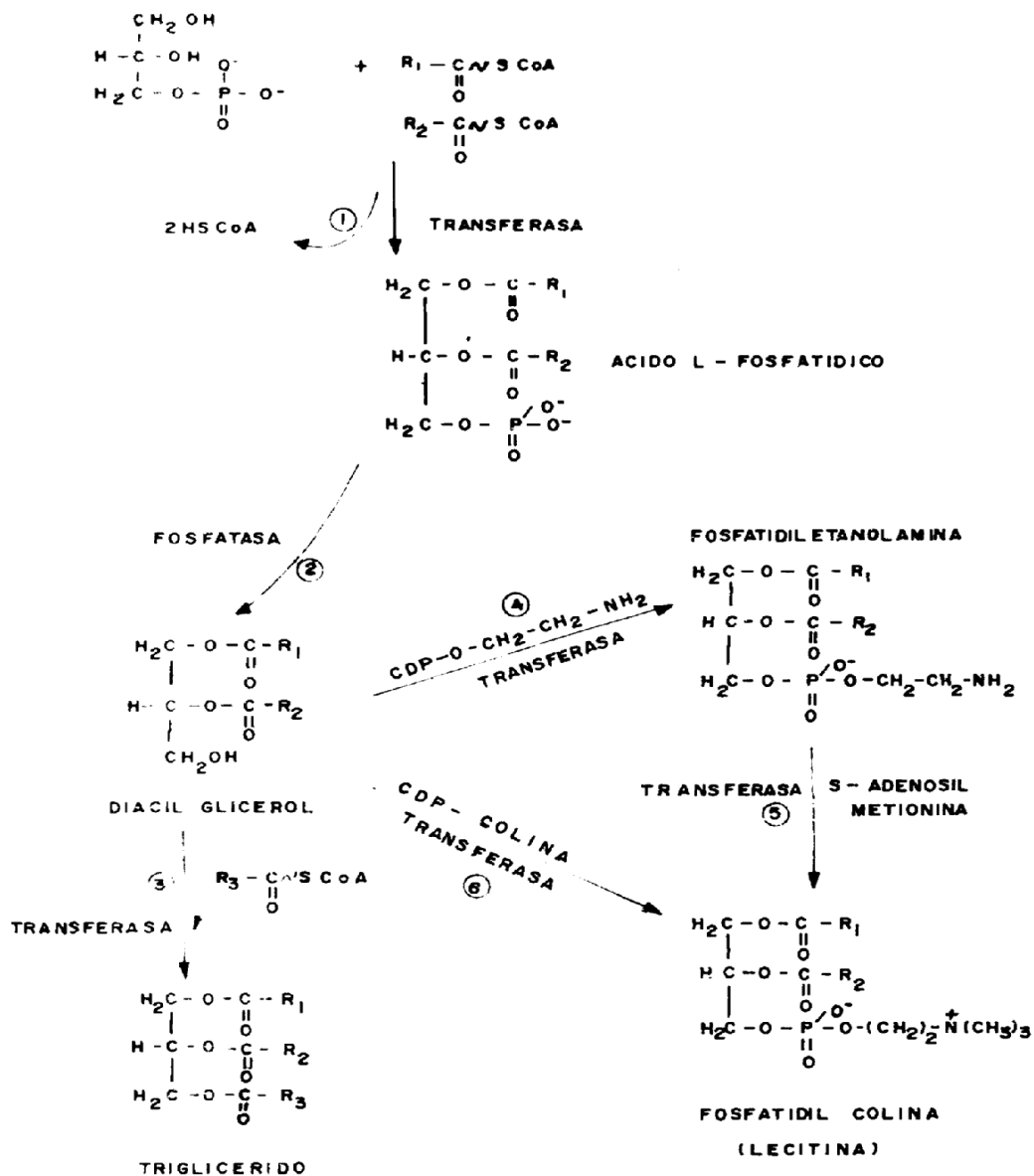


Figura 61: Esquema de la biosíntesis de triglicéridos y fosfoglicéridos

2.2 Biosíntesis de colesterol

Dada la importancia de este esteroide como precursor de otros esteroides biológicamente importantes como son los ácidos biliares y las hormonas esteroidales, su biosíntesis ha sido objeto de un gran número de trabajos y su esclarecimiento por Bloch³, Lynen y Conforth les valió el Nóbel en 1961.

³ The biological síntesis of colesterol K. Bloch.-Science.-Vol 150, 1965.-p.19

Empleando ^{14}C se ha establecido que la vía biosintética se inicia con la condensación de 3 moléculas de acetil-CoA, produciéndose mevalonato que a su vez es fosforilado y por pérdida de CO_2 e H genera isopentenilpirofosfato que es una forma activa de una unidad isopreno. Luego 6 unidades isopreno se ensamblan para producir el escualeno que por ciclización produce el lanosterol, que es un esteroide y a partir de él se obtiene el colesterol.

Las transformaciones anteriores son grupos de reacciones y la vía en detalle es una de las más complejas que existen, por eso solo se indican los intermediarios ya citados, en la figura 62.

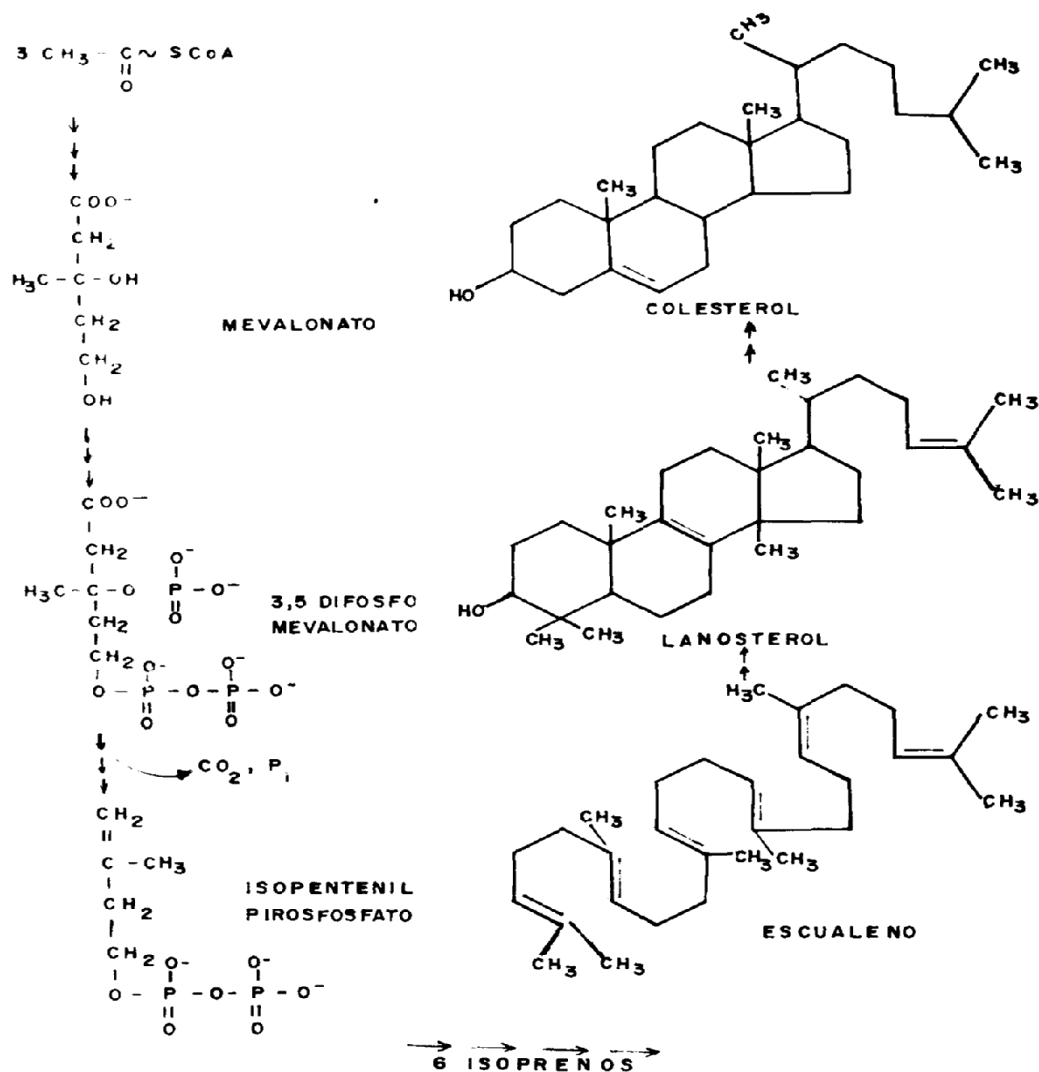


Figura 62: Principales intermediarios en la biosíntesis del colesterol

Actividad 8

1. Calcule para la β -oxidación de 1 mol de ácido esteárico:
 - Las vueltas que se requieren.
 - La cantidad de ATP producido.
 - El rendimiento energético si el calor de combustión es de 2.698 kcal/mol.Recuerde que el esteárico es un ácido graso saturado con 18 átomos de C y que ΔG° del ATP = -7.300 cal/mol
2. Compare la energía recuperada al oxidar completamente 1 g de ácido oleico (PM=282,5) con la energía obtenida al oxidar la misma cantidad de sacarosa (PM=342,3). Saque sus conclusiones respecto a cual es la mejor forma de almacenar la energía en el organismo.
3. Compare, haciendo una tabla, la β -oxidación con la biosíntesis de los ácidos grasos. ¿Qué principio del metabolismo se demuestra con esta comparación?
4. Explique cómo se produce la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria. Recuerde el papel central de la carnitina en este proceso.
5. Ilustre cómo actúan las diferentes fosfolipasas. Considere una lecitina como sustrato inicial.
6. Demuestre cómo se efectúa el transporte de acetyl-CoA mitocondrial hacia el citoplasma. Consulte la figura 59.
7. Explique cómo actúa la sintetasa de ácidos grasos en la biosíntesis de los mismos. Considere el esquema de la figura 60.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No. 16

1. Ilustre las reacciones por las cuales tiene lugar el catabolismo del ácido araquidónico (C_{20} ; $\Delta 5, 6; 8, 9; 11, 12; 14, 15$) y efectúe el balance de coenzimas y de rendimiento energético si su calor de combustión = 2.920 kcal/mol.
2. Describa las principales reacciones del catabolismo de los fosfoglicéridos.
3. Compare el catabolismo de los triglicéridos con el de los fosfoglicéridos en cuanto a:
 - Producción de energía.
 - Empleo de metabolitos intermedios en las vías biosintéticas respectivas.
4. Explique cómo se realiza el catabolismo del colesterol.
5. Ilustre cómo se realiza la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en las plantas, tomando el ácido linolénico como ejemplo.
6. Compare la degradación con la biosíntesis del ácido oleico.

Lectura complementaria

Consulte la siguiente referencia:

1. The biochemistry of fatty acid catabolism/ F.L. Breusch.- Advances In Enzymology.- Vol 8, 1948. - p.443.

CAPITULO 4: METABOLISMO DE AMINOACIDOS

Objetivos

- Analizar las principales vías generales del catabolismo de los esqueletos carbonados, grupos α -NH₂ y α -COOH de los aminoácidos.
- Describir las diferentes formas como se elimina el NH₄, enfatizando el mecanismo empleado por los vertebrados terrestres.
- Ilustrar las diferencias de capacidad biosintética de aminoácidos que presentan los diversos organismos.
- Ilustrar cómo se realiza la biosíntesis de algunos aminoácidos.
- Demostrar la forma como opera en la biosíntesis de aminoácidos el mecanismo de control de retroinhibición.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

Autoevaluación No.17

1. Indique la correspondencia entre los compuestos de la columna A y el tipo de compuesto señalado en la columna B. Los términos de la columna B se pueden utilizar dos veces o ninguna vez.

A	B
1) Pepsina	a) Lipasa
2) α -cetoglutarato	b) Intermediario en el ciclo de Krebs
3) Deshidrogenasa glutámica	c) Intermediarios de fosfatos de pentosa
4) NADP ⁺	d) Proteasa
5) Quimotripsina	e) Aminoácido protéico
6) NAD ⁺	f) α -cetoácido
7) Piruvato	g) Coenzima de la deshidrogenasa biosintética
8) Arginina	h) Coenzima de la deshidrogenasa catabólica

2. Ilustre las estructuras de los siguientes aminoácidos:
a) Asp. b) Ala. c) Thr. d) Phe. e) Met. f) Gln. g) Asn.
3. Describa brevemente cómo se realiza la gluconeogénesis:
4. Indique los compuestos que alimentan al Ciclo de Krebs. Explique (sin usar estructuras químicas) lo que sucede en esta vía.
5. ¿Qué son los lisosomas? ¿Cuáles clases de enzimas se encuentran habitualmente en ellos?
6. ¿En cuáles vías metabólicas se produce NADPH + H⁺? ¿Cuál es el papel de este compuesto?

INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos realizan una serie de funciones muy variadas en el organismo ya que son usados como bloques constituyentes de proteínas, como precursores de coenzimas, hormonas, núcleos porfirínicos, neurotransmisores, antibióticos, etc. En condiciones especiales, cuando hay carencia de reservas energéticas, pueden incluso ser utilizados como fuente de energía.

La tasa de conversión metabólica de los aminoácidos es considerable y se calcula que un hombre de 70 kg, metaboliza alrededor de 400 g, diarios de proteínas, de los cuales cerca de un 25% entran en degradaciones oxidativas que confluyen en el ciclo de Krebs y en consecuencia, son catabolizados hasta CO_2 y NH_3 .

1 Catabolismo

Los aminoácidos pueden ser catabolizados en diferentes circunstancias metabólicas:

- Durante el proceso de renovación normal de los tejidos, las proteínas son degradadas hasta aminoácidos y si estos no se utilizan para sintetizar otras proteínas, son degradados oxidativamente.
- Si la dieta provee más de los aminoácidos necesarios para satisfacer los requerimientos de la síntesis de proteínas corporales, el exceso se cataboliza pues el organismo no puede acumularlos.
- En ciertas condiciones metabólicas, en las cuales no se permite la utilización adecuada de los carbohidratos (por ejemplo, diabetes mellitus) o en las cuales no hay suficientes reservas de polisacáridos (ayuno), las proteínas son utilizadas como fuentes de energía y los aminoácidos son oxidados degradativamente.

Generalmente, el catabolismo de los aminoácidos está precedido por la hidrólisis de las proteínas que en forma exógena a los tejidos se realiza en el tracto digestivo por la acción combinada de proteasas como la pepsina (jugo gástrico), tripsina, quimotripsina, exopeptidasas (jugo pancreático y glándulas del intestino delgado); los aminoácidos libres resultantes son absorbidos en el intestino delgado y transportados por la sangre hasta los diferentes tejidos.

La degradación de las proteínas al interior de la célula (proteólisis endógena) no se conoce en detalle pero muy seguramente involucra las variadas proteasas presentes en los lisosomas.

En contraste con lo ya discutido para la degradación de carbohidratos y lípidos, no es posible incluir todos los aminoácidos en esquemas generales de degradación y

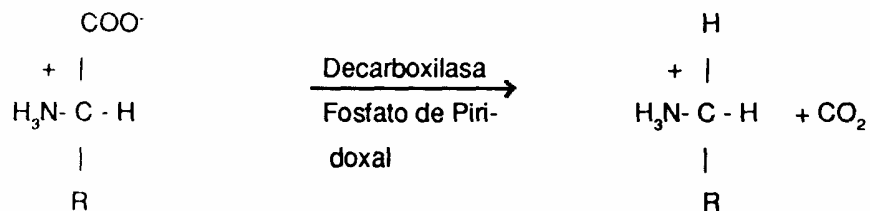
por el contrario existen cerca de 20 sistemas multienzimáticos, uno para cada aminoácido, que entran en juego en el catabolismo de la cadena carbonada.

1.1 Catabolismo de los grupos α -NH₂ y α -COO⁻

Existen cuatro caminos por los cuales se modifican degradativamente los aminoácidos a nivel de los grupos α -NH₂ o α -COO⁻.

- **Decarboxilación**

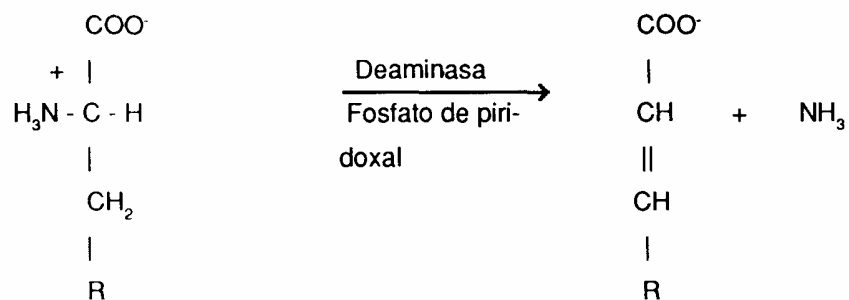
Un cierto número de decarboxilasas (clase liasas), catabolizan la siguiente reacción:



Estas enzimas, que utilizan el fosfato de piridoxal como coenzima, producen a partir de ciertos aminoácidos aminas con una actividad biológica muy fuerte (histamina a partir de His, DOPA-amina a partir de dihidrofenilalanina) y cuya existencia es muy breve en la célula ya que son destruidas por aminooxidasas.

- **Deaminación no oxidativa**

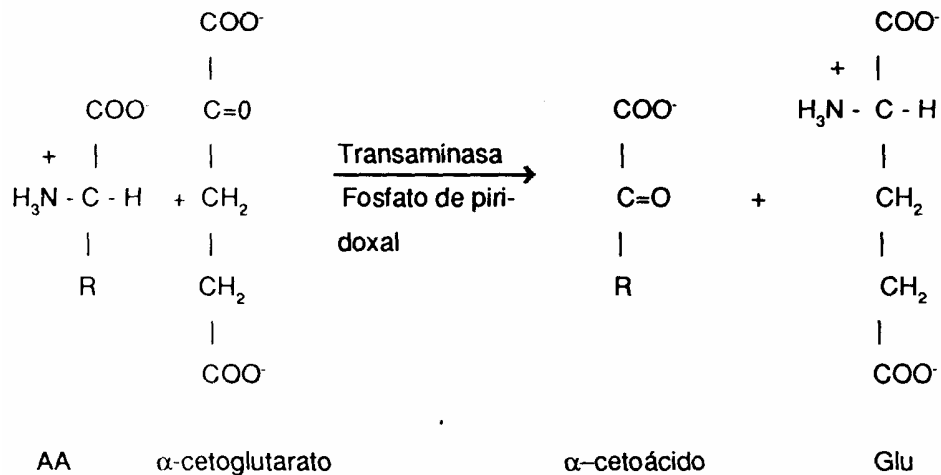
Algunas enzimas presentes en ciertos microorganismos y en vegetales superiores, catalizan la reacción:



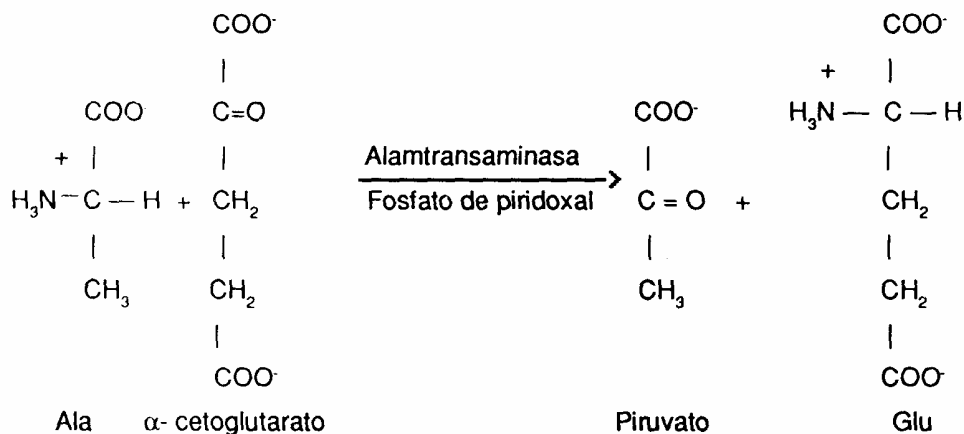
La enzima de este tipo mejor conocida es la aspartasa (clase liasa) que transforma el ácido aspártico en fumarato.

- **Transaminación**

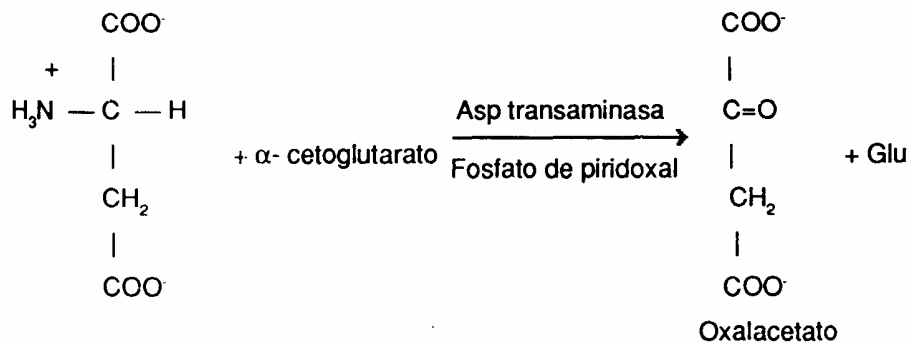
La reacción general catalizada por las transaminasas (transferasas) tiene como objeto remover el grupo α -NH₂ de un aminoácido dado y transferirlo finalmente sobre un aceptor común (el α -cetoglutarato) y el producto posteriormente es catabolizado. Podemos representar la reacción así:



La mayoría de las transaminasas son más específicas para el α -cetoglutarato que para el aminoácido donador del α -NH₂ y la reacción es fácilmente reversible pues el ΔG° es cercano a cero. Con varios aminoácidos la reacción produce α -cetoácidos que son metabolitos del ciclo de Krebs o fácilmente llegan a serlo, tal como se observa en las siguientes transaminaciones:

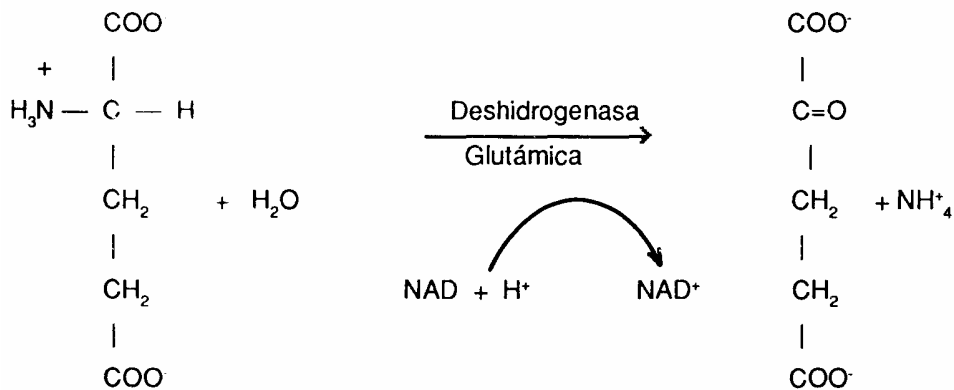


Uno de los aspectos más importantes de este tipo de reacción es la canalización de los grupos α -NH₂ de todos los aminoácidos hacia el α -cetoglutarato que actúa como un transportador común en la forma de Glu.



- **Deaminación oxidativa**

En este camino el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ del Glu es liberado como NH_3 por la deshidrogenasa glutámica (oxido-reductasa) según la reacción:



La enzima presente solo en la mitocondria usa el NAD como coenzima produciendo NH_4 libre que es tóxico y por lo tanto debe ser eliminado (lo cual se verá más adelante), y regenerando el α -cetoglutarato gastado en las reacciones de transaminación.

Esta reacción junto con la transaminación, ocupa un lugar clave en el catabolismo de los aminoácidos y la actividad de la enzima está modulada positivamente por ADP e inhibida por GTP; en consecuencia, el funcionamiento del ciclo de Krebs regula su actividad.

1.2 Catabolismo del esqueleto carbonado

El esqueleto carbonado resultante de la pérdida del $\alpha\text{-NH}_2$ o del $\alpha\text{-COO}^-$, es degradado en cada caso (o sea para cada aminoácido) por un sistema enzimático diferente que al fin de cuentas produce uno o dos intermediarios del ciclo de Krebs. La figura 63 ilustra en forma general los puntos de entrada y los metabolitos finales producidos en el catabolismo de estos esqueletos carbonados:

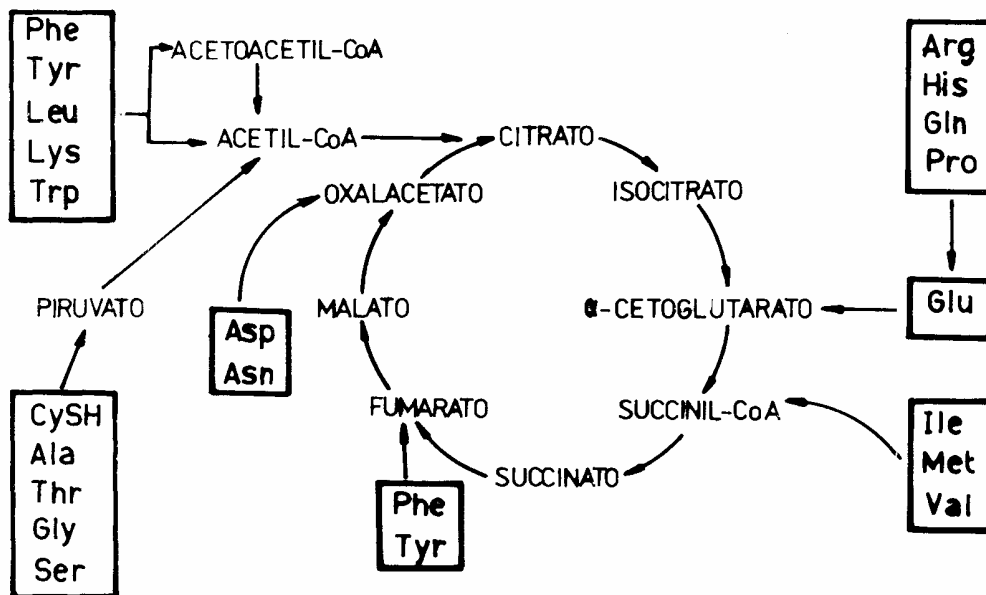


Figura 63: Convergencia de los esqueletos carbonados de los AA al ciclo de Krebs.

En el caso de aminoácidos con dos sitios de entrada (por ejemplo Phe, Tyr) ello se debe a que durante el catabolismo se producen dos fragmentos que finalizan como dos metabolitos diferentes del ciclo de Krebs.

Es interesante señalar como sólo son cinco los metabolitos que finalmente aparecen y son frecuentemente aquellos que en otros procesos catabólicos sirven como puntos de conexión con otras vías. Por otra parte esta convergencia refuerza el papel central del ciclo de Krebs en el metabolismo general de la célula.

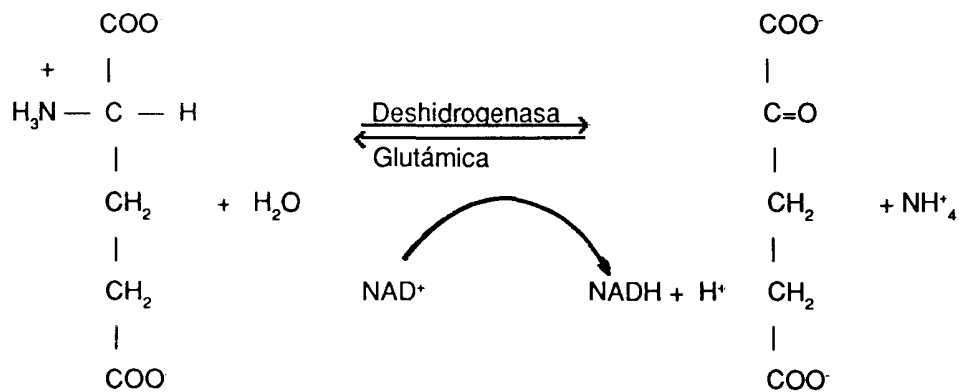
Tomando como criterio los sitios de entrada a Krebs, los aminoácidos que producen Acetoacetil-CoA se llaman cetogénicos (por producir cuerpos cetónicos en el hígado) y el resto (unos 15 aminoácidos) son llamados glucogénicos ya que por degradarse a piruvato, α -cetoglutarato, succinato u oxalacetato pueden dar lugar a glucosa y a glicógeno por la vía de la gluconeogénesis.

1.3 Eliminación del NH_4

El NH_4^+ liberado en la deaminación oxidativa de Glu debe ser eliminado pues su toxicidad es muy elevada; ello parece deberse a que la pequeña fracción (1%) existente como NH_3 penetra fácilmente a la célula y en la mitocondria desplaza hacia la izquierda la reacción catalizada por la hidrogenasa glutámica.

Cuando esto ocurre, se sintetiza Glu a expensas de α -cetoglutarato y, por ser este un intermediario del ciclo de Krebs, se disminuye la actividad de esta vía y por

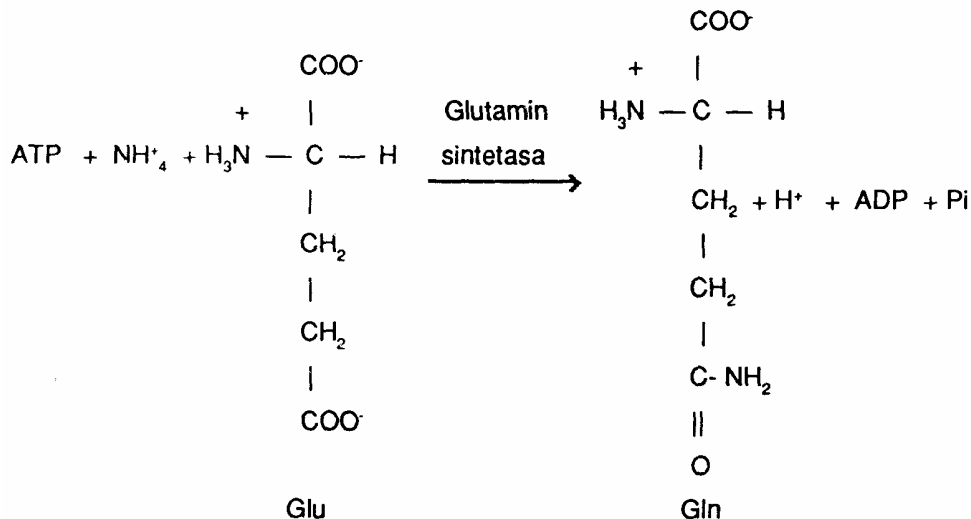
ende la oxidación de la glucosa, que en el caso del cerebro, es prácticamente la única fuente de energía.



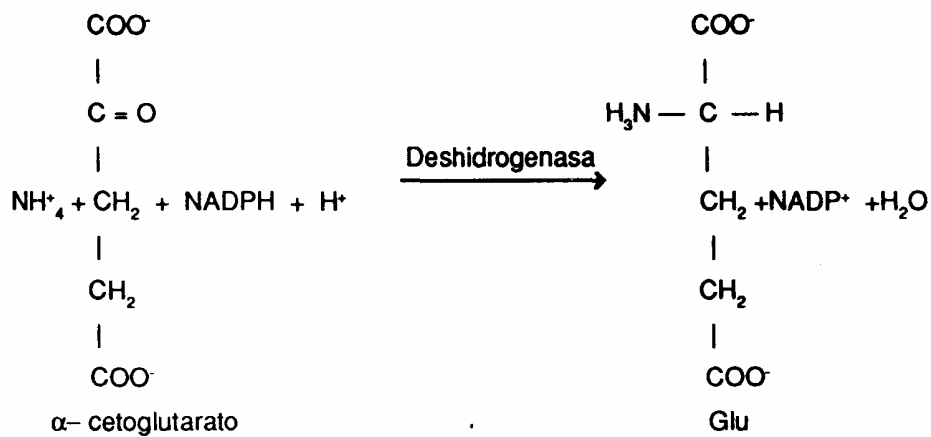
Para evitar estos problemas, el organismo posee mecanismos para transportar el NH_4 en una forma no tóxica y luego deshacerse de él en la orina.

El transporte de NH_4^+ se efectúa usando diferentes mecanismos según sea el tejido donde se produce la deaminación oxidativa.

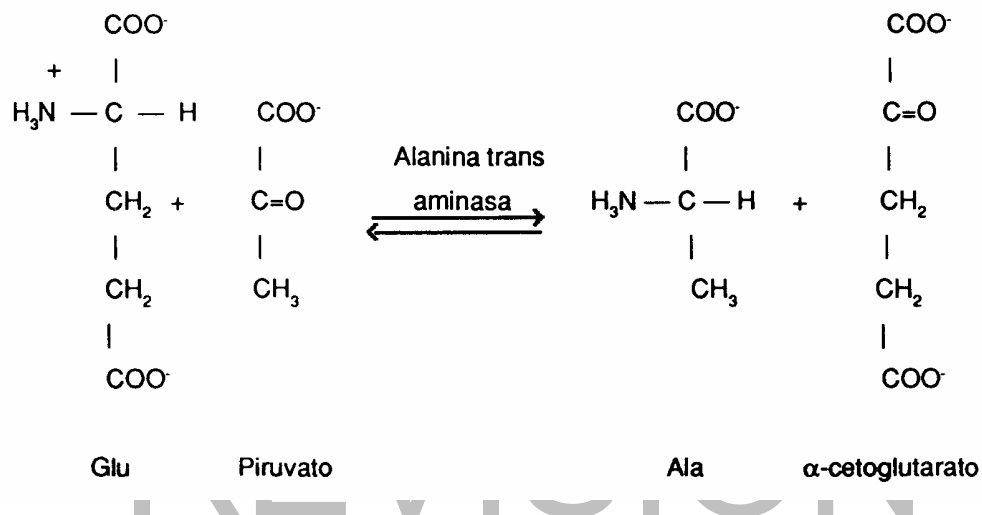
En muchos tejidos periféricos incluyendo el cerebro, el NH_4^+ producido se combina con Glu para formar Gln que es transportada por la sangre hasta el hígado o los riñones; la reacción es catalizada por la glutamin-sintetasa (clase ligasa) y podemos representarla así:



En el tejido muscular, donde la actividad metabólica es considerable, tienen lugar dos reacciones consecutivas. En la primera, que ilustramos como:



Una NADP-deshidrogenasa reduce el NH_4^+ hasta el $\alpha\text{-NH}_2$ de Glu y en la segunda reacción se realiza una transaminación usando como $\alpha\text{-ceto}$ ácido el piruvato:



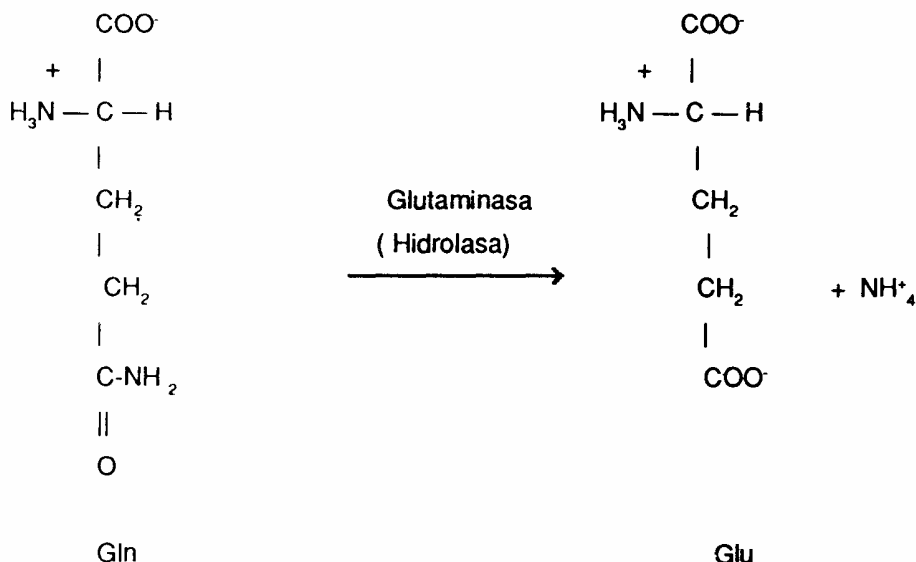
Es interesante anotar que en esta secuencia:

- Se incorpora el NH_4^+ como el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ de la Ala.
- Se utiliza como aceptor de $\alpha\text{-NH}_2$ al Piruvato que es un metabolito abundante en el músculo.
- Se regenera el $\alpha\text{-cetoglutarato}$, lo cual es importante pues existe una cantidad limitada del mismo.

La Ala así formada transporta al nitrógeno (proveniente del NH_4^+) por el torrente sanguíneo hasta el hígado.

La excreción del nitrógeno proveniente de los grupos α -NH₂ de los aminoácidos se realiza de tres maneras diferentes, según la especie animal de que se trate:

- En el caso de los peces, la glutamina circulante en la sangre llega a las branquias y allí se efectúa la reacción:



El NH₄ se solubiliza rápidamente en el agua que llega a las branquias y así es eliminado; los animales que usan este sistema de excreción se llaman amonotélicos (excretores de amoníaco).

- Las aves, los insectos y los reptiles convierten el nitrógeno de los aminoácidos y de las bases purínicas en ácido úrico por un proceso multienzimático relativamente complejo. Por tal razón se conocen como uricotélicos.
- Los vertebrados terrestres, excretan el nitrógeno de los aminoácidos sintetizando urea en el hígado por un proceso descubierto por Krebs y Henselit que recibe el nombre de Ciclo de la Urea. Las reacciones que se suceden, se ilustran en la figura 64.

El glutámico y/o la glutamina que vienen por la sangre, liberan NH₄ (reacciones 1 y 2) al interior de la mitocondria hepática por medio de la glutaminasa o de la deshidrogenasa; este NH₄ (que proviene, como ya vimos de los grupos α -NH₂ de los aminoácidos) reacciona con ATP y HCO₃ gracias a una sintetasa (reacción 3) para formar un compuesto de alta energía que es el Carbamil-fosfato.

Este se une con la ornitina (aminoácido no proteico) que proviene del citoplasma (4) para formar citrulina, que es otro aminoácido no proteico, el cual sale del citoplasma. Allí la citrulina se combina con una molécula de aspártico, generado por las reacciones de transaminaciones que se vieron antes, para formar

argininosuccinato, estando catalizada la reacción por una sintetasa que emplea ATP como coenzima (reacción 5).

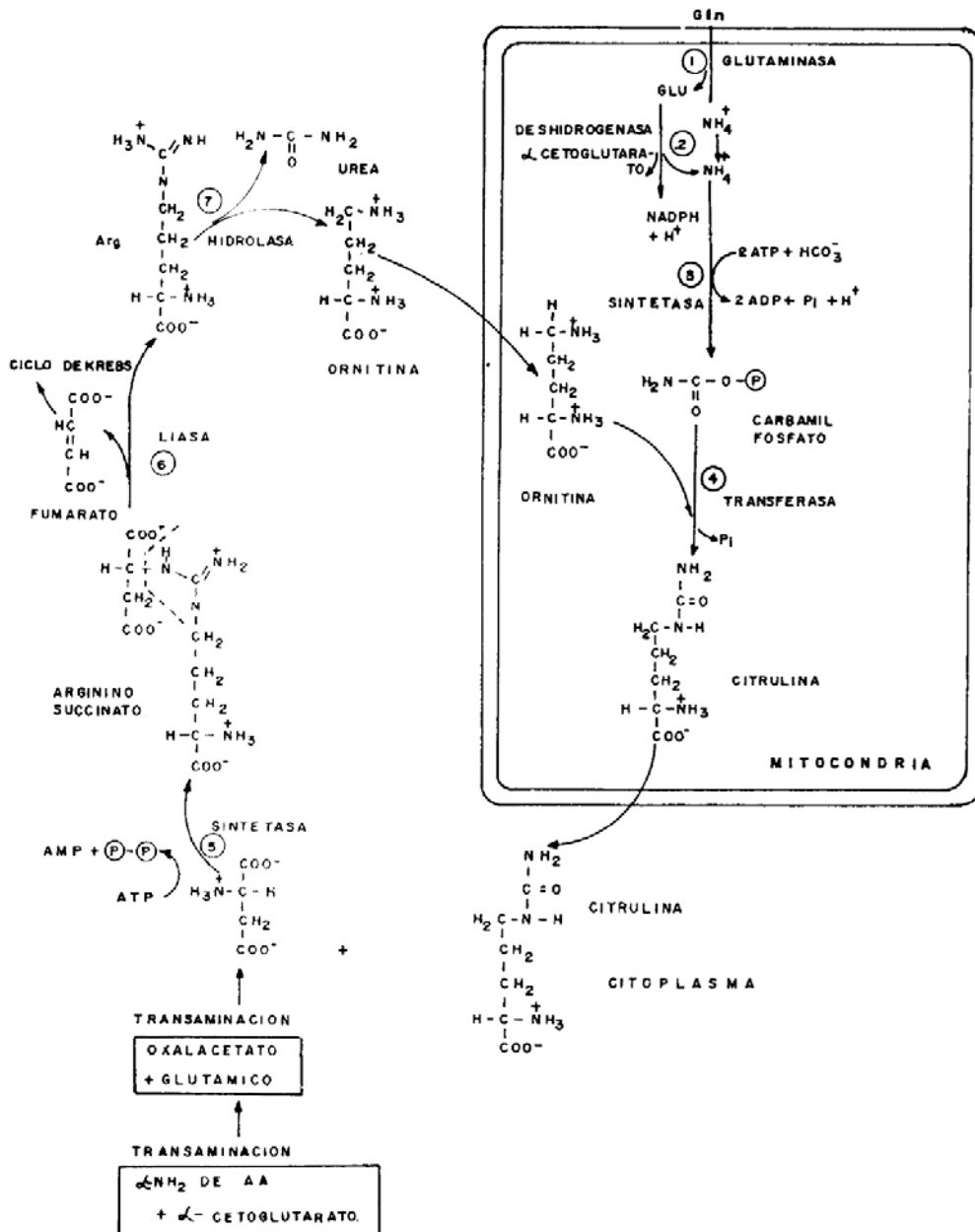


Figura 64: Ciclo de la Urea

Este compuesto se rompe (en el enlace marcado con la línea punteada) por acción de una liasa (6) y produce Fumarato que va al ciclo de Krebs y Arginina; ésta se degrada a su vez (7) produciendo urea y ornitina.

La ornitina regenerada penetra a la mitocondria y el ciclo está listo para recomenzar; la urea es transportada por la sangre hasta el riñón para ser excretada en la orina.

En este ciclo se ve como hay una cooperación de enzimas mitocondriales y cito plasmáticas para eliminar dos productos de desecho como son el NH_4 y el HCO_3 .

El costo energético es alto pues el balance de ATP muestra que por molécula de urea producida se consumen dos ATP en la reacción 3 y que en la reacción 5 se produce una de AMP más pirofosfato a partir de un ATP, lo cual significa que en último término el consumo total es de cuatro ATP por molécula de urea sintetizada.

Se ha calculado que alrededor de un 15% de la energía obtenida por el catabolismo del esqueleto carbonado de los aminoácidos, se invierte en la producción de la urea como forma de excreción del grupo $\alpha\text{-NH}_2$.

2 Biosíntesis

De manera análoga a lo que ocurre en la degradación de los aminoácidos, su biosíntesis se lleva a cabo por medio de variadas rutas metabólicas cada una de las cuales es propia de un determinado aminoácido; en algunos casos (lisina, isoleucina) hay hasta unas dos o tres rutas diferentes para cada uno.

Los organismos vivientes difieren ampliamente respecto a su capacidad y respecto a la fuente de nitrógeno que emplean.

El hombre posee los sistemas enzimáticos que le permiten la biosíntesis a partir de NH_3 de sólo diez aminoácidos, que corresponden a los aminoácidos no esenciales, los aminoácidos restantes (esenciales) deben ser ingeridos en la dieta; los nitritos o nitratos no pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno proteínico.

Los ruminantes aunque no sintetizan por sí mismos sino los aminoácidos no esenciales, pueden emplear el NO_2^- o el NO_3^- como fuente, gracias a la acción de los microorganismos presentes en el rumen que reducen estos compuestos a NH_3 .

Las plantas superiores sintetizan todos los aminoácidos y emplean NH_3 , NO_2^- o NO_3^- como fuente de nitrógeno proteínico; algunas de ellas (las leguminosas) pueden inclusive fijar el nitrógeno atmosférico a través de un proceso simbiótico con bacterias del género *Rhizobium*.

Los microorganismos por su parte difieren muchísimo en su capacidad biosintética de aminoácidos y es así como la *Escherlchia coli* puede elaborar todos sus aminoácidos, mientras que ciertos *Lactobacillus* sólo fabrican de cuatro a cinco aminoácidos.

La tabla 19 indica cuales aminoácidos son esenciales o no para el hombre:

Aminoácidos No Esenciales	Aminoácidos Esenciales
Glutámico	Leucina
Glutamina	Isoleucina
Alanina	Lisina
Aspártico	Metionina
Asparagina	Fenilalanina
Prolina	Treonina
Glicina	Triptófano
Serina	Valina
TiroSina*	Arginina
Cisteina*	Histidina

*Requieren de Phe y Met respectivamente para su biosíntesis, por lo cual se consideran como semiesenciales

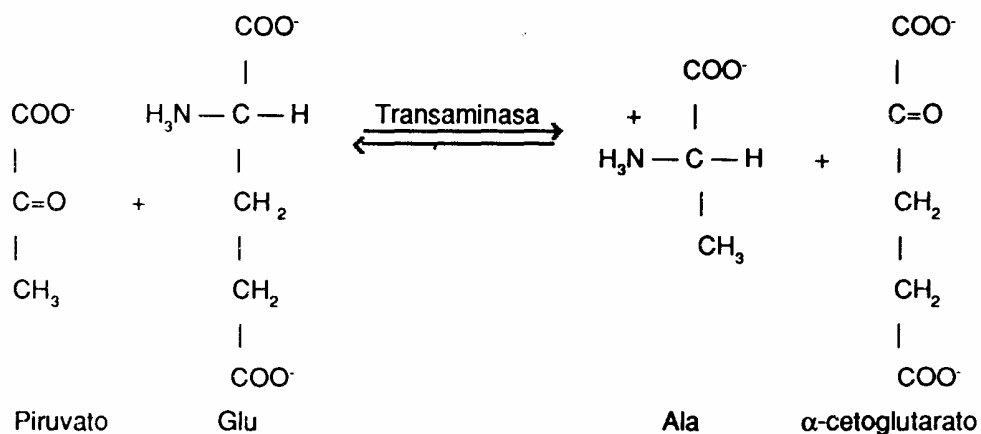
Tabla 19: Clasificación de los AA esenciales o no, en humanos

Dada la particularidad de rutas existentes para la biosíntesis de cada aminoácido, es muy difícil generalizar. En principio las rutas son más sencillas para los aminoácidos no esenciales que para los esenciales; además, la biosíntesis de estos últimos esta regulada casi siempre por mecanismos de retroinhibición bastante eficientes.

Para ilustrar lo anterior consideramos la síntesis de algunos aminoácidos no esenciales y la de dos esenciales.

El Glu, Asp y Ala se sintetizan a partir de los α -cetoácidos correspondientes, que se encuentran en a célula como intermediarios del ciclo de Krebs por reacciones de transaminación o de aminación inversas a las que ocurren en su catabolismo.

En el caso de la Ala, la reacción es la siguiente:



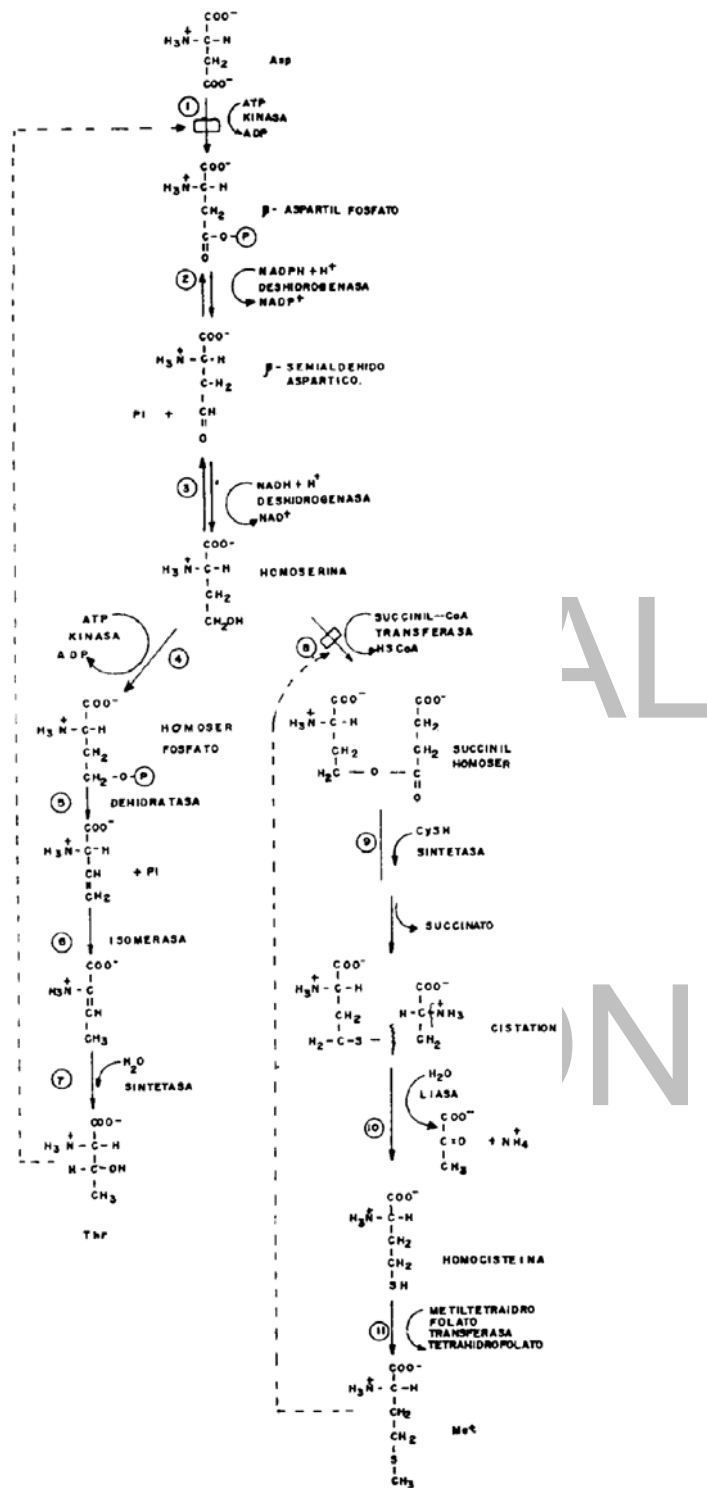
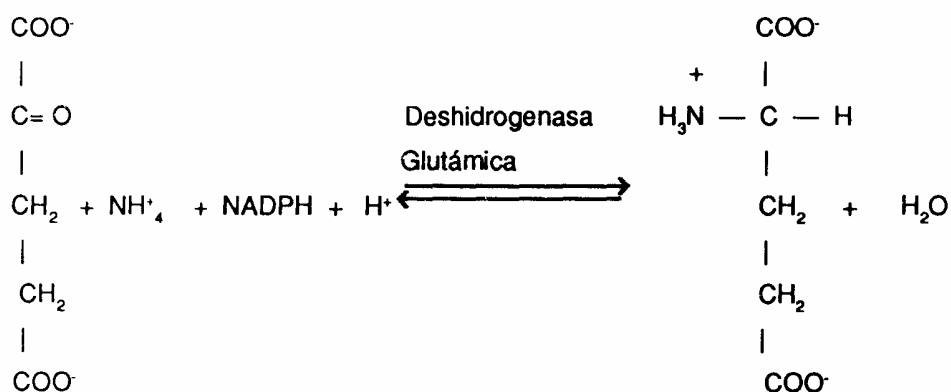
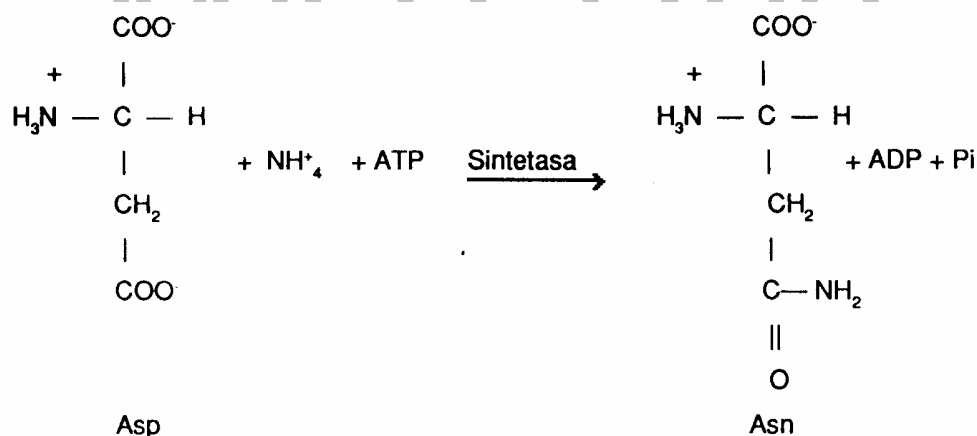


Figura 65: Biosíntesis de Thr y Met

El ácido glutámico se sintetiza por una reacción que transfiere el NH_4 sobre el α -cetoglutarato y es catalizada por una deshidrogenasa que emplea como coenzima el NADPH.



La Asn y Gln se forman por acción de sintetasa que incorporan NH_4^+ a los aminoácidos respectivos (Asp, Glu) consumiendo energía; en el caso de Asn, la reacción es:



En contraste con las biosíntesis anteriores, que sólo involucran una a dos reacciones, la formación de Met o de Thr ocurre a través de una vía compleja (figura 65) que ilustra muy bien algunas de las características de la biosíntesis de los aminoácidos esenciales.

Se puede apreciar que en la biosíntesis de Thr y Met se realiza a partir de Asp por medio de varias reacciones comunes, lo cual no es frecuente en la biosíntesis de aminoácidos, (1 a 3) que producen homoserina, punto en el cual cada vía transcurre por caminos diferentes.

La biosíntesis de Thr es algo más sencilla (reacciones 4 a 7) y el producto final (Thr) actúa como un inhibidor reversible de la primera reacción de la vía, cuando se sintetiza más Thr de la necesaria; este tipo de inhibición se conoce como retroinhibición y es un excelente ejemplo que ilustra el principio metabólico de una

máxima economía ya que al bloquearse la primera reacción no se sintetizan metabolitos intermediarios innecesarios.

La biosíntesis de Metionina requiere la presencia de cisteína (reacción 9) para formar el cistation que se rompe (en los sitios indicados por las líneas curvas) por acción de una liasa (10) y nos da homocisteína, piruvato y NH_4^+ .

La homocisteína sufre una metilación, catalizada por una transferasa (11) que emplea como coenzima el metiltetrahidrofolato, formándose la metionina; este aminoácido regula su propia biosíntesis por un mecanismo de retroinhibición que bloquea la reacción de la homoserina con Succinil-CoA (reacción 8).

La biosíntesis de aminoácidos con anillos en su cadena lateral (His, Phe, Trp) es aún más compleja y produce, en el caso del Trp, metabolitos que sirven como intermediarios en la síntesis de productos secundarios (ligninas) en plantas.

Actividad 9

1. Esquematice el camino recorrido por el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ de los aminoácidos durante su metabolismo. No es necesario escribir la secuencia de reacciones que tienen lugar durante el proceso.
2. Analizando el ciclo de la urea, señale los principios generales del metabolismo que usted pueda reconocer.
3. Ilustre sobre el ciclo de Krebs cuáles son los puntos de entrada de los productos del catabolismo de los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Esquematice el ciclo de Krebs empleando los nombres (no las estructuras) de sus intermediarios.
4. Explique por qué el organismo debe eliminar el NH_4 producido durante el catabolismo de los aminoácidos. ¿Cuáles diferencias existen entre los distintos organismos respecto al mecanismo de excreción?
5. Ilustre las reacciones por las cuales se biosintetizan el Asp y el Glu. Recuerde cómo se sintetiza la Ala y establezca las analogías correspondientes.
6. Ilustre cómo se sintetiza Gln. Recuerde la biosíntesis de Asn y deduzca las reacciones que tienen lugar.
7. Revise la biosíntesis de Thr y Met como un ejemplo de biosíntesis de los aminoácidos esenciales.

Autoevaluación No. 18

1. Ilustre por medio de reacciones generales, las principales vías degradativas de los grupos α -NH₂ y α -COOH de los aminoácidos.
2. Esquematice la convergencia de los esqueletos carbonados de los aminoácidos en el ciclo de Krebs.
3. Esquematice cómo se realiza el ciclo de la urea. ¿Por qué es importante esta vía?
4. Explique en qué se basa la clasificación de los aminoácidos en esenciales y no esenciales. Señale las diferencias existentes a este respecto entre los diversos organismos.
5. Demuestre con las reacciones apropiadas, cómo se sintetizan Glu, Asn y Ala.
6. Explique cómo opera la retroinhibición. ¿Cuál es su importancia?

Lecturas recomendadas

Usted puede profundizar algunos aspectos tratados en este capítulo consultando las siguientes referencias:

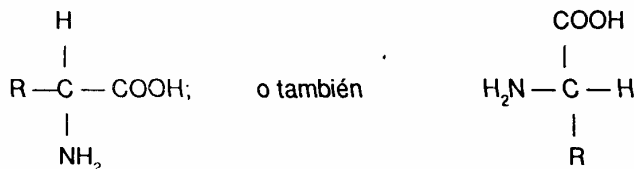
1. Aminoacid biosynthesis and its regulation / H.E. Umbarger.- - Annual Review In Biochemistry.- - Vol 47, 1978.- - p533-606.
2. Regulation of aminoacid metabolism / H.E. Umbarger. - - Annual Review In Biochemistry. - - Vol 38, 1969.- - p323-370.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

INFORMACIÓN DE RETORNO

Autoevaluación No. 1

1.

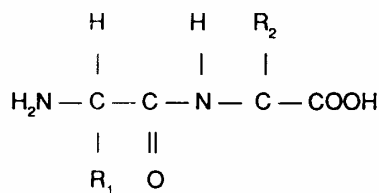


Características:

- alfa-aminoácidos.
- ópticamente activos.
- configuración L.

2. a) (5); b) (6); c) (1); d) (5); e) (2); f) (3); g) (1).

4. Es un enlace amida, formado entre el grupo α -amino de un aminoácido y el grupo α -carboxilo de otro aminoácido. Se representa así:



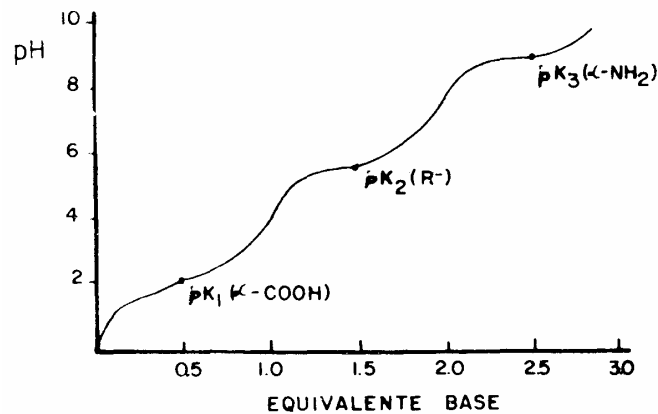
5. a) (2); b) (1); c) (4); d) (3).

Autoevaluación No.2

1.

Grupos	Ejemplos
a) Aminoácidos no polares	Valina, Leucina, Alanina, Triptófano, Isoleucina, Fenilalanina, Metionina.
b) Aminoácidos polares	Glicina, Serina, Treonina, Cisteina, Tirosina, Asparagina, Glutamina.
c) Aminoácidos ácidos	Glutámico $pK_a = 4.2$ Aspártico $pK_a = 3.9$
d) Aminoácidos básicos	Lisina $pK_a = 10.5$ Histidina $pK_a = 6.0$ Arginina $pK_a = 12.5$

2. Curva de disociación.



Se observa que presenta una zona en la región de pH 6,0 donde cambia muy poco el pH al adicionar base.

6.

Actividad	Ejemplo Péptido
Hormonal	Oxitocina, vasopresina, ACTH
Antibiótico	Penicilina, Gramicidina
Hipertensora	Angiotensinas
Hipotensoras	Bradikinas
Oxido-reductora	Glutación

Autoevaluación No. 3

1.
 - a) Fibrosas y Globulares
 - b) Simples y Conjugadas
2.
 - Primaria
 - Secundaria
 - Terciaria
 - Cuaternaria (presente sólo en algunas proteínas)
3.
 - Óptimamente activas por estar constituidas por AA que gozan de esta propiedad.
 - Solubles en solventes acuosos en función de su composición en AA, del pH de la solución, de la temperatura y de la eventual presencia de solventes orgánicos.
 - Desnaturalizables con valores extremos de pH o temperatura, presentándose insolubilización.
 - Anfóteras.
- 4.

- a) El grupo α -NH₂ de los AA reacciona con dos moléculas de Ninhidrina para dar un complejo púrpura. Se determinan AA libres y oligopéptidos.
- b) Se forma un complejo de coordinación entre el Cu⁺² en medio básico y los enlaces peptídicos, se determinan péptidos con más de tres enlaces peptídicos y proteínas.

Autoevaluación No. 4

5.

Proteína	Organización Estructural	Clasificación	Función
Insulina	Estructura 1 ^a , 2 ^a y 3 ^a .	Proteína globular	Hormona
Fibroma	Estructura 1 ^a , 2 ^a , y 3 ^a .	Proteína fibrosa	Estructural
Hemoglobina	Estructura 1 ^a , 2 ^a , 3 ^a y 4 ^a .	Proteína globular	Transporte de O ₂
Colágeno	Estructura. 1 ^a , 2 ^a , y 3 ^a .	Proteína fibrosa	Estructural
Queratina	Estructura 1 ^a , 2 ^a y 3 ^a .	Proteína fibrosa	Estructural

8.

Los cambios extremos en los factores que afectan la solubilidad (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica).
 Presencia de metales pesados (Hg⁺², Pb⁺², Ag⁺¹).
 Detergentes.

Autoevaluación No.5

3.

b) $\Delta G = \Delta G^\circ + RT \cdot \ln K$

En el equilibrio $\Delta G = 0$, luego $\Delta G^\circ = - RT \ln K$.

4.

- a. Disminuyen la energía de activación necesaria para que tenga lugar una reacción.
- b. Incrementan notablemente la velocidad de la reacción.
- c. En el caso de reacciones en equilibrio:
 - Aumentan la velocidad con que se alcanza el equilibrio.
 - No cambian el valor de la constante de equilibrio (K).

Para una ampliación consulte. Físicoquímica / Luis Evaristo Ayuso Martínez.- - Bogotá : Unisur, 1989.- - p.464-467.

6. Consulte el capítulo 6 de este módulo.

Autoevaluación No.6

6. Resuma las características de las inhibiciones competitiva, no competitiva e incompetitiva y sus respectivas representaciones gráficas.

7.

Sitios Activos	Enzima
a. Proteasas a Ser con sistema relay Ser, His, Asp.	Quimotripsina, tripsina, trombina
b. Metaloenzimas	Carboxipeptidasa (Zn^{+2} en el sitio activo)
c. Glicosidasas con Asp, Glu	Lisozima
d. d. Proteasas con CySH	Papaina

Autoevaluación No. 7

6. Consulte el glosario de términos de este módulo y las páginas 112 y siguientes de este capítulo.

7. Consulte el capítulo 2 de este módulo.

Autoevaluación No. 8

1. Consulte la tabla 13.

2.

a) con 6.

b) con 5.

c) con 1.

d) con 5.

e) con 3 y 4.

f) con 2.

g) con 3 y 4.

3.

1 con a, b y d.

2 con b.

3 con e.

4 con a.

5 con a, b, c, e.

4. Revise y compare las figuras 28 y 31.

5. Analice la figura 30.

Autoevaluación No. 9

3. La ecuación es:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \cdot \ln K$$

en el equilibrio $\Delta G = 0$ luego

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \text{ o sea } \Delta G^0 = -2,303 RT \cdot \log K$$

4. $\Delta G = -nF \cdot \Delta E$

Donde:

- n = número de electrones transferidos.
- F = faradays involucrados en la reacción.
- ΔE = diferencia de potenciales de reducción.

Autoevaluación No. 10

2.

- a. Requerimientos energéticos.
- b. Condiciones reguladoras de la actividad enzimática.
- c. Enzimas reguladoras.
- d. Control genético.
- e. Actividad hormonal.

8. La reacción a. porque:

- El PTG del 1,3-DP-Glicerato - 3-P-Glicerato es mayor que el del par ATP-ADP (ver tabla 14).
- El receptor del es el ADP (forma defosforilada).
- Hay un donador y un receptor de e⁻ del mismo lado de la reacción.

Autoevaluación No. 11

- 1. Consulte el capítulo 5. Introducción al metabolismo y bioenergética de este módulo.
- 8. Consulte el capítulo 5. Introducción al metabolismo y bioenergética de este módulo

Autoevaluación No. 12

1.

Vía catabólica	Localización celular	Metabolitos Iniciales	Metabolitos Finales	Metabolitos Conectores	Balance (No. ATP).
Glicólisis	Citoplasma	Monosacáridos Disacáridos Polisacáridos	Piruvato o Etanol + CO ₂ o Lactato	3P Gal 3 PDHA Glc-6-P Piruvato	Producción 2 ATP por Glucosa Oxidada.
Ciclo Krebs	Mitocondria	Piruvato	CO ₂ NADH + H ⁺ FADH ₂	Casi todos. Ejemplo: Oxalacetato Malonato, Succinato α- cetoglutarato	Producción 1 ATP por Piruvato Oxidado.
Fosforilación oxidativa	Mitocondria	NADH + H ⁺ FADH ₂	H ₂ O NAD ⁺ FAD	Coenzimas, sustratos a ser oxidados	Producción 3 ATP por par de e ⁻ transferidos

					desde NADH + H ⁺
Pentosas fosfato	Citoplasma	Glc-6-P	CO ₂ + Glc-6-P NADPH + H ⁺	Ribosa-5-P 3P Gal, Eritrosa-4-P Frc-6-P	Nulo.
Glicerol-3-P	Citoplasma y Mitocondria	NADH + H ⁺ (Cit) 3 P Gal	NAD ⁻ (Cit)	3P Gal 3PDHA Glicerol-3-P	Nulo en la vía.

Cit = citoplasmático

2. La oxidación de un metabolito está acompañada con la producción de compuestos ricos en energía.

3. Entre las respuestas posibles tenemos:

- Los glúcidos fosforilados no atraviesan la membrana celular; por ello los intermediarios de la glicólisis están confinados en el citoplasma y se mantiene la integridad de la vía.
- El NAD y NADP citoplasmáticos (oxidados o reducidos) no atraviesan la membrana mitocondrial; por eso para su reoxidación debe emplearse la vía del glicerol-3-fosfato.
- Las coenzimas presentes al interior de la mitocondria no pueden salir al citoplasma. La consecuencia es que su reoxidación debe hacerse por medio de la fosforilación oxidativa.
- En la vía del glicerol-3-P éste penetra a la mitocondria mientras que la 3-P-DHA no lo hace; inversamente la 3-P-DHA sale al citoplasma mientras que el glicerol-3-P no. Esta situación posibilita la producción del FADH mitocondrial en la oxidación de glicerol-3-P a 3-P-DHA.

4.

Universalidad: Glicólisis y Pentosas fosfato > Krebs, F.O. Glicerol.

Producción metabolitos comunes: Krebs- Glicólisis- pentosas fosfato.

Capacidad producción ATP: F.O.- Glicólisis-Krebs.

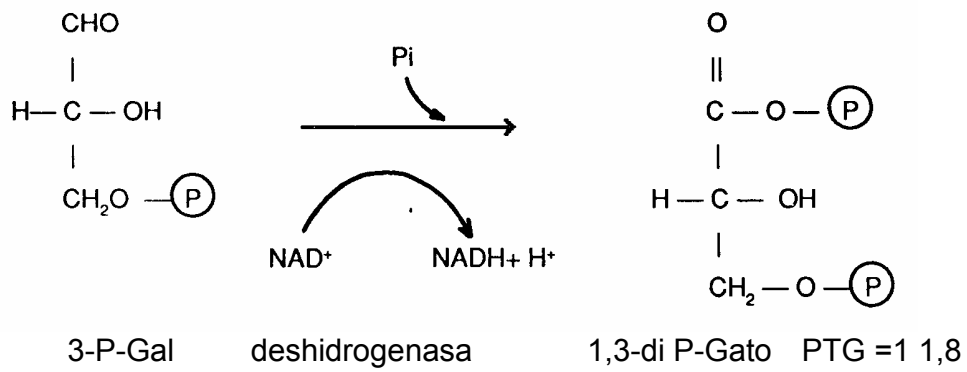
Complejidad: Krebs, las restantes son similares en complejidad salvo la vía del Glicerol-3-P que es muy sencilla.

7. Fosforilación a nivel de sustrato: El ATP no se produce como consecuencia de la reoxidación de NADH + H⁺ o de FADH₂. Ejemplos: Succinil-CoA → Succinato: Ciclo de Krebs: figura 42. PEP → Piruvato: Glicólisis: figura 39.

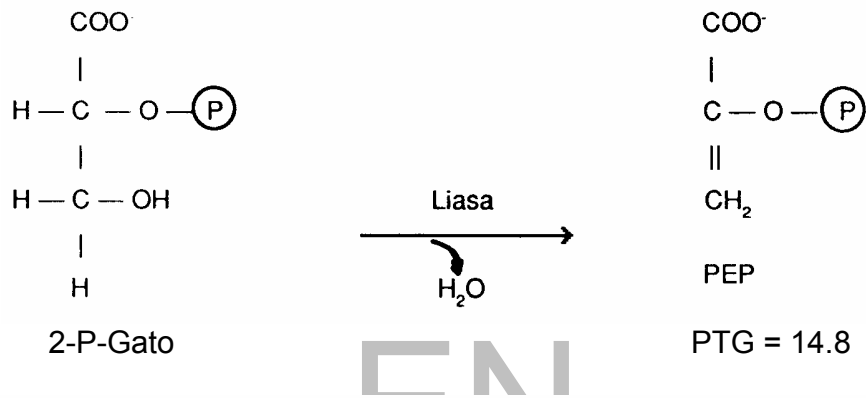
Autoevaluación No. 13

1. Las respuestas posibles serían:

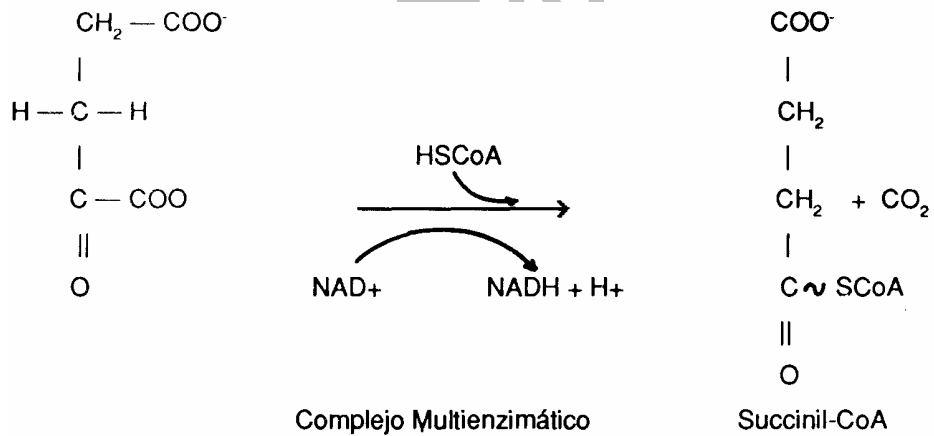
a.

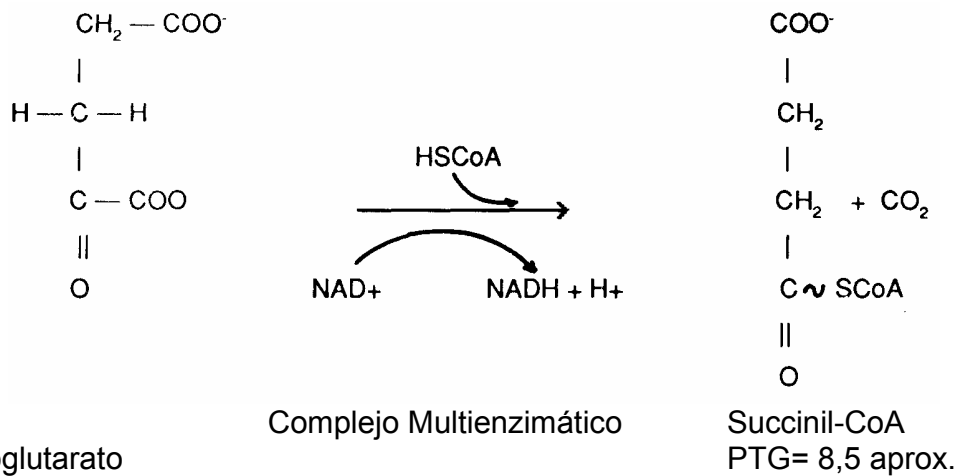


b.



c.





La respuesta es correcta con o sin las fórmulas de los compuestos.

2.

- a. Oxidación de piruvato hasta CO_2 y H_2O , producción $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 .
- b. Degradación de hexosas y producción de $\text{NADPH} + \text{H}^+$.
- c. Reoxidación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ citoplasmático.
- d. Oxidación anaerobia de glucosa con producción de ATP.
- e. Reoxidación de coenzimas reducidas con producción de ATP.

3.

- a. Oxidación-reducción: glicólisis, ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, glicerol-3-fosfato.
- b. Descarboxilación o transferencia: ciclo de Krebs, pentosas fosfato.
- c. Transferencia de grupos: ciclo de Krebs.
- d. Oxidación-reducción: ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, Glicerol-3-fosfato.
- e. Oxidación-reducción: biosíntesis.
- f. Oxidación-reducción: fosforilación oxidativa.

4. Consulte el capítulo 6.

5. Consulte la figura 42.

6. Consulte el capítulo 6.

Autoevaluación No. 14

2.

- a. La formación de PEP a partir de piruvato en la gluconeogénesis. Se consumen dos enlaces ricos en energía por un enlace formado.
- b. El paso de piruvato a oxalacetato en la glucogénesis. La enzima reguladora está modulada por la presencia de acetil en forma de Acetil-CoA.

4. Tenga en cuenta los siguientes aspectos:
 - a. Ordenamiento de los transportadores de e⁻.
 - b. Requerimientos para producción de ATP.
 - c. Dirección del transporte de e⁻.
 - d. Propiedades de las membranas respectivas.
 - e. Mecanismo quimiosmótico.

7. Analice las figuras 39, 42, 47, 48, 52 y 53.

Autoevaluación No. 15

2. Consulte el capítulo 6 de este módulo.

3. Consulte el capítulo 6 de este módulo.

5.

- a. Ácidos palmítico (C16), esteárico, (C18).
- b. Ácidos palmitoleicos (C16, 9-10) y oleico (C18, 9-10).
- c. Ácidos linoleico (C18, 9-10, M2,13) y linolénico (C18, A9-10, M2-13, &15-16).

6. Consulte el capítulo 6 de este módulo.

Autoevaluación No. 16

1. Consulte la figura 54.

2. Consulte la figura 56.

3. Consulte las figuras 54 y 56.

4. Consulte la figura 58.

5. Consulte la figura 60.

Autoevaluación No. 17

1.

1. con d)
2. con b) y con f)
3. con ninguno
4. con g) y con c)
5. con d)
6. con h)
7. con 1)
8. con e)

2. Consulte el capítulo 1 de este módulo.

3. Consulte el capítulo 7 de este módulo.

4. Consulte el capítulo 6 de este módulo.

6. En la vía de fosfatos de pentosa y en la fotosíntesis. Es una coenzima de deshidrogenasa que frecuentemente catalizan oxido-reducciones en vías biosintéticas

Autoevaluación No. 18

3. Consulte la figura 64.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

GUÍAS PARA PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

INTRODUCCIÓN

Una de las asignaturas fundamentales que se incluyen en el currículo de formación de un buen ingeniero de alimentos es la Bioquímica ya que le permite comprender los mecanismos de formación y transformación de los nutrientes que componen un determinado alimento. Por esta razón esta asignatura es teórico-práctica; el presente manual de laboratorio contiene una serie de experimentos básicos que complementan los conceptos fundamentales ya tratados en la teoría.

Se han incluido prácticas que le permiten conocer y aplicar técnicas como las de fraccionamiento de un tejido animal en sus componentes principales como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, comparar métodos comunes de determinación de proteínas como son el de Kjeldahl y el de Biuret; utilizar la espectrofotometría visible en la cuantificación de vitaminas en alimentos y en la caracterización de la actividad catalítica de una enzima o detectar factores antinutricionales presentes en las leguminosas.

El trabajo de laboratorio utiliza como materiales de experimentación, materias primas de uso común en el campo de la tecnología de alimentos como harinas de cereales y leguminosas, féculas, frutas y verduras, tejidos de origen animal, que ayudan al estudiante a asimilar las técnicas de uso común en la investigación bioquímica con fuentes alimenticias o potencialmente alimenticias.

La investigación no es completa sino se divulgan los resultados obtenidos en la experiencia. Es importante que el estudiante aprenda la forma de reportar sus datos y a saber interpretar las conclusiones obtenidas por otros investigadores, con el fin de evaluar su propia investigación; esto hace necesario que elabore un informe donde presente sus datos, resultados y conclusiones obtenidos durante el trabajo experimental.

PRÁCTICA No. 1: Fraccionamiento de tejidos en sus principales constituyentes: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos

Objetivos

- Utilizar las técnicas de solubilidad diferencial y de centrifugación en el fraccionamiento de un tejido animal en sus principales constituyentes.
- Comparar los tejidos tratados de acuerdo con sus componentes principales.

1 Fundamento teórico

Debido a las diferencias químicas que existen entre las moléculas de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, éstas presentan diferente solubilidad en solventes orgánicos y además en ácidos semejantes al tricloroacético (ATA) de acuerdo con la temperatura. Es posible entonces utilizar tales solubilidades diferenciales para separarlos, una vez que los tejidos han sido triturados y se han roto sus membranas.

1.1 Acción del ácido tricloroacético a baja temperatura

1.1.1 Sobre carbohidratos

A baja temperatura los monosacáridos son estables en medio ácido, mientras que si se tratan en caliente, sufren deshidratación produciéndose los furfurales.

Los polisacáridos en medio ácido sufren hidrólisis del enlace glicosídico, reacción que aumenta su velocidad a medida que se eleva la temperatura. A temperaturas inferiores a 4°C, la velocidad de hidrólisis es tan lenta que para fines prácticos se considera que no ocurre reacción.

En general se puede decir que los carbohidratos son solubles en solución de ácido tricloroacético al 20% a temperaturas inferiores a 4°C y que no sufren cambios químicos en estas condiciones.

1.1.2 Sobre lípidos

Según sus propiedades fisicoquímicas, estos compuestos son poco solubles en soluciones acuosas y no son extraídos si se trata el tejido con soluciones acuosas de ácido tricloroacético.

1.1.3. Sobre proteínas

Forman sales insolubles en ácidos como tricloroacético o perclórico, por tanto no son solubles en soluciones de ácido tricloroacético al 20% en frío.

1.1.4 Sobre ácidos nucleicos

Lo mismo que las proteínas, estos ácidos son insolubles en soluciones frías de ácido tricloroacético. Por otra parte el ácido deoxirribonucleico (DNA) está unido a histonas, lo cual lo hace más insoluble en estas condiciones.

En conclusión, al tratar un tejido previamente triturado con ácido tricloroacético al 20% y a 4°C y someter a centrifugación la suspensión resultante, en el sobrenadante se obtienen los azúcares, mientras que los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos quedan en el residuo.

1.2 Acción del etanol-éter-cloroformo (2: 2: 1 v/v)

Si el residuo de la extracción con ácido tricloroacético a 4°C, se trata con solución de etanol-éter-cloroformo, al solvente solo pasan los lípidos, mientras que las proteínas y los ácidos nucleicos quedan en la fase sólida.

1.3 Acción del cloruro de sodio al 10% en caliente

Si el residuo anterior se suspende en una solución de NaCl al 10% y se calienta en baño maría (92°C) durante 40 minutos, se desnaturalizan las proteínas, en tanto que los ácidos nucleicos, principalmente el ribonucleico (RNA), quedan en solución. Por este procedimiento es posible separar las proteínas de los ácidos nucleicos. Si al sobre nadante se le agrega ahora etanol absoluto en un volumen igual al doble de la solución original y se enfría en baño de hielo durante 10 minutos, se obtiene un precipitado que puede ser separado por centrifugación y que contiene los ácidos nucleicos.

2 Reactivos

ATA al 10%

Etanol del 95%

NaCl al 10%

Tejidos: hígado, corazón, páncreas de un animal utilizado en el trabajo experimental.

Arena lavada

etanol éter cloroformo (2: 2:1)

3 Procedimiento

Cada grupo hará el fraccionamiento químico sobre un tejido determinado. Para comparar los diferentes tejidos desde el punto de vista del contenido de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, deberá confrontar sus resultados con los obtenidos por los otros grupos.

NOTA: Las diferentes fracciones obtenidas en esta práctica, deben guardarse para la siguiente sesión de laboratorio.

A cada grupo se le entregará una muestra de tejido en ATA al 10% con los siguientes datos:

- peso del tejido.
- origen del tejido.
- ATA al 10% adicionado (1,5 ml/g de tejido).

Este tejido se tratará conforme al diagrama esquemático del método para fraccionar un tejido en sus constituyentes que se encuentra en la siguiente página. Cada grupo recibirá cinco frascos donde guardará y marcará adecuadamente cada fracción que obtenga.

Cuando tenga que evaporar las fracciones, lo hará en una plancha de calentamiento sobre una malla de asbesto; para secar, debe utilizar la estufa.

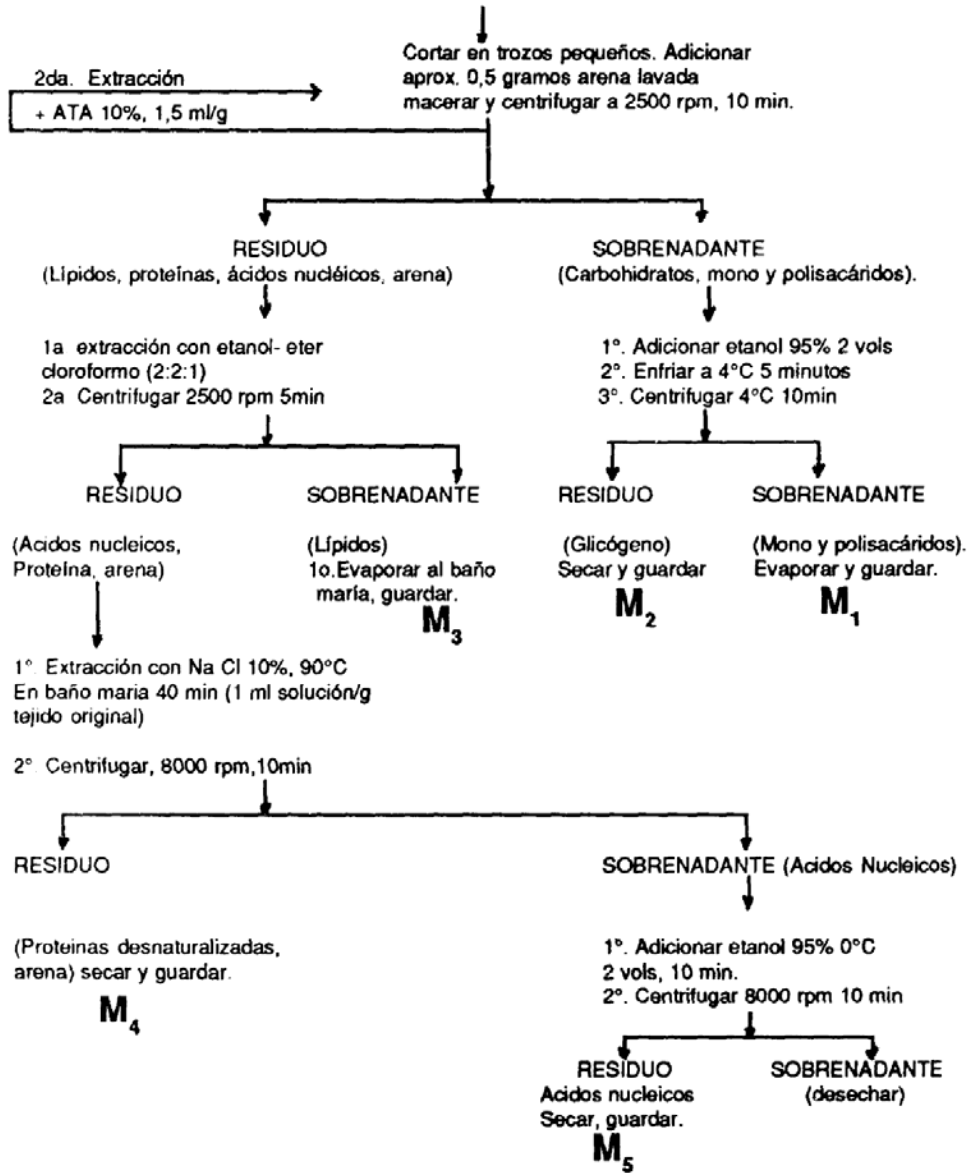
4 Expresión de resultados

Compare sus resultados con los obtenidos por los demás grupos y con los datos bibliográficos. De acuerdo con la función fisiológica y con los resultados, diga cuáles son los tejidos que cualitativamente contienen más proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Cuestionario

1. ¿Por qué se recomienda mantener los tejidos que se fraccionan a baja temperatura?
2. ¿Qué sucede al contenido celular si la temperatura a que se mantiene es de 37°C?
3. ¿Cuál es el fundamento de la centrifugación? Haga una explicación breve de los principios.

TEJIDO A 0° C



PRÁCTICA No. 2: Caracterización de las fracciones obtenidas a partir de diferentes tejidos

Objetivo

Investigar la presencia de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en las fracciones obtenidas de diferentes tejidos del animal empleado, utilizando para ello reacciones características para cada uno de los componentes anteriores.

1 Fundamento teórico

1.1 Carbohidratos

Los organismos vivos contienen carbohidratos que pueden estar formando polisacáridos de reserva, pueden ser componentes estructurales o pueden estar participando en el metabolismo en forma monomérica.

Las propiedades químicas de tales compuestos permiten diferenciarlos, así:

- Los polisacáridos son solubles en soluciones acuosas ácidas, pero insolubles en etanol.
- Los polisacáridos como el almidón, el glicógeno y los dextranos, forman compuestos coloreados característicos cuando se combinan con yodo molecular.

A pesar de que la naturaleza de estos complejos no está bien definida, la evidencia disponible indica a formación de complejos de absorción entre las cadenas helicoidales del polisacárido y el yodo. Para que haya estructura helicoidal se necesita por lo menos una cadena con ocho unidades de monosacárido.

Los polisacáridos que a todo lo largo de su molécula muestran estructura helicoidal, dan coloración azul intensa, ej. la amilosa. Aquellos que son ramificados con hélices interrumpidas, producen coloraciones menos intensas, ej. la amilopectina. Los altamente ramificados con segmentos cortos de ramificación, producen color pardo o rojizo, ej. el glicógeno.

1.1.1 Reacción de Molisch

Un azúcar tratado con α -naftol y ácido sulfúrico concentrado, produce una coloración violeta. Se presume que el ácido sulfúrico actúa como deshidratante formando derivados del tipo de los furfurales que reaccionan con el α -naftol para dar productos coloreados.

1.1.2 Reacción de Benedict

Azúcares reductores tratados con solución alcalina suave (citrato-carbonato de sodio) de ión cúprico, lo reducen a óxido cuproso de color ladrillo.

1.2 Lípidos

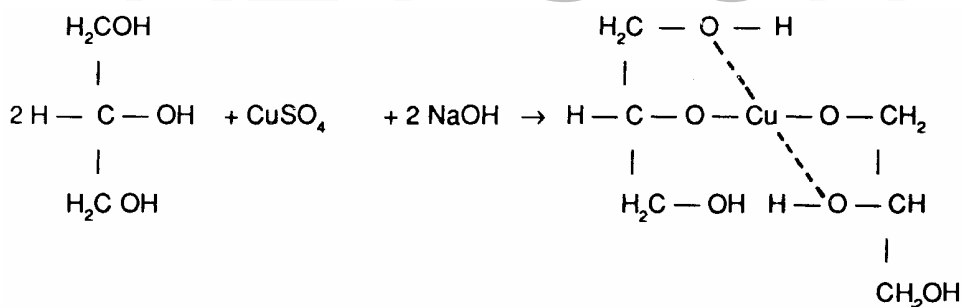
En cuanto a solubilidad, los lípidos son insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos.

Los triglicéridos forman un complejo coloreado (vino tinto) con el ácido hidroxámico y el hierro en medio ácido y oxidante.

Los hidroxiesteroides con insaturación en la posición 5 reaccionan con el anhídrido acético para dar ésteres, que en medio sulfúrico se deshidratan produciendo una coloración verde.

Los fosfolípidos por acción del NaOH se hidrolizan produciendo fosfatos inorgánicos, que con el ácido molibdico dan fosfomolibdato y estos, por acción de reductores como el ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico o el ácido ascórbico, producen complejos de óxidos de molibdeno de color azul.

Si los jabones resultantes de la hidrólisis alcalina se someten a la acción del éter, los jabones se sedimentan y en el sobrenadante queda el glicerol. Los compuestos que en su estructura tienen grupos ($> \text{CHOH}$)_n forman complejos con iones metálicos como el Cu^{+2} por tanto si el sobrenadante anterior se evapora al baño de maría el residuo se disuelve en agua caliente y se acidifica con HCl; si los jabones no se habían separado totalmente, los ácidos grasos de estos se separan en una capa insoluble en agua. Después de evaporar la capa acuosa, el residuo se disuelve en etanol y por la adición de solución de sulfato de cobre se formará un quelato de cobre de color verde, luego de agregar NaOH 0.1 N.



1.3 Ácidos nucleicos

1.3.1 Hidrólisis

Los álcalis diluidos (0.3 a 1.0 N) hidrolizan los enlaces éster del ácido ribonucleico. En cambio los enlaces éster del ácido deoxirribonucleico son relativamente estables, lo mismo que los enlaces N-glicosídicos de DNA y RNA. La facilidad de hidrólisis en el RNA parece estar asociada a la presencia de hidroxilos en los carbonos 2' y 3', lo cual permite la formación de intermedios cíclicos 2', 3'-fosfonucleótidos, que finalmente dan los complejos monofosfonucleótidos- 2' o 3'. Como la deoxirribosa del DNA no forma tales intermediarios, es relativamente estable en presencia de álcali diluido. La acidificación de la solución después del tratamiento alcalino precipita las moléculas de DNA intactas.

Los nucleótidos obtenidos en la hidrólisis anterior fluorescen a la luz ultravioleta.

1.3.2 Con orcinol

Los nucleótidos del RNA, debido a la presencia de ribosa, reaccionan con el reactivo ácido de orcinol (cloruro férrico en HCl concentrado + solución alcohólica de orcinol), dando coloración verdosa.

1.4 Proteínas

1.4.1 Desnaturalización

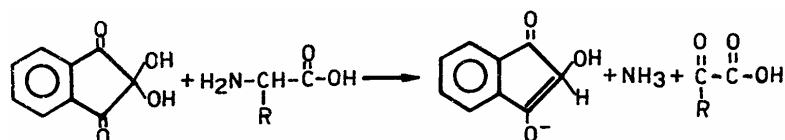
Por acción de pHs extremos se destruyen los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura secundaria de las proteínas. Las proteínas a temperaturas mayores de 50°C precipitan, por formación de agregados que resultan de la destrucción de la estructura secundaria y terciaria.

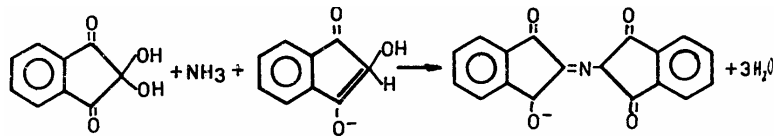
1.4.2 Millon

Las proteínas que contienen tirosina reaccionan con mercurio disuelto en ácido nítrico, produciendo nitroderivados mercuriales de color rojo.

1.4.3 Ninhidrina

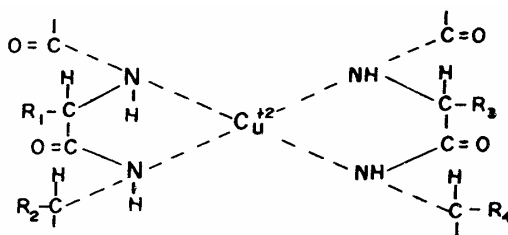
Los grupos amino terminales de las proteínas reaccionan con la ninhidrina en caliente, dando complejos de color violeta. En ellos, el amoníaco desprendido reacciona con una molécula de ninhidrina en estado oxidado y con otra en estado reducido.





1.4.4 Biuret

Los nitrógenos del enlace peptídico forman complejos coloreados con los iones cúpricos en medio alcalino.



1.4.5 Reacción Xantoproteica

Esta reacción se basa en la nitración del anillo bencénico por el HNO_3 concentrado, dando derivados amarillos de nitrobenzeno. Las proteínas que contienen tirosina y triptófano dan esta reacción, pero el color amarillo resultante se transforma en naranja si se le adiciona NH_4OH . Para nitrar la fenilalanina se requiere H_2SO_4 como catalizador.

2 Reactivos

Etanol	FeCl_3 al 5%
HCl 2N	Cloroformo
Solución de lugol	Anhídrido acético
Reactivo de Molisch	AcOH 10%. Fenolftaleína
Ácido sulfúrico concentrado	Ácido molíbdico
Reactivo de Benedict	Ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico
Éter etílico	o ácido ascórbico (150 mg/100 ml)
NaOH al 15% y 50%	Bencidina al 4% en ác. acético
Hidroxilamina al 10%	Triglicéridos
KOH 2N	Colesterol
Reactivo de Millon	Lecitina
Ninhidrina al 0.2%	Albumina
Reactivo de Biuret	Reineckato de amonio al 2% en etanol
Ácido nítrico concentrado	Glicina
Hidróxido de amonio concentrado	Tirosina
Almidón	Solución de pentosa
Glucosa	

3 Procedimiento

Con las muestras M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5 obtenidas en la práctica anterior, se harán las siguientes pruebas de caracterización.

3.1 Carbohidratos

Muestras M_1 , M_2 y patrones de mono y polisacáridos.

3.1.1 Lugol

A una fracción de cada una de las muestras agregarles 3 gotas de solución de Lugol. Observar las coloraciones. A otras porciones iguales de estos compuestos, adiciónales 1 ml de HCl 2N y colocarlos al baño maría durante 25 minutos. Dejar enfriar y agregarles nuevamente Lugol. Obsérvese los resultados y explíquelos en el informe.

3.1.2 Molisch

A una nueva fracción de los compuestos anteriores, agrégueles 1 ml de agua destilada, 2 gotas de reactivo de Molisch. Mezcle cuidadosamente y con los tubos inclinados agregue 1 ml de ácido sulfúrico concentrado de manera que se forme una capa de ácido debajo de la fase acuosa. Anote el color del anillo formado en la interfase.

3.1.3 Benedict

Coloque al baño maría durante 2 minutos, fracciones de las muestras y patrones, con 2 ml de solución de Benedict. Observe los resultados y continúe calentando por 15 minutos. De nuevo observe los tubos.

3.2 Lípidos

Muestra M_3 y patrones de lecitina, colesterol y triglicéridos.

3.2.1 Ácidos hidroxámicos

A una fracción de las muestras, agregue 1 ml de hidroxilamina al 10% a la cual se le ha incorporado 0.01% del indicador timolftaleína. Adicione lentamente solución de NaOH al 10% hasta color azul permanente. Caliente en baño maría por 10 minutos, enfríe al chorro y adicione HCl al 10% lentamente y con agitación, hasta desaparición del color azul. Agregue unas 2 gotas del mismo ácido en exceso. Por último adicione 0.5 ml de solución de $FeCl_3$ al 5%. Observe los cambios de coloración que ocurren y anote los resultados.

3.2.2 Prueba de Lieberman-Burchard

Tome una fracción de cada una de las muestras, agrégueles 3 ml de cloroformo, mezcle bien. Agregue después 1 ml de anhídrido acético, agite y adicione con cuidado 3 gotas de ácido sulfúrico, por las paredes del tubo. Observe la coloración en la interfase al minuto y a los 15 minutos. Explique.

3.2.3 Saponificación

A una cantidad análoga a la anterior de las fracciones, agregue 3 ml de NaOH al 15% coloque en la boca del tubo una estera de vidrio y ponga al baño maría durante 20 minutos. Añada 15 ml de éter etílico y filtre los jabones resultantes. Después de la hidrólisis neutralizar con ácido acético al 10% usando fenolftaleína como indicador.

3.2.4 Colina

A 10 ml del filtrado anterior añadir 6 ml de Reineckato de amonio al 2% en etanol y colocarlo en nevera por 30 minutos hasta que cristalice.

3.3 Ácidos nucleicos

Muestra M₅

Tome una tracción de la correspondiente a los ácidos nucleicos, adicione 3 ml de KOH 2 N y coloque en la boca del tubo una esfera de vidrio. Ponga el tubo al baño maría durante 30 minutos. Acidifique la solución con HCl y observe si se forma precipitado. Separe éste por centrifugación.

3.3.1 Pentosas

A 0,5 ml del sobrenadante anterior adicione 0,5 ml de solución de bencidina al 0,4% en ácido acético caliente la solución al baño maría durante 10 minutos, colocando una bola de vidrio en la boca del tubo. Observe la coloración. Repita la experiencia con 0,5 ml de solución patrón de pentosa.

3.3.2 Fosfatos

A 1 ml del mismo sobrenadante acidificado, agregar 1 ml de ácido molibdico, mezcle bien y después de dejar en reposo 10 minutos adicione 0,5 ml de ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico o 1 ml de ácido ascórbico. Observe la coloración.

3.4 Proteínas

Muestra M₄ y patrones de proteína y de aminoácidos.

3.4.1 Millon

A una tracción de la muestra y de los patrones, suspendidas en 1 ml de agua, agregue 3 gotas del reactivo de Millon; caliente durante unos minutos al baño maría; observe el precipitado.

3.4.2 Ninhidrina

A una fracción de la muestra y los patrones agregue 1 ml de la solución de ninhidrina al 0,2%. Caliente al baño maría durante 10 minutos y observe el color.

3.4.3 Biuret

Tome una fracción de la muestra y de los patrones, agregue 1 ml del reactivo de Biuret. Mezcle, espere 10 minutos y observe el color.

3.4.4 Xantoproteica

Caliente una tracción de la muestra y de los patrones con 1 ml de ácido nítrico concentrado, enfríe y observe el color. Agregue cuidadosamente un exceso de hidróxido de amonio concentrado. Observe la interfase.

4 Expresión de resultados

De acuerdo con los resultados, deduzca qué tipo de polisacáridos, aminoácidos en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos están presentes en el tejido.

Cuestionario

1. Explique la reacción con el reactivo de Lugol, de las fracciones de carbohidratos y patrones, antes y después del tratamiento con HCl 2N.
2. ¿Por qué el colesterol no es saponificable?
3. Escriba las reacciones de las diferentes pruebas realizadas en esta práctica.
4. ¿En qué tejidos se almacena el glicógeno? y ¿cuál es su función?
5. Si en su muestra de proteínas están presentes sales de amonio, ¿Cuál de las reacciones de reconocimiento de aminoácidos no se debe usar? Dé sus razones.

PRÁCTICA No. 3: Extracción de la yema de lípidos del huevo

Objetivo

- Extraer y caracterizar los fosfolípidos, colesterol y triglicéridos presentes en la yema de huevo.

1 Fundamento teórico

La separación de los lípidos es extremadamente difícil por extracción con vanos solventes orgánicos puros. Se hace uso de la propiedad que tienen la mayoría de los lípidos de ser solubles en mezclas de etanol: éter o etanol: cloroformo. La yema de huevo contiene buenas cantidades de grasas neutras, lecitinas y colesterol.

Las lecitinas tienen un pH aproximadamente neutro, ya que contienen grupos ácidos (HPO_4^{-2}) y básicos (Colina) formando zwitteriones muy polares. Se dispersan coloidalmente en agua en contraste con las grasas neutras que no se emulsionan. Las lecitinas se precipitan a partir de una solución etérea por adición de acetona y su reconocimiento se basa en un test para saponificación y en un test para Colina. Las esfingomielinas también tienen Colina pero son solubles en éter y se presentan en cantidades despreciables en el huevo crudo.

El colesterol no precipita por tratamiento con acetona de una solución etérea y como no es saponificable después del tratamiento con KOH puede extraerse con éter, en tanto que los triglicéridos se han saponificado dando jabones solubles en agua. Para el reconocimiento del colesterol se aplica el test de Liebermann-Burchard. El colesterol requiere de 15 a 20 minutos para el desarrollo de un color verde profundo, precedido de un color lila.

Se requieren condiciones completamente anhidras para esta reacción.

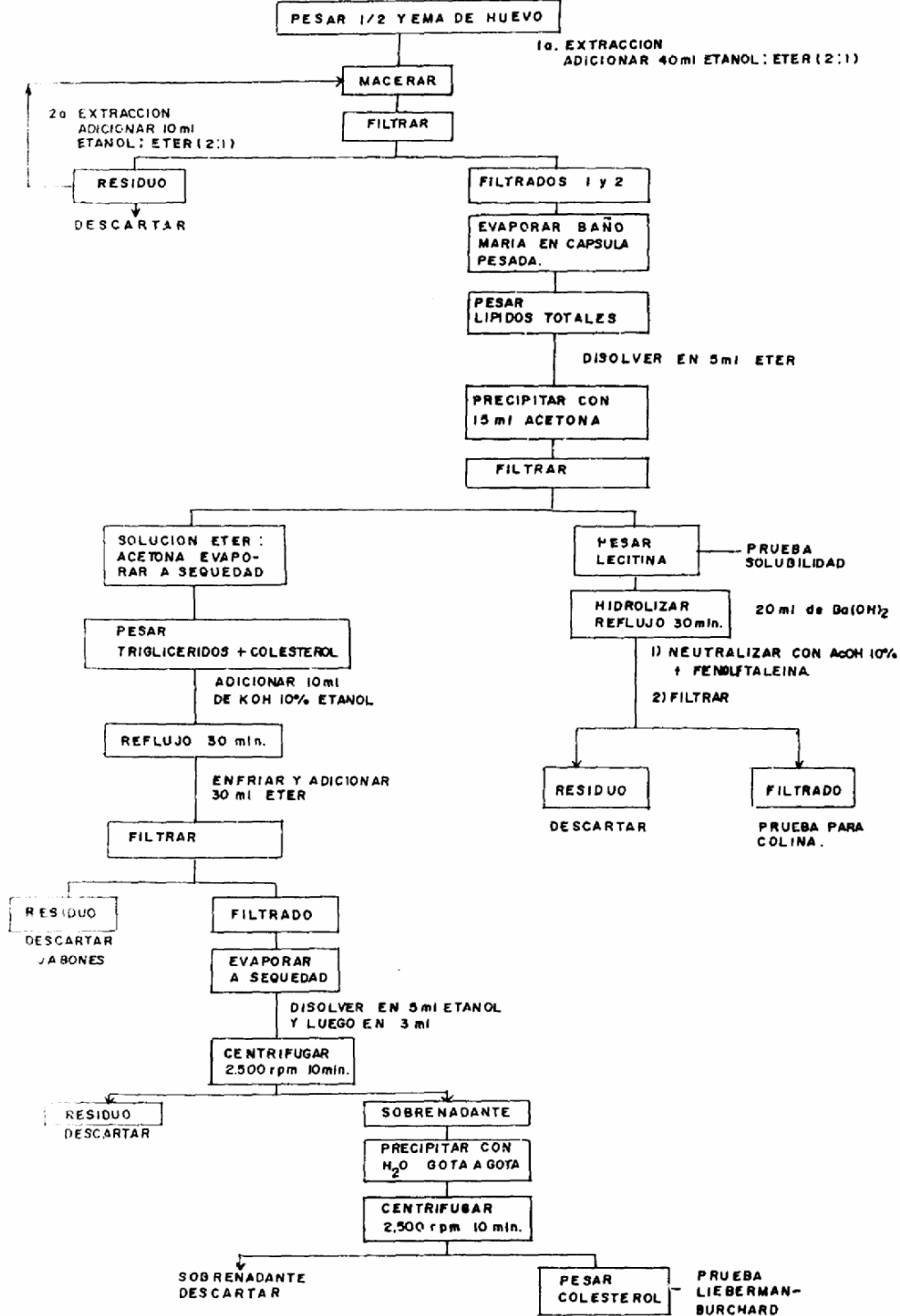
2 Reactivos

Yema de huevo cocida	Fenolftaleína
Mezcla de alcohol-éter (2:1)	Reineckato de amonio 2%
Éter etílico	KOH alcohólico 10%
Acetona	Cloroformo anhidro
Ba(OH) ₂ saturado	Anhídrido acético
Acido acético al 10%	H ₂ SO ₄ concentrado

3. Procedimiento

Trate la muestra como se indica en el esquema de extracción:

ESQUEMA DE EXTRACCION



3.1 Preparación de Lecitina

Amasar la yema de huevo cocido y mezclarla con 40 ml de la mezcla de alcohol-éter (2:1). Dejar reposar 10 minutos con agitación ocasional, filtrar con papel humedecido con alcohol. Remover el residuo del papel filtro y mezclarlo con otros 10 ml de la mezcla de alcohol-éter y filtrar. Combinar los dos filtrados en una cápsula previamente pesada.

El filtrado se evapora hasta sequedad en un baño maría. Pesar y disolver el residuo en 5 ml de éter y agregar esta solución lentamente y con agitación a 15 ml de acetona y con ayuda de un policia agitar de manera que las partículas de lecitina se aglomeren y formen una bola. Guardar la solución de éter-acetona para la segunda parte.

3.1.1 Solubilidad

Mezclar un poco de lecitina con agua. Observar que se dispersa formando un coloide.

3.1.2 Hidrólisis

Agregar 20 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado al resto de lecitina y luego hidrolizar durante 30 mm en un erlenmeyer con varilla para reflujo.

Después de la hidrólisis neutralizar con CH_3COOH al 10% usando fenolftaleína como indicador. Filtrar y descartar el residuo. Al filtrado añadir 6 ml de reineckato de amonio al 2% en etanol y colocarlo en la nevera por 20 ó 30 minutos hasta que cristalice.

3.2 Preparación del Colesterol

La solución de éter-acetona obtenida durante la preparación de la lecitina, evaporarla en un baño de vapor hasta obtener una pasta. (El residuo no debe o'ér a éter o acetona). Enfriar y pesar. Añadir 10 ml de KOH alcohólico al 10%, perlas de vidrio y colocar en reflujo por 30 mm. Enfriar y luego añadir 30 ml de éter. Filtrar el precipitado de jabón si se forma. La solución de éter contiene entonces el colesterol.

Evaporar hasta sequedad en un vidrio de reloj, descartar los restos de agua o secar con un papel de filtro.

Extraer el colesterol calentando el residuo con 5 ml de alcohol en un baño de vapor y pasar la solución a un tubo de centrifuga de 15 ml. Al residuo sobre el papel agregar otros 3 ml. de alcohol con el fin de lograr una extracción completa, combinar los dos extractos alcohólicos, centrifugar durante 5 minutos. Pasar el líquido sobrenadante que contiene el colesterol a otro tubo de centrifuga y añadir

agua gota a gota hasta que no se forme más precipitado. Dejar en reposo durante 15 minutos y centrifugar. Decantar el líquido sobrenadante.

Si se desea, el colesterol puede purificarse por recristalización con unos pocos mililitros de alcohol caliente. Cuando esté frío, la adición de unas gotas de agua asegura la cristalización. Centrifugar. Dejar secar el precipitado y sobre el producto seco realizar el test de Liebermann-Burchard así: en un tubo de ensayo seco colocar unos pocos mg de colesterol, 1,5 ml de cloroformo anhidro, 0,5 ml de anhídrido acético y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El desarrollo del color generalmente demora de 15 a 30 minutos y durante este tiempo debe colocarse en la oscuridad.

4 Expresión de resultados

Calcular el porcentaje de lípidos totales, lecitina, colesterol y triglicéridos presentes en la yema de huevo.

Comparar con los valores reportados en la bibliografía.

Escribir las reacciones de caracterización de cada uno de los lípidos extraídos.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los productos de hidrólisis completa de la lecitina?
2. Si la extracción del colesterol no se realiza en condiciones anhidras ¿qué resultado esperaría?
3. ¿Por qué la lecitina forma una emulsión en presencia de H₂O?
4. ¿Es el colesterol saponificable? Explique su respuesta.
5. Escriba las estructuras del colesterol, ácido desoxicólico, estradiol, progesterona, vitaminas A y D ¿Qué similitud estructural encuentra entre ellas?
6. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método de extracción utilizado?

PRÁCTICA No. 4: Hidrólisis de polisacáridos

Objetivo

- Comparar tres métodos de hidrólisis de polisacáridos, determinando la cantidad de azúcar reductor formado mediante la reacción de la glucosa con 3,5-dinitrosalicilato de sodio.

1 Fundamento teórico

Los polisacáridos almidón, glicógeno y celulosa, son polímeros de la glucosa, de elevado peso molecular y por hidrólisis dan un número grande y muy variable de moléculas de oligosacáridos según el tipo de carbohidrato.

El almidón es el carbohidrato de reserva de las plantas y se encuentra almacenado en todos los granos, semillas, raíces y tubérculos. Está formado por dos fracciones: un componente cristalino soluble, la amilosa (10-20%) y un componente amorfo insoluble, la amilopectina (80-90%).

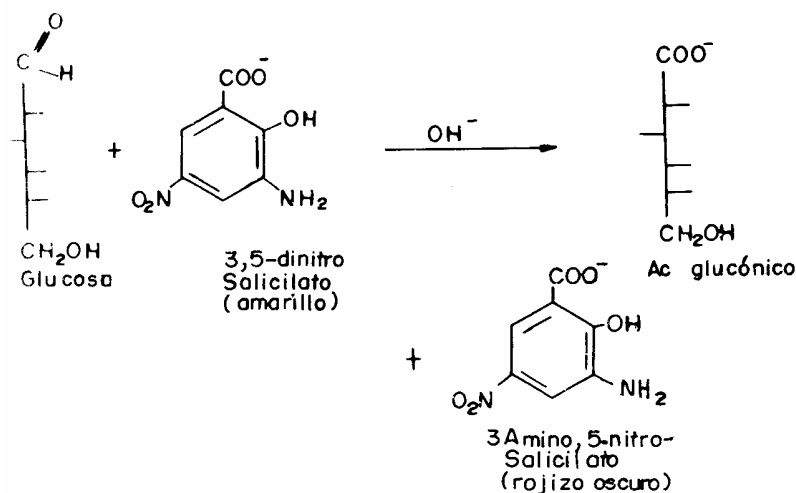
La amilosa está formada por largas cadenas sin ramificaciones en las cuales todas las unidades de D-glucosa están enlazadas por uniones α -1,4. La amilopectina es altamente ramificada por uniones glicosídicas α -1,6 que se presentan más o menos cada 12 residuos de glucosa.

La hidrólisis de una macromolécula puede llevarse a cabo usando diversos procedimientos: Empleando ácidos y/o bases fuertes, con catalizadores inorgánicos u orgánicos o mediante enzimas hidrolíticas adecuadas.

El almidón por ejemplo puede ser hidrolizado enzimáticamente por dos clases de enzimas. La α -amilasa sintetizada principalmente por las glándulas salivares y el páncreas; hidroliza las uniones glicosídicas α -1,4 presentes en la estructura interna de la molécula de polisacáridos; esta hidrólisis no sigue orden alguno lo que la diferencia de las β -amilasas vegetales, cuya hidrólisis se verifica desde el final no reductor de la cadena hidrocarbonada. Como consecuencia de la hidrólisis final por la α -amilasa resultan entonces: glucosa, maltosa e isomaltosa y en etapas intermedias se forman dextrinas ramificadas de peso molecular menor y oligosacáridos.

La hidrólisis de los polisacáridos puede seguirse midiendo el incremento en azúcares reductores mediante el reactivo 3,5-dinitrosalicilato en solución alcalina. El ácido 3,5-dinitrosalicílico (de color amarillo) se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, (rojizo oscuro) produciendo una coloración que se mide espectrofotométricamente a 540 nm.

La reacción de la glucosa con el 3,5-dinitro salicilato de sodio es:



La extensión o porcentaje de hidrólisis se determina comparando la cantidad de azúcar reductor presente en cualquier tiempo, con la cantidad de azúcar presente después de la hidrólisis ácida total.

La hidrólisis de los polisacáridos también puede efectuarse por medios químicos. Los ácidos fuertes diluidos catalizan el rompimiento indiscriminado de los enlaces glicosídicos, dando como producto final glucosa.

La estructura polisacárida se demuestra en este experimento, ya que el número de grupos reductores en el medio de reacción aumenta a medida que transcurre la hidrólisis. El progreso de la hidrólisis se mide de la misma forma que en la hidrólisis enzimática.

2 Reactivos

- Solución de almidón soluble (6 mg/ml) en buffer fosfato de sodio 0.02 M y pH 6.9
- NaOH, 4 N
- HCl 4 N
- Reactivo 3,5-dinitro salicilato de sodio: (disolver 5 g de ácido 3,5-dinitro salicílico en 100 ml de NaOH 2N, calentar. Por separado, adicionar 150 g de tatrato de sodio y potasio a 250 ml de H₂O, calentar. Mezclar las dos soluciones y completar a 500 ml)
- Buffer fosfato de sodio 0.02 M pH 6.9 en NaCl 0.005 M.
- NaOH 20%
- Reactivo de Lucas. (134 g de ZnCl₂ en 89 ml de HCl concentrado)

3 Procedimiento

El profesor en el momento de la práctica distribuirá el trabajo de tal manera que cada grupo realice una hidrólisis diferente sobre el mismo polisacárido; por ejemplo el grupo 1 efectuará hidrólisis ácida sobre almidón proveniente de maizena y el grupo 2 efectuará la hidrólisis enzimática sobre la misma muestra a fin de que puedan comparar los resultados.

La solución del polisacárido tendrá una concentración de 6 mg/ml y se preparará en Buffer fosfato de sodio 0.02 M pH = 6,9.

Todos los grupos realizarán la hidrólisis ácida de la celulosa en presencia de $ZnCl_2$ (o reactivo de Lucas)

3.1 Hidrólisis ácida

Rotular ocho tubos de ensayo y agregar en orden los siguientes reactivos:

Condiciones	Tubos							
	B	0	1	2	3	4	5	6
Solución almidón, ml	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Agua destilada, ml	0.4	—	—	—	—	—	—	—
NaOH, 2.4 N	1	1	—	—	—	—	—	—
HCl 4N, ml	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Colocar los tubos 1 a 6 en un baño maría a ebullición y dejarlos en los siguientes tiempos:								
Tiempo de incubación, minutos	0	0	3	6	9	12	15	25
Finalizado el tiempo de incubación, sacar cada tubo y detener la hidrólisis agregando:								
NaOH, 2.4N, ml	—	—	1	1	1	1	1	1
Reactivo 3,5-dinitrosalicilato, ml	1	1	1	1	1	1	1	1
Introducir todos los tubos en el baño a ebullición durante cinco minutos, enfriar y agregar 7 ml de agua destilada. Agitar y medir transmitancia a 540 nm. Utilice el B para ajustar el 100% de transmitancia.								

3.2 Hidrólisis enzimática

Recoger 2 ml de saliva en un vaso de precipitados. Cuando esté todo listo para la hidrólisis enzimática, diluya la saliva original tomando 0.3 ml de saliva y 19.7 ml de buffer de fosfato de sodio pH 6.9 en NaCl 0.005 M. Use inmediatamente la saliva diluida.

Si la velocidad de hidrólisis es muy rápida para obtener una rata lineal en los primeros minutos o demasiado lenta, para observar una rata apreciable, repita el ensayo usando otra dilución de saliva.

Rotular ocho tubos de ensayo y agregar los siguientes reactivos:

Condiciones	Tubos							
	B	0	1	2	3	4	5	6
Solución almidón, ml	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Agua destilada, ml	0.4	—	—	—	—	—	—	—
Saliva diluida, ml	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Inmediatamente adicione la saliva a los tubos B y 0, agregue el siguiente reactivo:								
Reactivo 3,5-dinitrosalicilato, ml	1	1	—	—	—	—	—	—
Agite todos los tubos y deje incubar a temperatura ambiente:								
Tiempo de incubación, minutos	0	0	3	6	9	12	15	25
Luego de terminar la incubación, agregue:								
Reactivo 3,5-dinitrosalicilato, ml	—	—	1	1	1	1	1	1
Coloque todos los tubos en un baño a ebullición durante cinco minutos, enfríe y agregue 8 ml de agua destilada. Mida la transmitancia a 540 nm y use el tubo B para ajustar el 100% de transmitancia.								

3.3 Hidrólisis ácida de la celulosa en presencia de $ZnCl_2$

Colocar en una cápsula un trozo de algodón bien desmenuzado o vanos pedacitos pequeños de papel de filtro. Agregue 3 ml del reactivo de Lucas y caliente durante tres minutos, agitando energéticamente. Deje enfriar y neutralice rápidamente con NaOH al 20%. Si se forma un precipitado centrifugue a 2.500 rpm durante 10 minutos y luego pase 0.5 ml del sobrenadante a un tubo, adicione 1 ml de NaOH 2,4 N y 1 ml del reactivo, 3,5-dinitro salicilato y proceda en igual forma a la utilizada en las hidrólisis anteriores. Repita el procedimiento calentando durante 6 minutos.

4. Expresión de resultados

La glucosa libre que queda después de la hidrólisis completa del almidón, (tubo No. 6 de la hidrólisis ácida), representa el 100% de conversión del polisacárido en glucosa.

Tomando el valor de absorbancia de este tubo como el 100% de hidrólisis, calcule el porcentaje de hidrólisis en los demás tubos de las diferentes hidrólisis.

Grafique el porcentaje de hidrólisis o formación de azúcar reductor vs tiempo para la hidrólisis ácida y enzimática del almidón.

Compare el porcentaje de hidrólisis a los 3 minutos de cada polisacárido para la hidrólisis ácida, la hidrólisis ácida en presencia de $ZnCl_2$ e hidrólisis enzimática.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los productos de la hidrólisis enzimática parcial y total del almidón, del glicógeno y de la celulosa?
2. ¿Cuál es el efecto de la adición de NaCl al buffer fosfato usado para diluir la saliva?
3. Explique la diferencia estructural entre la celulosa y el almidón. ¿Cómo puede degradarse enzimáticamente la celulosa?
4. ¿Qué son los compuestos llamados dextrinas y cuál es su importancia en la elaboración de alimentos?

MATERIAL
EN
REVISIÓN

PRÁCTICA No. 5: Fraccionamiento de proteínas en semillas de leguminosas y cereales por solubilidad

Objetivos

- Realizar la extracción fraccionada de los componentes proteínicos de las semillas de leguminosas y cereales, utilizando para ello la diferencia de solubilidades de los diferentes tipos de proteínas.
- Cuantificar cada una de las fracciones obtenidas utilizando el método de Biuret.

1 Fundamento teórico

1.1 Solubilidad y precipitación de las proteínas

La solubilidad de una buena cantidad de proteínas es función de la fuerza iónica, el pH y la concentración de solventes orgánicos.

A bajas concentraciones salinas del solvente, las proteínas (como electrolitos multivalentes que son) se comportan de manera muy similar a los iones simples, es decir cumplen la teoría de Debye-Huckel, o sea en esta región de concentraciones de sal, el aumento de ésta estabiliza los grupos cargados sobre la proteína y por lo tanto aumenta su solubilidad (solubilización por salado: saltIn). El fenómeno contrario (precipitación por salado: saltOut) que se observa a altas fuerzas iónicas, es probablemente el resultado de la competencia entre la proteína y los iones de la sal por las moléculas de agua del medio para solvarse.

Esto quiere decir que a concentraciones de sal suficientemente altas, la concentración efectiva de las moléculas de agua (solvente) disminuye y son insuficientes para la solvatación total de la proteína, por lo tanto la interacción proteína-proteína predomina sobre la interacción proteína-agua y ocurre la precipitación. En esta región la solubilidad de la proteína está a menudo relacionada en una forma logarítmica con la fuerza iónica y se rige por la ecuación:

$$\log S = \beta' - K_s' \cdot \mu$$

donde:

S = Solubilidad

β' = log. de la solubilidad hipotética a fuerza iónica (μ) igual a cero.

K_s' = Constante de precipitación por salado, que varía considerablemente con la naturaleza de la sal y muy poco con la naturaleza de la proteína.

La solubilidad de la mayoría de las proteínas a una fuerza iónica constante, presenta un mínimo cerca del punto isoeléctrico. A este pH, las repulsiones electrostáticas intermoleculares entre las moléculas de soluto están en su mínimo,

lo mismo que las interacciones electrostáticas entre los grupos polares cargados y el agua, por lo tanto las proteínas precipitan más fácilmente.

La mayoría de los solventes orgánicos son buenos precipitantes pues en general tienen baja constante dieléctrica. El dimetilsulfóxido y la formamida, con constantes dieléctricas relativamente altas, son buenos solventes.

1.2 Clasificación de Osborne de las proteínas, por el criterio de solubilidad

La clasificación comúnmente usada no se basa en aspectos estructurales de éstas sino principalmente en su solubilidad frente a diferentes solventes.

Desafortunadamente entre los grupos clasificados no existe un límite fijo, pero de todas maneras permite el fraccionamiento de las proteínas provenientes de una misma fuente. Según Osborne, las proteínas vegetales pueden clasificarse según su solubilidad en: albúminas, globulinas y glutelinas. Las albúminas corresponden al grupo de proteínas que son solubles en agua destilada y en soluciones salinas diluidas.

Las globulinas son insolubles (euglobulinas) o muy ligeramente solubles en agua destilada pero son solubles en soluciones salinas diluidas. Con base en las propiedades de solubilidad no es posible distinguir entre albúminas y pseudoglobulinas.

Si se aplican los conceptos de precipitación por salado, se observa que las globulinas precipitan en soluciones de sulfato de amonio del 50% de saturación, mientras que las albúminas lo hacen a concentraciones mayores del 75% de saturación. Estas precipitaciones son mejores si se hacen a pHs cercanos a sus puntos isoeléctricos.

Las prolaminas son insolubles en agua pero se disuelven en soluciones acuosas de alcoholes de bajo peso molecular, en concentraciones entre el 50 y el 90%.

Las glutelinas son insolubles en los solventes anteriores pero se solubilizan en soluciones diluidas de ácido o bases.

Estos dos últimos grupos solo se encuentran en materiales vegetales, mientras que las proteínas animales están constituidas básicamente por albúminas y globulinas.

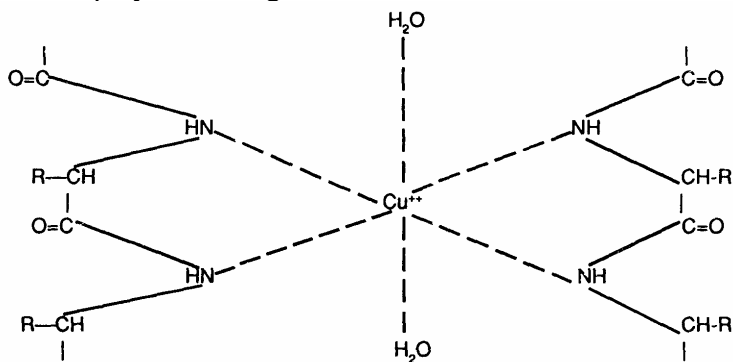
1.2.1 Método Biuret

La reacción de Biuret es una medida del número de enlaces peptídicos presentes. Los compuestos que contienen dos o más enlaces peptídicos entre ellos péptidos

y proteínas dan un color rosado o lila característico cuando se tratan con sulfato de cobre diluido en solución alcalina.

El color se debe al complejo de coordinación que se forma entre el átomo de cobre y cuatro átomos de nitrógeno provenientes de enlaces peptídicos (dos de cada péptido).

La estructura del complejo es la siguiente:



Los espectros de absorción de los complejos de cobre formados con diferentes proteínas, son similares aunque no idénticos. Por consiguiente, es posible utilizar cualquier proteína como patrón de coloración. Esta es bastante reproducible, para una proteína dada, aunque se requiere de cantidades relativamente grandes de proteína (de 1 a 20 mg por ml) para obtener coloración. Por otra parte, no es necesaria una digestión previa de la muestra.

2 Reactivos

H₂O desmineralizada, NaCl al 1%, Etanol al 75%, NaOH 0.1 N, reactivo Biuret, solución patrón de albúmina de huevo de concentración conocida.

3 Procedimiento

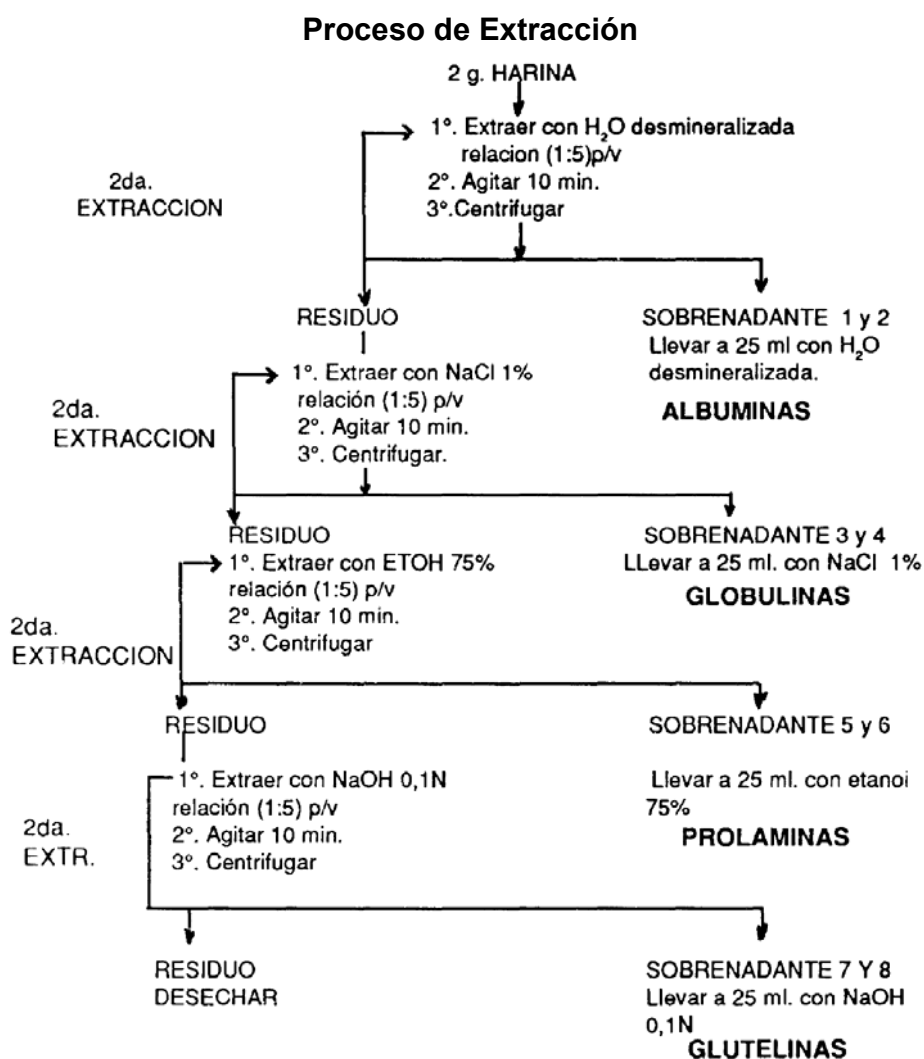
Recordar que el tratamiento de la harina, con cada uno de los siguientes solventes, extrae la fracción indicada así:

Solvente Extractor	Fracción Extraída
Agua desmineralizada	Albúminas
Cloruro de sodio al 1%	Globulinas
Etanol al 75%	Prolaminas
Hidróxido de sodio 0.1 N	Glutelinas

3.1 Preparación de la muestra

Pesar 2.0 g de muestra (en cada caso será una de las harinas de: arveja, soya, fríjol, haba, trigo, cebada, etc.); pasarla a un tubo de ensayo, agregar 10 ml de H₂O desmineralizada, agitar manualmente durante 10 minutos y centrifugar la suspensión a 2500 rpm por 3 minutos. Vaciar el sobrenadante a un balón aforado de 25 ml. Al residuo agregar de nuevo otros 10 ml de H₂O desmineralizada y repetir exactamente el proceso anterior.

Después de centrifugar, el sobrenadante de esta segunda extracción se adiciona al balón que contiene al primer sobrenadante. Se completa su volumen a 25 ml con H₂O desmineralizada hasta el enrase. Así se tiene separada la fracción de las albúminas.



Sobre el residuo que queda de la separación de las albúminas, se repite ahora todo el proceso anterior, pero agregando esta vez NaCl al 1%. Después de

centrifugar, los sobrenadantes de la primera y segunda extracción con NaCl al 1%, se llevan a otro balón aforado de 25 ml y se completa hasta el enrase con el mismo NaCl al 1%. Esta es la fracción de las globulinas.

Sobre el residuo anterior se extrae en idéntica forma la fracción de las prolaminas, usando esta vez alcohol etílico al 75% y una temperatura de extracción cercana a 60°C.

Por último sobre el mismo residuo, con la adición de solución de NaOH 0.1 N y aplicando el mismo procedimiento general, se separa la fracción de las glutelinas.

3.2 Método de Biuret

Sobre cada uno de los extractos que contienen las diferentes fracciones cada grupo procederá a la determinación de proteínas, aplicando el método de Biuret.

La curva de calibración se hará utilizando como patrón una solución de albúmina de huevo de concentración conocida.

Para las muestras de soya, arveja y frijol, de las fracciones de albúminas y glutelinas deberá tomarse para cada una y por aparte, una alícuota de 0,5 ml y llevarse a un volumen de 5 ml (dilución 1 a 10) con agua desmineralizada para las albúminas y con NaOH 0,1 N para las glutelinas. Estas diluciones se usarán como extractos problemas para dichas fracciones.

En 15 tubos de ensayo rotulados pipetear en c/u las cantidades de reactivos que se indican en el siguiente cuadro.

Mezclar bien y dejar en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente o introducir los tubos en un baño de agua a 30°C durante 10 minutos para desarrollo del color. Leer en cada tubo porcentaje de transmitancia a 540 nm usando el tubo B para ajustar el 100% de transmitancia.

4 Cálculos y resultados

Consultar tablas de conversión para pasar porcentajes de transmitancia a los correspondientes valores de absorbancia o calcúlelos utilizando la fórmula:

$$A = 2 - \log (\%T)$$

Trazar en papel milimetrado la gráfica de calibración (absorbancia en ordenadas vs. concentración (mg/ml) en abscisas) e interpolar las absorbancias de los tubos problemas; proceder, teniendo en cuenta las diluciones de cada caso, a calcular los porcentajes de cada fracción proteínica.

Condiciones	Tubos														
	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sol. patrón albumina, ml	-	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.2	—	—	—	—	—	—	—	—
Fracción albuminas, ml	-	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	—	—	—	—	—	—
Fracción globulinas, ml	-	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	—	—	—	—
Fracción prolaminas, ml	-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	—	—
Fracción glutelinas, ml	-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0
H ₂ O destilada, ml	2	1.9	1.7	1.5	1.3	1.1	0.8	1.5	1.0	1.5	1.0	1.5	1.0	1.5	1.0

Reactivo de Biuret en todos los tubos: 4 ml

Deberán compararse los valores obtenidos con los que se hallen en la literatura consultada.

Calcular también los rendimientos de las extracciones, los cuales se deducen de la comparación con los porcentajes de proteína total, obtenidos por micro Kjeldahl, en la siguiente práctica (No.6).

Cuestionario

1. ¿Qué se entiende por pl de una proteína? Explique por qué las proteínas precipitan en este punto.
2. Discuta un método colorimétrico alternativo para la determinación de proteínas indicando en que se fundamenta.
3. ¿Cómo se clasifican las proteínas de origen animal de acuerdo con su solubilidad?
4. ¿Qué ventajas en panificación ofrece el hecho de que una harina de leguminosa tenga mayor o menor contenido de glutelinas y de prolaminas?

PRÁCTICA No.6: Determinación cuantitativa de proteínas en harinas de leguminosas y cereales por el método de Micro Kjeldahl

Objetivo

- Determinar el contenido total de nitrógeno en harinas de leguminosas y cereales utilizando el método de micro Kjeldahl.

1 Fundamentos teóricos

1.1 Método Kjeldahl

Este método, diseñado para la determinación de nitrógeno total, puede aplicarse al análisis de proteína bruta de una muestra o de proteína verdadera, haciendo una extracción previa de ésta o también determinando el nitrógeno no proteínico.

El resultado de los análisis por Kjeldahl se expresa como proteína bruta, multiplicando el porcentaje de nitrógeno en la muestra por 6.25. Esta conversión se basa en el contenido promedio de nitrógeno del 16% de muchas proteínas. Aunque este promedio puede no ser válido para proteínas específicas purificadas, es suficientemente exacto para la mayoría de propósitos.

Para la determinación del nitrógeno presente en la muestra, es necesario hacer la digestión del compuesto hasta CO_2 e iones NH_4^+ , por tratamiento en caliente con H_2SO_4 concentrado y en presencia de mezcla catalizadora. Cuando se trata de determinar el nitrógeno de compuestos que contengan enlaces N-N, NO y NO_2 , previamente debe practicarse tratamiento con agentes reductores para convertirlos en grupos amina.

La cantidad de amonio producido se determina agregando un exceso de álcali a la solución ácida que los contiene, con lo cual se desplazan tales iones del bisulfato amónico y en la forma de hidróxido de amonio son arrastrados por una corriente de vapor de agua a un sistema cerrado y absorbidos en una solución de ácido de concentración conocida.

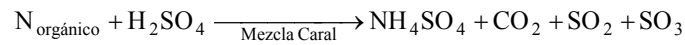
El exceso de ácido que queda en la solución, después de haber recogido todo el amoniaco desprendido, se valora con un álcali de título conocido.

También el amonio desprendido puede recogerse sobre una solución de ácido bórico, y el borato ácido de amonio producido se titula por retroceso con solución de un ácido fuerte de concentración conocida.

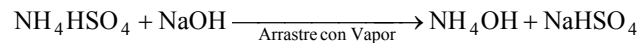
El método que se usa en la realidad se ha ajustado a la técnica micro.

Las reacciones que ocurren durante todo el proceso son:

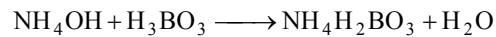
- Digestión:



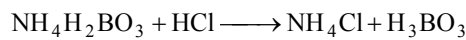
- Destilación:



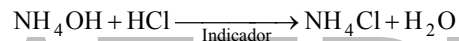
- Absorción:



- Titulación:



La suma miembro a miembro de las ecuaciones de absorción y titulación, da la ecuación definitiva de titulación:



El método es reproducible, requiere el tratamiento de muestras con un contenido de proteína mayor de 3 mg y puede calificarse como consumidor de tiempo y dispendioso en general. Sin embargo, como es posible conocer el contenido de nitrógeno no proteínico (haciendo una extracción previa de este y determinándolo en la solución de extracción), se obtienen entonces valores bastante exactos del contenido real de proteína.

Se recomienda usarlo para determinar proteína en mezclas crudas y relativamente grandes, pero no es rápido ni muy aconsejable para aplicarlo a gran número de muestras de proteína soluble relativamente pura.

2 Reactivos

- Mezcla catalizadora Sysoev: K_2SO_4 100 g, $CuSO_4$ 25 g, $KMnO_4$ 7.5 g y Se metálico 0.5 g.
- H_2SO_4 concentrado, del 98% y $d = 1.84$ g/ml
- Solución de ácido bórico al 4%.
- Indicador "Taschiro": rojo de metilo (al 0.2% en Etanol) 1 volumen + verde de bromocresol (al 0.2% en Etanol) 5 volúmenes.
- NaOH al 50%.
- HCl 0.01 N.

3 Procedimiento

3.1 Digestión

En un balón de digestión marcado colocar en su orden lo siguiente:

- Muestra de harina de leguminosa, 30 a 35 mg; o en su defecto muestra de harina de cereal, 45 a 50 mg
- Mezcla catalizadora, aproximadamente 100 mg.
- H_2SO_4 concentrado, 1 ml.

Para todo el grupo se correrán únicamente dos blancos. En tales balones se coloca lo mismo a excepción de la muestra.

Llevar los balones al digestor, calentar al principio suavemente-aproximadamente durante 15 minutos-con el fin de sacar por evaporación la mayor parte de la humedad que acompaña a la muestra. Aumentar luego gradualmente el calor hasta una temperatura tal, que los vapores de SO_3 (precaución: estos son producidos por descomposición del H_2SO_4 , causan irritación y producen tos de no hacerse la operación en vitrina) no alcancen sino la mitad del cuello del balón de digestión.

Mantener estas condiciones aproximadamente por una hora, hasta obtener una solución de color verde esmeralda. Dejar enfriar los balones al aire.

3.2 Destilación y absorción

En la figura 66 se muestra el aparato correspondiente. Al balón del generador de vapor se agregan perlas de vidrio o trozos de corcho o vidrio para ayudar a regular la ebullición.

Operar el generador de vapor hasta alcanzar un flujo constante de vapor, lo que se consigue aumentando o disminuyendo el calor. Entre tanto, la llave de doble paso debe conducir el vapor al vertedero. Agregar con cuidado un poco de agua destilada al balón de digestión y agitar para disolver la suspensión. Transferir totalmente la mezcla digerida al balón de destilación que tiene cuello esmerilado.

Lavar unas tres veces el balón de digestión con pequeñas porciones de agua destilada y agregar estas aguas de lavado al balón de destilación.

Medir 10 ml de H_3BO_3 al 4% en un erlenmeyer de 125 ml, agregar 3 gotas de indicador y colocarlo debajo del refrigerante, de modo que la punta del tubo interior del mismo quede sumergida en el ácido bórico, ver figura 66.

Coloca el balón de destilación que contiene la mezcla digerida en el extremo del tubo que conduce el vapor y asegurarse que quede perfectamente ajustado para prevenir escapes. Levantar la tapa del embudo (cuidando de dejar un pequeño nivel en el mismo para que actúe como sello) para permitir el paso de aproximadamente unos 5 ml de NaOH del 50%. Tapar rápidamente el embudo y

operar la llave de doble paso para que el vapor penetre al balón de destilación al cual se le acaba de agregar la soda concentrada.

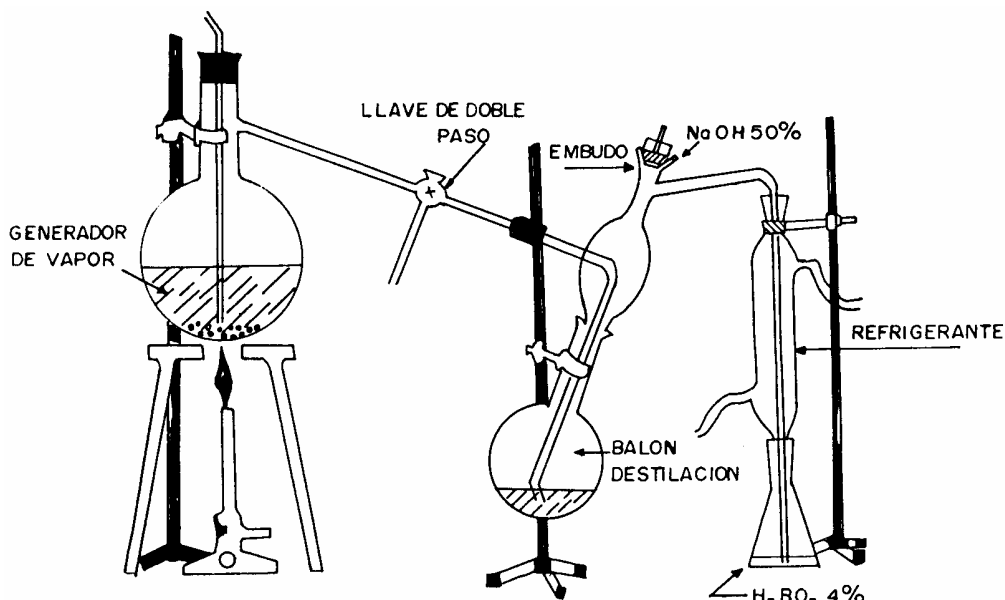


Figura 66: Montaje para destilación en el método de Micro Kjeldahl

A partir del momento en que empiecen a condensarse vapores de NH_3 en la parte superior del refrigerante, lo cual se conoce porque la solución de ácido bórico vira a un violeta o azul, cronometre cinco minutos. Transcurrido este tiempo, baje el erlenmeyer de modo que el extremo del tubo interior del refrigerante quede por encima del nivel del líquido en el erlenmeyer. Hecha la anterior operación, esperar tres minutos más para que el refrigerante escurra y se lave.

Con el frasco lavador, lave la punta del refrigerante y reciba estas aguas de lavado en el erlenmeyer. Desmontar el balón de destilación y dejar pasar el vapor para efectos de lavado. Operar enseguida la llave de doble paso para dirigir el vapor hacia el vertedero.

Por último, con el frasco lavador, lavar también el extremo del tubo que conduce el vapor al balón de destilación, con el fin de dejarlo limpio para la próxima destilación.

3.3 Titulación

Titular el destilado del blanco recogido sobre el ácido bórico, con el HCl estándar, hasta alcanzar la misma coloración que tenía antes de recibir el destilado.

El destilado de cada muestra recogido sobre el ácido bórico, que por efecto del NH_3 absorbido ha tomado color azul, se titula con el mismo ácido, hasta obtener una coloración final igual a la alcanzada con el blanco.

4 Expresión de resultados

A partir de los volúmenes de ácido gastados en las titulaciones de la muestra (V_m) y el blanco (V_b), calcular el porcentaje de nitrógeno total con la ecuación:

$$\%N = \frac{(V_m - V_b) \times N_{\text{HCl}} \times 14 \times 100}{\text{Peso Muestra en mg}}$$

Donde:

N_t = nitrógeno total

V_m = Volumen de HCl gastado en la muestra

V_b = Volumen de HCl gastado en el blanco

N = Normalidad del HCl

y el porcentaje de proteína bruta, aplicando la ecuación:

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \%N_t \times \frac{100}{16}$$

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \%N_t \times 6.25$$

Comparar los valores obtenidos con los que se hallen en la literatura consultada para la leguminosa o el cereal analizado.

Incluir en su informe el contenido de proteínas en: soya, maíz, trigo, cebada, frijón, arveja, lenteja, garbanzo, papa y leche.

Cuestionario

1. ¿Qué se conoce con el nombre de proteína bruta?, ¿de proteína real? ¿Cómo se determinaría cada una utilizando el método de micro-Kjeldahl?
2. Al comparar los métodos de Biuret y Kjeldahl ¿qué ventajas y desventajas encontraría en cada uno?
3. Explique porqué el contenido total de proteína determinado sobre una muestra de harina vegetal, no es el mismo que se determina sobre un extracto de la misma harina con NaCl 1%.
4. ¿El factor de conversión usado (6,25) es válido cuando se determina el contenido de proteína en leches? Explique su respuesta.

PRÁCTICA No. 7: Estudio cinético de la ureasa

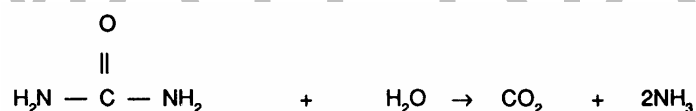
Objetivos

- Determinar el efecto del pH, la concentración del sustrato y la temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática de la ureasa.
- Determinar la presencia de ureasa en leguminosas y tortas de oleaginosas midiendo su actividad biológica.

1 Fundamento teórico

El estudio cinético persigue la caracterización de la actividad catalítica de la enzima, determinando las condiciones óptimas bajo las cuales presentan la mayor actividad.

La ureasa es una enzima muy difundida en el reino vegetal especialmente en semillas de leguminosas (soya, canavalia). Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

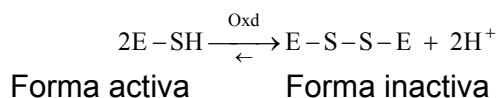


Un buen método para seguir el curso de la hidrólisis es la titulación del NH_3 producido con un ácido de normalidad conocida y en presencia de un indicador adecuado.

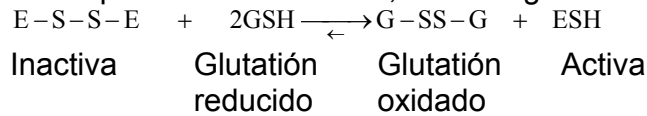
Esta enzima tuvo mucha importancia en el desarrollo de la enzimología moderna ya que merced a los trabajos de Summer fue la primera aislada y cristalizada. La ureasa tiene un PM de 483000, consta de 6 subunidades estructurales iguales y es de las enzimas que exhibe especificidad absoluta por su sustrato.

Las investigaciones sobre la ureasa también permitieron deducir un principio importante de las reacciones enzimáticas como es la función de los grupos -SH (sulfidrilo) en ciertas enzimas. La ureasa posee 3 o 4 grupos sulfidrilo activos, siendo un representante de un gran número de enzimas cuya actividad depende de la existencia de grupos -SH intactos formando parte de la cadena peptídica de la enzima como cisteína.

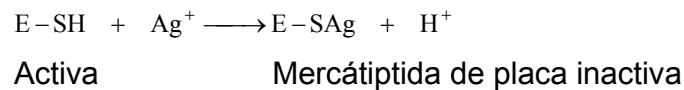
La oxidación de estos grupos puede ocasionar una inactivación reversible de la enzima. Por ejemplo:



Estas formas E—S—S—E inactivas muy probablemente pueden ser reactivadas mediante el efecto de compuestos ricos en -SH, como el glutatión o la cisteína.



Una alteración más estable, en particular en el caso de la ureasa, es la reacción de los grupos -SH con ciertos iones de metales pesados como Hg^{++} , Ag^+ o Cu^{++} , formando una mercáptida:



2 Reactivos

- Solución de Ureasa en buffer fosfato 0.05 M y pH 6.3
- Buffer fosfato 0.05 M, a pH 5.0; 6.0; 7.2; 8.0 y 10.0.
- Solución de Urea 0.25 M
- Solución de HgCl_2 al 1%
- Indicador de tashiro
- Solución de HCl aproximadamente 0.1 N (titulada exactamente)

3 Procedimiento

El trabajo experimental se hará en dos sesiones consecutivas de laboratorio así:

- En la primera sesión se determinará el efecto del pH, concentración de sustrato, temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática.
- En la segunda sesión se determinará la presencia de ureasa en leguminosas y tortas de oleaginosas midiendo su actividad por el mismo método utilizado en la sesión anterior.

3.1 Primera sesión

3.1.1 Determinación de la actividad a diferentes pH

Prepárese 2 series de 5 tubos: 5 servirán como blanco y 5 para determinar el efecto de pH. (Tubos p) rotulados claramente. Agregue lo indicado en el cuadro, incubándolos como se indica. Terminada la incubación transfiera el contenido de cada tubo a un erlenmeyer diferente, agregando a cada uno 3 gotas de indicador de tashiro; finalmente titule con HCl de normalidad conocida.

Primera Serie**TUBOS BLANCO**

Condiciones	Tubo				
	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5
Buffer Fosfato pH 5, ml	4.5	—	—	—	—
Buffer Fosfato pH 6, ml	—	4.5	—	—	—
Buffer Fosfato pH 7.2, ml	—	—	4.5	—	—
Buffer Fosfato pH 8, ml	—	—	—	4.5	—
Buffer Fosfato pH 10, ml	—	—	—	—	4.5
HgCl ₂ 1%, gotas	4	4	4	4	4
Incubar a 50 °C durante cinco minutos agitando.					
Extracto de Ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50 °C durante 25 minutos. Titular con HCl 0.1 N					
Volumen de HCl gastado en la titulación					

Segunda Serie**TUBOS PROBLEMA**

Condiciones	Tubos P				
	1p	2p	3p	4p	5p
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5
Buffer Fosfato pH 5, ml	4.5	—	—	—	—
Buffer Fosfato pH 6, ml	—	4.5	—	—	—
Buffer Fosfato pH 7.2, ml	—	—	4.5	—	—
Buffer Fosfato pH 8, ml	—	—	—	4.5	—
Buffer Fosfato pH 10, ml	—	—	—	—	4.5
Extracto de Ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar a 50 °C durante 30 minutos. Titular con HCl 0.1 N					
HgCl ₂ 1%, gotas	4	4	4	4	4
Titular con HCl 0.1N					

Expresión de resultados

Tabular los resultados obtenidos así:

Tubo número	ml de HCl gastado	Titulación corregida	Micromoles/ml de HCl gastado
1p			
2p			
3p			
4p			
5p			

El valor corregido de la titulación es la diferencia entre el volumen de HCl 0.1 N gastado en el blanco y el gastado en el problema (p) al mismo pH.

Expresa gráficamente (gráfica 1 de su informe) en papel milimetrado, los micromoles de urea hidrolizados (en las ordenadas) vs el pH (en las abscisas). De

acuerdo con los resultados de su gráfica, deduzca el pH óptimo, con el cual va a trabajar en las siguientes etapas.

Tubo número	Micromoles de urea hidrolizada	pH correspondiente
1p		
2p		
3p		
4p		
5p		

3.1.2 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción enzimática

En 8 tubos de ensayo marcados, pipetear en cada uno las cantidades de reactivos que a continuación se indican:

Condiciones	Tubos							
	B	1	2	3	4	5	6	7
Urea 0.25 M, ml	5	1.0	1.5	2.0	3.0	6.0	8.0	9.5
Buffer de fosfato pH óptimo, ml	5	8.5	8.0	7.5	6.5	3.5	1.5	—
HgCl ₂ , gotas	4	—	—	—	—	—	—	—
Colocar todos los tubos en un baño maría a 50 °C por cinco minutos y sin sacarlos agregar:								
Ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dejar en baño maría a 50 °C durante 25 minutos y al final agregar:								
HgCl ₂ 1%, gotas	4	4	4	4	4	4	4	4
Mezclar y sacar los tubos del baño								

Transferir cuantitativamente el contenido de cada tubo a un erlenmeyer marcado, agregar a cada uno 3 gotas de indicador, titular con el HCl (normalidad conocida) y comparar las diferentes titulaciones con el blanco.

Expresión de resultados

Tabular los resultados obtenidos así:

Tubo número	Micromoles de urea	ml de HCl gastados	Titulación corregida	Micromoles de HCl gastados
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

Titulación corregida, corresponde a: ml de HCl gastados - ml de HCl del blanco.

Tubo número	Micromoles de urea hidrolizada	Velocidad en moles/min	1/v	[S] moles de urea inicia/ml	1/[S]
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

En papel milimetrado y con datos de la tabla anterior construir las siguientes gráficas:

- Gráfica No. 2 de su informe: En ordenadas datos de v o sea micromoles de urea hidrolizados por minuto. En abscisas datos de $[S]$ o sea micromoles de urea iniciales/ml.
- Gráfica No. 3 de su informe: Siguiendo el procedimiento Lineweaver-Burk, en ordenadas datos de $1/v$ y en abscisas $1/[S]$.

De estas dos gráficas, deducir la constante de Michaelis y la velocidad máxima para esta reacción. El valor de K_m (constante de Michaelis) debe expresarse en moles/litro.

3.1.3 Determinación de la actividad a diferentes temperaturas.

Se usarán cinco baños de agua a diferentes temperaturas y cada tubo se incubará como se indica a continuación:

Tubo número	Incubar en:
1	baño de agua con hielo
2	baño de agua a temperatura ambiente aproximadamente 16 °C
3	baño de agua a 37 °C
4	baño de agua a 60 °C
5	baño maría (92 °C)

Luego proceda a agregar los reactivos y a mantener las condiciones que se indican enseguida:

Condiciones	Tubos					
	B	1	2	3	4	5
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5	5
Buffer de fosfato pH óptimo, ml	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
HgCl ₂ , gotas	4	—	—	—	—	—
Temperatura de incubación, °C	16	0	16	37	60	92
Colocar cada tubo en baño de agua a la temperatura indicada por cinco minutos y sin sacarlos agregar.						
Solución de ureasa, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar e incubar por 25 minutos a la temperatura correspondiente						
HgCl ₂ 1%, gotas	—	4	4	4	4	4
Titular con HCl (normalidad conocida)						
Resultados, ml de HCl						

Expresión de resultados

Con los resultados de la anterior serie de temperaturas y el obtenido a 50 °C (ver determinación de la actividad a diferentes pH, tubo No. 3p), grafique en papel milimetrado (gráfica No. 4 de su informe) los micromoles de urea hidrolizada (ordenadas) vs temperatura °C (abscisas). Explique el efecto de cada temperatura en la actividad de la ureasa.

3.2 Segunda sesión

3.2.1 Extracción de la ureasa

Pesar 5 g de muestra (en cada caso será una de las harinas de leguminosas o de las tortas de oleaginosas), pasarla a un erlenmeyer, agregar 10 ml de NaCl 1%; agitar mecánicamente durante 15 minutos y centrifugar la suspensión a 2.500 rpm por 15 minutos; transferir el sobrenadante a un balón aforado de 25 ml. Al residuo agregar de nuevo otros 10 ml de NaCl 1% y repetir exactamente el procedimiento anterior.

Reunir los dos sobrenadantes y completar a 25 ml con NaCl 1%. Este es el extracto que contiene ureasa.

En 5 tubos de ensayo marcados pipetear en cada uno las cantidades de reactivos como en la tabla siguiente se indica.

Mezclar y sacar los tubos del baño. Transferir cuantitativamente el contenido de cada tubo a un erlenmeyer marcado, titular con el HCl (normalidad conocida) y comparar las diferentes titulaciones con el blanco.

Condiciones	Tubos				
Urea 0.25 M, ml	5	5	5	5	5
Buffer de PO ₄ pH óptimo, ml	5	5	4.5	4	2.5
HgCl ₂ 1%, gotas	4	—	—	—	—
Colocar todos los tubos en baño maría a 50 °C por cinco minutos y sin sacarlos agregar:					
Extracto de ureasa, ml	0.5	0.5	1	1.5	3
Dejar en baño maría a 50 °C durante 25 minutos y al final agregar:					
HgCl ₂ 1%, gotas	—	4	4	4	4

Nota: Si la actividad de la enzima es muy baja con las alícuotas utilizadas, repetir el ensayo usando una alícuota del extracto de ureasa mayor. Por el contrario si la enzima presenta una actividad alta repita el ensayo utilizando una dilución del extracto de ureasa (por ejemplo: 1:5 v/v).

Expresión de resultados

Determine la actividad ureásica de la leguminosa o la torta analizada, expresándola como micromoles de urea hidrolizado / ml del extracto de ureasa.

Compare la actividad ureásica de su extracto con los obtenidos por los demás grupos y con los datos bibliográficos.

Cuestionario

1. ¿Qué tipo de inhibición enzimática se presenta con el uso de metales pesados?
2. ¿Qué representan los valores de V_m y K_m ?
3. ¿Qué entiende por metalo-enzimas? Dé ejemplos.
4. ¿Qué sucedería si se reemplaza el HgCl₂ por CaCl₂? Explique su respuesta.
5. ¿Todas las enzimas tienen CySH en su sitio activo? Especifique cuáles son los aminoácidos presentes en el sitio activo de las enzimas cuyos sitios activos usted conoce.
6. ¿Para qué se utiliza generalmente el test de la ureasa?

PRÁCTICA No. 8: Determinación de vitamina C en frutas y verduras

Objetivo

- Determinar el contenido de esta vitamina en frutas y verduras utilizando el método de Moor.

1 Fundamento teórico

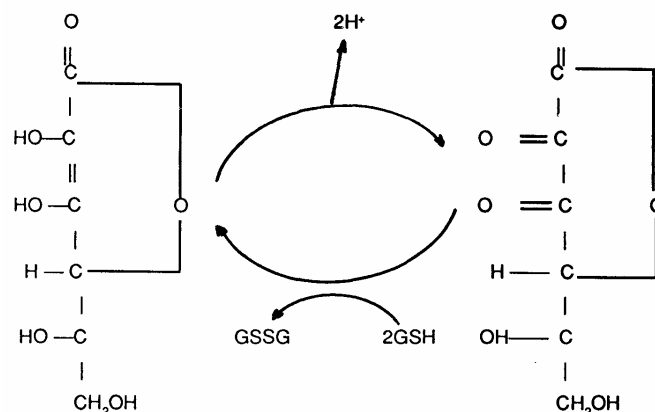
Las vitaminas son factores dietarios esenciales requeridos por los organismos en pequeña cantidad y cuya deficiencia produce ciertas enfermedades. Hay organismos que pueden sintetizar algunas de ellas, por lo tanto el tipo y cantidad de vitaminas que necesitan los diferentes seres vivos no es igual para todos.

La vitamina C es esencial para la formación del tejido conjuntivo, huesos, cartílagos, dentina y también para el mantenimiento de la función normal de dichos tejidos. Además la vitamina C estimula las funciones de defensa del organismo (actividad fagocitaria de los leucocitos, formación de anticuerpos).

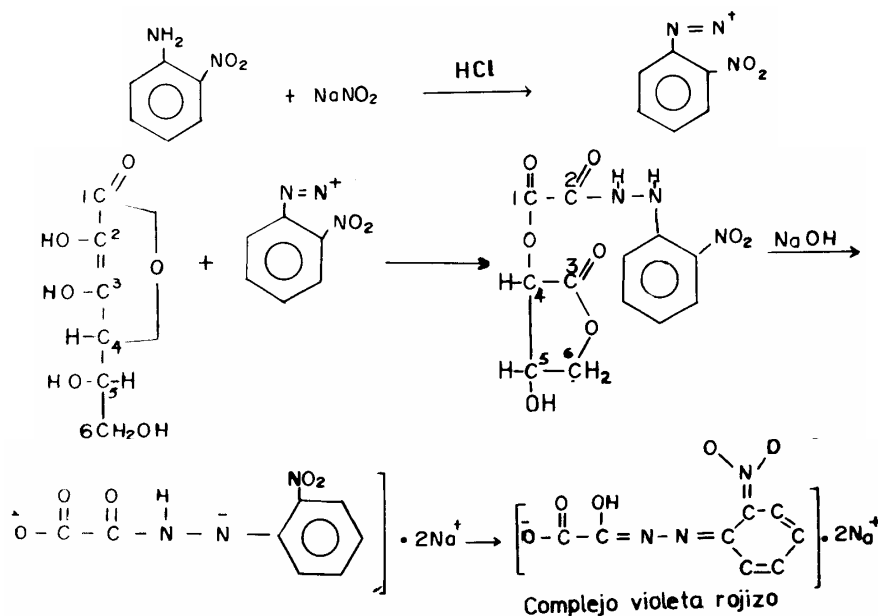
Como el ácido ascórbico se oxida fácilmente a ácido dehidroascórbico y éste puede volver a reducirse a ácido ascórbico, se ha propuesto que la vitamina C, como sistema de óxido-reducción, participe en procesos de oxidación celular, interviniendo en la hidroxilación de hormonas esteroideas (principalmente, las sintetizadas en las suprarrenales y aminoácidos aromáticos).

Se ha relacionado la inhibición de la formación de sustancia intercelular de los tejidos de sostén por carencia de vitamina C, con los trastornos de la hidroxilación de la prolina en hidroxiprolina, constituyente fundamental del colágeno.

La forma oxidada, ácido dehidroascórbico, puede ser reducida nuevamente por el glutatión en forma reducida (GSH).



Por tratamiento con la 2-nitroanilina diazotada, el ácido ascórbico la convierte en la 2-nitrofenilhidrazida del ácido oxálico, la cual en presencia de un exceso de hidróxido de sodio forma la sal sódica de coloración rojo-violeta que presenta un máximo de absorción a 540 nm.



Para el análisis de la vitamina C total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) es necesario reducir primero el ácido dehidroascórbico; esto se logra tratando la muestra con ácido sulfhídrico ya que este no presenta interferencia con el método.

2 Reactivos

2-nitroanilina 0.16% en acético – HCl

Nitrito de sodio 0,08% en H₂O

Etanol 96%

Acido oxálico 0.15%

Solución de vitamina C, recién preparada (0.2 mg/ml)

3 Procedimiento

Cada grupo traerá una fruta y una verdura de acuerdo con lo convenido previamente con el profesor.

Para obtener el extracto problema se procede de la siguiente manera: En el caso de las frutas cítricas se toma 1 ml de jugo, se pesa y luego se agregan 4 ml de ácido oxálico al 0,15%, se mezcla bien y se filtra, el filtrado se conserva para hacer la determinación colorimétrica.

Para otras frutas y verduras, se pesa 1g que se macera en mortero lo mejor posible con 4 ml de solución de ácido oxálico al 0,15%. Después de filtrar completar el filtrado con la solución de oxálico hasta un volumen final de 5 ml. De ahí tomar 1 ml de cada extracto problema para tubos D₁ (fruta) y D₂ (verdura).

Si la extracción se va a hacer en licuadora, se recomienda pesar 6 g y adicionar 30 ml de ácido oxálico al 0.15%.

Si el extracto exhibe coloración se recomienda adicionar una pequeña cantidad de carbón activado (aproximadamente 1 g por cada 10 ml de extracto coloreado) se agita y luego se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. La solución patrón de ácido ascórbico contiene 0.2 mg/ml y debe estar recientemente preparada.

El nitrito de sodio también debe estar fresco y debe asegurarse que la 2-nitroanilina se diazotice bien. Esto se logra cuando al mezclar esta con el nitrito se decolora la solución.

Rotular 9 tubos de ensayo y adicionar los siguientes reactivos:

Condiciones	Tubos								
	B	1	2	3	4	5	6	Fruta D ₁	Verdura D ₂
2-nitroanilina, ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Nitrito de sodio, ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mezclar y esperar la decoloración									
Etanol 96%, ml	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
Patrón vitamina C, ml	—	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	—	—
Ácido oxálico, ml	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	—	—	—
Extracto problema, ml	—	—	—	—	—	—	—	1.0	1.0
Mezclar bien y dejar en reposo cinco minutos									
NaOH 10%, ml	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Agua destilada, ml	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8

Se mezcla bien el contenido de cada tubo y se lee en el espectrofotómetro las absorbancias correspondientes a una longitud de onda de 540 nm.

Elabore la curva de calibración e interpole las absorbancias de sus muestras.

4 Expresión de resultados

De acuerdo con los resultados calcular el contenido de vitamina C en la fruta y verdura correspondiente, expresándolo como mg/100 g de fruta o verdura o como mg/100 ml de jugo. Finalmente compararlo con el valor reportado en la bibliografía.

Cuestionario

1. Compare el método que utilizó con otro método de determinación de la misma vitamina.
2. ¿Qué ocurriría si no se decolora por completo la solución de 2-nitroanilina al adicionar nitrito de sodio?
3. ¿Cuál es la función del hidróxido de sodio en la determinación de la vitamina C?
4. ¿Cómo se afectaría la determinación si la muestra ha sido tratada previamente con calor?
5. ¿Cómo se encuentra la vitamina C generalmente en los materiales vegetales?
6. Cite seis alimentos (verduras, frutas, leguminosas, tubérculos) ricos en vitamina C.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

PRÁCTICA No. 9: Determinación de actividad de inhibidores de tripsina en leguminosas

Objetivos

- Determinar la actividad catalítica de la tripsina utilizando como sustrato caseína.
- Determinar el efecto de los inhibidores de tripsina presentes en extractos de leguminosas o fracciones proteínicas de leguminosas.

1 Fundamento teórico

La tripsina y la quimotripsina pertenecen a un grupo de enzimas del tubo digestivo que también incluye la pepsina, producida por la mucosa gástrica. La tripsina y la quimotripsina son secretadas por el páncreas en forma de precursores inactivos o zimógenos que adquieren su forma activa inmediatamente antes de actuar.

El tripsinógeno está constituido por una cadena de 249 aminoácidos de secuencia conocida; se convierte en tripsina por acción de la enteroquinasa, una enzima segregada por el intestino, quien remueve un hexapéptido del extremo amino terminal del zimógeno.

La tripsina que se encuentra en el jugo pancreático, actúa sobre las proteínas y péptidos provenientes de la digestión parcial realizada en el estómago originando péptidos que son más fácilmente atacados por otras enzimas, para facilitar la asimilación de los aminoácidos producidos, contribuyendo así a la digestión de las proteínas.

La tripsina ataca del lado del grupo carboxilo de la usina y la arginina unido a un grupo amino de cualquier aminoácido o al grupo hidróxilo de un alcohol; su especificidad es muy alta y esto ha sido aprovechado para ayudar a elucidar secuencias de aminoácidos en proteínas.

En la búsqueda de fuentes vegetales de proteínas es importante considerar la familia de las leguminosas que en general presentan un alto contenido de proteína; sin embargo en ensayos biológicos se ha encontrado una baja calidad debido a la presencia de factores antinutricionales tales como los inhibidores de tripsina, hemaglutininas, alcaloides y otros.

Los inhibidores de tripsina están ampliamente distribuidos no solo en el reino vegetal sino también en el reino animal como proteínas de bajo peso molecular.

Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos y con el sobrenadante efectúe la reacción colorimétrica siguiente.

3.2 Determinación del porcentaje de hidrólisis

Marque 9 tubos de ensayo y adicione los siguientes reactivos.

Condiciones	Tubos							
		B	1	2	3	4	5	6
Sobrenadante, ml	—	1	1	1	1	1	1	1
Llevar a neutralidad con NaOH 10 M								
Solución de Ninhidrina 1%, ml	1	1	1	1	1	1	1	1
Calentar a ebullición en baño maría por 10 minutos. Deje enfriar y adicione:								
Agua destilada, ml	8	8	8	8	8	8	8	8
Leer las absorbancias a 540 nm usando el blanco para ajustar el 100% de transmitancia.								

4 Resultados

Los AA libres que quedan después de la hidrólisis de la caseína, en ausencia del inhibidor y con mayor concentración de tripsina (tubo No. 3), representan el máximo porcentaje de conversión de caseína en AA, libres en las condiciones experimentales usadas. Igualando el valor de absorbancia de este tubo al 100% de hidrólisis, calcular el porcentaje de hidrólisis en los demás tubos.

Comparar la actividad de los inhibidores (disminución del porcentaje de hidrólisis) de las leguminosas utilizadas con los otros grupos de laboratorio.

Cuestionario

1. ¿En qué consiste la reacción de la ninhidrina?
2. ¿Cuál es el pH óptimo de actividad de la tripsina, quimotripsina y pepsina?
3. ¿Cómo difieren en su acción catalítica la pepsina y la quimotripsina de la tripsina?
4. ¿Cuál es el efecto del ATA sobre la caseína digerida y no digerida?
5. ¿Cómo podría eliminarse la acción de los inhibidores de tripsina de las leguminosas?
6. ¿Qué otros factores antinutricionales se encuentran presentes en las leguminosas?

7. Investigue un método de extracción de inhibidores de tripsina.

MATERIAL
EN
REVISIÓN

GLOSARIO

ADIPOCITO: Célula constitutiva del tejido adiposo. También recibe el nombre de célula grasa.

ANABOLISMO: Se refiere al metabolismo biosintético.

ANFIFATICO: Molécula que posee simultáneamente regiones hidrofóbicas y regiones muy polares o cargadas.

APOENZIMA: Se refiere al componente no proteínico de una enzima que no está unido covalentemente a la proteína.

ANTIBIÓTICOS: Compuestos que inhiben la proliferación de bacterias.

BIOMOLÉCULAS: Compuestos de naturaleza orgánica que intervienen en la estructura, función o regulación de la célula.

CAPACIDAD BUFFER: Habilidad que posee una sustancia para regular el pH de una solución.

CATABOLISMO: Se refiere al metabolismo degradativo.

CLIVAJE: Ruptura de un enlace.

CONFORMACIÓN: Estructura tridimensional de una molécula. Está dada por la posición relativa en el espacio de cada uno de sus grupos.

CORTISOL: Hormona esteroideal perteneciente al grupo de los glucocorticoides u hormonas producidas por la corteza de las glándulas suprarrenales.

CROMATINA: Material nuclear amorfo que por condensación durante la mitosis origina los cromosomas.

DALTON: Unidad arbitraria de peso atómico que equivale a 1/16 del peso atómico del oxígeno. Su valor es entonces igual a 1,00000.

DIMERO: Molécula formada por dos unidades (monómeros) iguales o diferentes.

DOPA AMINA: Amina precursora de la adrenalina.

ELECTROFORESIS: Técnica basada en la migración de una molécula cargada por la acción de un campo eléctrico.

ENDÓGENO: Proveniente del interior del organismo o tejido.

ENLACE N-GLICOSIDICO: Enlace formado entre el hidróxilo hemiacetálico de un carbohidrato y un átomo de N de una base o de un AA.

ENZIMAS: Catalizadores biológicos que poseen un alto grado de especificidad.

ESPECTRO VISIBLE: Zona del espectro electromagnético cuyo rango de longitud de onda va de 400 a 900 nm.

ESTERO ESPECIFICIDAD: Especificidad debida a la conformación espacial de los compuestos que intervienen en una reacción.

FERMENTACIÓN: Término genérico que designa la transformación anaerobia de los carbohidratos en productos tales como alcohol, ácido láctico, ácido cítrico, etc.

FERREDOXINAS: Proteínas que tienen Fe y S en su sitio activo. Intervienen en reacciones redox.

FITOCROMOS: Pigmentos con estructura similar a las clorofilas.

FORMAS PARA CRISTALINAS: Cristales cuya celda unitaria cambia debido a diferentes contenidos de agua, dependiendo del método de preparación.

FOSFATO DE PIRIDOXAL: Coenzima de metil transferasas que actúa como donador de grupos de metilo. Su precursor, el ácido fólico, se incluye en el grupo de las vitaminas.

FOSFORILACIÓN: Reacción que involucra la transferencia de un grupo fosfato.

GLUCAGON: Hormona peptídica secretada en los islotes pancreáticos. Su acción es opuesta a la de la insulina.

GRUPO ACILO: Grupo proveniente de un ácido orgánico, al que se le ha eliminado el grupo OH del carboxilo.

GRUPO CROMÓFORO: Compuesto, generalmente de naturaleza orgánica, que a causa de su estructura absorbe en el espectro visible.

GRUPO PROSTÉTICO: Es el componente no protéico de una enzima, que se encuentra unido por enlaces covalentes a la proteína.

HIDROFOBICO: Que tiene poca tendencia a estar en contacto con el agua.

HIPERTENSORES: Sustancias que aumentan la presión arterial.

HIPÓFISIS: Glándula situada en la parte inferior del cerebro, formada por un lóbulo anterior y uno posterior.

HIPOTENSORES: Sustancias que disminuyen la presión arterial.

HISTAMINA: Amina con elevada actividad vaso-dilatadora.

HISTONAS: Proteínas de carácter marcadamente básico, debido a la presencia de un alto número de residuos de Lys y Arg, que se asocian con el DNA cromosomal de células eucarióticas.

HOLOENZIMA: Sinónimo de enzima. Se aplica a las enzimas que son proteínas conjugadas. $\text{Holoenzima} = \text{apoenzima} + \text{coenzima} = \text{apoenzima} + \text{grupo prostético}$.

HORMONAS: Biomoléculas presentes en muy bajas concentraciones, que ejercen una función reguladora en el organismo.

IMPEDIMENTO ESTÉRICO: Obstáculo presentado por grupos voluminosos que les impide estar muy próximos entre sí.

ILEON: Parte distal del intestino delgado que desemboca en el ciego.

LÁBIL: Poco estable.

LISOSOMA: Organelo celular situado en el citoplasma y constituido por una especie de vesícula o bolsa donde abundan hidrolasas de distintas clases (peptidasa, lipasas, glicosidasas, etc.).

METABOLISMO: Conjunto de reacciones degradativas y biosintéticas que permiten la conservación y propagación de las células y los organismos.

OLIGONUCLEICO: Molécula constituida por varios nucleótidos unidos a través de enlaces fosfodiéster-pentosa.

OXIDACIÓN ANAEROBIA: Proceso en el cual los electrones resultantes de la oxidación de un compuesto son aceptados por moléculas diferentes al O_2 .

PIROFOSFATASA: Hidrolasa que degrada el pirofosfato en dos moléculas de fosfato inorgánico (Pi).

POLI ELECTROLITO: Molécula que posee simultáneamente cargas positivas y negativas, en cuantía determinada por el pH de la solución.

POLÍMEROS: Compuestos de alto peso molecular, integrados por un elevado número de unidades (moléculas monómeras).

POLIPÉPTIDO: Péptido compuesto por más de 20 a 50 aminoácidos.

PLASTOCIANINAS: Metaloproteínas con Cu^{+2} , que actúan en la etapa luminosa de la fotosíntesis como transportadores de e^- .

PLASTOQUINONAS: Quinonas (del tipo de las benzoquinonas) con 6 a 10 unidades isopreno.

PRECURSOR: Compuesto a partir del cual se forman biomoléculas.

PROTEASAS: Grupo de enzimas que hidrolizan total o parcialmente las proteínas.

QUILOMICRONES: Partículas en suspensión en el plasma sanguíneo formadas por triglicéridos (96%) y pequeñas cantidades de proteína, fosfolípidos y colesterol.

REACCIÓN ENDERGONICA: Reacción que consume energía el ΔG° es positivo.

REACCIÓN EXERGONICA: Reacción que libera energía, el ΔG° es negativo.

SECUENCIA: Orden en que están colocadas las moléculas o las unidades repetitivos de un polímero.

SISTEMA MULTIENZIMATICO: Sistema integrado por un elevado número de enzimas que funcionan coordinadamente en el espacio y en el tiempo.

SUPRA MACROMOLECULAR: Se refiere a la estructura espacial que resulta de la asociación de varias macromoléculas.

SUPRARRENALES: Glándulas localizadas en la parte superior del riñón.

SUSTRATO: Compuesto que es modificado por una enzima.

TEJIDO ADIPOSOS: Tejido que tiene como función servir de depósito de grasas en el organismo.

TETRAMERO: Molécula formada por cuatro monómeros, iguales o no.

TRIOSA Carbohidrato con tres átomos de carbono.

UNIDAD DE REPETICIÓN: Estructura a partir de la cual empieza a repetirse la distribución de los grupos en el espacio.

VITAMINA: Compuesto que generalmente forma parte de la estructura de una coenzima y que se requiere para el funcionamiento normal de las vías metabólicas.

ZIMOGENO: Proteína inactiva que por degradación parcial da lugar a una enzima.

MATERIAL EN REVISIÓN

BIBLIOGRAFÍA

1. The absorption of light in photosynthesis / Rajni Govindjee. Scientific American. Vol.238, No.104, 1978.
2. Aminoacid biosynthesis and its regulation / H.E. Umbarger. - - Annual Review of Biochemistry. Vol.47, 1978.
3. Aminoacid catabolism. En: the biochemistry of plant / Mendel Mazelis. New York: Academic press, 1980. Vol.5.
4. The aminoacid sequence in the Glycyl / Chain of Insulin (establecimiento de la secuencia en la cadena A de la insulina)/F. Sangeryotros. S.I., Vol.53, No.353, 1963.
5. La base molecular de la vida. Julio. R. Villanueva. Scientific American. Madrid Blume, 1971.
6. Biochemistry / D.E. Metzler. New York: Academic Press, 1977.
7. Biochemistry of the aminoacids / Alton Meister. New York: Academic Press, 1965. Vol.1.
8. The biochemistry of fatty acid catabolism. / F.L. Bensch. Enzymology. Vol.8, No.443,1948.
9. Biochemist's handbook / Long Cyril. London: Spon, 1961.
10. Bioenergetics / Albert Lehninger. New York: Benjamin Press, 1965.
11. The biological synthesis of cholesterol? Konrad Bloch. Science. Vol. 150, No. 19, 1965.
12. Bioquímica / Albert Lehninger. Barcelona: Omega, 1978.
13. Bioquímica / C. Robert Bohiski. Bogotá: Fondo Educativo Interamericano, 1978.
14. Bioquímica experimental! Gerard Litwack. Barcelona: Omega, 1967.
15. Bioquímica experimental! Rogelio Hernández M. México: Limusa, 1979.

16. Bioquímica práctica / David Plumer. S.I.: McGraw Hill, 1981.
17. Bromatología, Zootécnica y alimentación animal! Luis Revuelta G. Barcelona: Salvat, 1953.
18. The C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis en: Progress In phytochemistry / M.D. Hatch. London: Interscience, 1970. Vo.2.
19. The carbon cycle! Bert Bodin. Scientific American. Vol.223, No.124,1970.
20. Clasificación and nomenclature of enzymes / R.H.S Thompson. Science. Vol. 137, No 405, 1962.
21. Compendio de vitaminas. F. Hoffmann. Basilea, Suiza: Roche, 1972.
22. Contribución al estudio de los inhibidores de tripsina presentes en a semilla del Balú / Carlos Hernández. Bogotá: Universidad Nacional, 1982. (tesis)
23. Cytochrome C and the evolution of energy metabolism / Richard Dickerson. Scientific American. Vol. 242, No. 137, 1980.
24. Dansyl Chloride procedure (uso del Tansilo para determinar AA N-terminales) / W.R. Gray.- - Vol.2, No. 139, 1967.
25. The energy cycle of the biosphere / M. George Woodwell. Scientflic American. Vol.223, No. 64, 1970.
26. Enzyme kinetics / R.A. Alberty. Enzymology. Vol.17, No.1, 1956.
27. Enzymes / J. Haldone. Cambridge: Paperback, 1965.
28. Enzymes / Malcom Dixon y otros. Londres: Logmans Green, 1958.
29. The enzymes / P. Boyer y otros. New York: Academic Press, 1959. Vol.1.
30. La estructura tridimensional de una enzima en: las bases moleculares de la vida / D.C. Phillips. San Francisco: Freeman, 1968.
31. Estudio de las proteínas presentes en las semillas de algunas leguminosas colombianas / Fernando Acevedo. Bogotá: Universidad Nacional, 1973. (Tesis).
32. Experimental biochemistry / J.M. Clark. San Francisco : Freeman, 1964.
33. Fatty acid synthesis and its regulation / S.J. Wakil y otros. Annual Review of Blochemistry. Vol. 52, No. 537, 1983.

34. The genetic activity of mitochondria and chloroplast. (características y actividad genética de DNA extracromosómico) / V.W. Goodenough. Scientific American. Vol. 223, No. 22, 1970.
35. Glycolysis. En: metabolic pathways / Bernard Axelrod. 3 ed. New York : Academic Press, 1967. Vol.1.
36. Glycolysis. En: Principles of biochemistry / Albert Lehninger. New York: Worth Publishers, 1982.
37. Graphical analysis of single enzyme systems / B.H. Hofstee. Enzymology. Vol. 17, No. 723, 1956.
38. Handbook of physiology biochemistry / Mc.Dowail. London: John Murray, 1950.
39. How cells make ATP / Peter C. Hinkle y otros.- - Scientific American.- - Vol. 238, No. 104, 1978.
40. Improvement of the Kjendahl determination of total nitrogen / A.F. Sysoev. S.I. Vol.67, 1967.
41. Industrial microbiology / Samuel O. Prescott y otros. New York: McGraw-Hill, 1959.
42. The intermediary stages in the biological oxidation of carbohydrate / Hans Krebs. Advances of enzymology. Vol.3, No. 191, 1943.
43. International Union of Biochemistry: nomenclature committee: enzyme nomenclature 1984 / Edwin Webb. Orlando : Academic Press, 1984.
44. Introducción al estudio de la composición de los alimentos. Luz A. Kairuz de Civetta. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1983.
45. Kinetic studies on the chain length specificity of long chain acyl CoA synthase from rat liver microsomes / G. Suzue y otros. Journal of Biological Chemistry. Vol. 247, No. 6781, 1972.
46. Laboratory experiments in Biochemistry! L. Daniel. Buffalo: Dual Printing, 1967.
47. Lipid metabolism / Konrad Bloch. New York: John Murray, 1960.
48. Lipid metabolism / W.J. Lennarz. Annual Review of Biochemistry. Vol. 39 No. 359, 1970.

49. The lipids / Harry Deuel. New York: Interscience, 1957. Vol.3.
50. Manual de bioquímica / Peter Karlson. Barcelona: Marín, 1969.
51. Manual de química fisiológica / H. Harper. México: Manual Moderno, 1980.
52. Methods for the determination of the amino acid sequence in peptides (uso del fenilisotiocianato en la determinación de N-tern) / P.Ednan. Vol.4, No. 283, 1950.
53. Molecular structure of nucleic acids (estructura en doble hélice del DNA) S.D. Watson y otros. Nature. Vol.171, No.737, 1953.
54. A new method for sequencing DNA (otro método para determinar la estructura de DNA) / A.M. Maxam y otros.- - New York: National Academic Scientific. Vol.71, No.560, 1977.
55. Nicotinamide mono nucleotide adenytransferase of pig-liver nuclei / M.R. Atkinson. Biochemistry. Vol. 80, No. 318, 1961.
56. The nitrogen cycle / C.C. Delwiche. Vol. 223, No. 136, 1970.
57. The nucleotides of a viral DNA (establecimiento de la estructura primaria del DNA del virus X 174) / S.C. Fidees. Scientific American. Vol. 237, No. 55, 1967.
58. Other pathways of carbohydrate metabolism en: metabolic pathways / Bernard Axeirod. 3 ed. New York: Academic Press, 1967. Vol.1.
59. The oxygen cycle / Preston Cloud. Scientific American. Vol.223, No. 110, 1970.
60. The path of carbon in photosynthesis / James Bassham. Scientific American. Vol.206, No.88, 1962.
61. Peptides and amino acids / Kenneth kople. New York: Benjamin, 1966.
62. The photosynthetic membrane / Kenneth Miller. Scientific American. Vol. 241, No. 100, 1979.
63. Physical chemistry br the libe sciences / M. Gordon Barrow. New York: Mc.Graw-Hill, 1974.
64. Physical chemistry with applications to biological systems / Raymond Chang. New York: Mac.Millan, 1977.

65. Principles of biochemistry / Albert Lehninger. New York: Worth Publishers, 1982.
66. Quantitative organic microanalysis / A.L. Stenyermark. New York: Academic Press, 1961.
67. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA-polymerase (método para secuenciar DNA)/ F. Sanger y otros. Vol. 94, No. 441, 1975.
68. Regulation of aminoacid metabolism / H.E. Umbarger. Biochemistry. Vol. 38, 1969.
69. RNA linked nascent DNA fragments in E Coli (RNA como indicador en la síntesis de DNA) Sugino y otros. Academic Science. Vol. 69, No. 1863, 1972.
70. RNA processing and the intervening sequence problem (revisión sobre procesamiento de precursores de RNA) / J. Abelson. Biochemistry. Vol.48, No. 1035, 1979.
71. The role of chlorophyl in photosynthesis en: The molecular basis of life / L.J. Rabinowitch y otros. Scientific American. San Francisco : Freeman, 1968.
72. Some proteases: structure and mechanism of catalysis / J. Krant. Biochemistry. Vol.46, No, 331, 1977.
73. The sources of muscular energy / Rodolfo Margaría. Scientific American. Vol.226, No.84,1972.
74. Standard Gibbs free energy, enthalpy and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphates (cambios en las funciones termodinámicas como consecuencia de variaciones de pH y [Mg²⁺]). Journal Biological of Chemistry. vol.244, No.3290, 1969.
75. The statistical analysis of enzyme kinetic data / W.Cleland. Enzymology. Vol.29 No.1, 1967.
76. Steroid metabolism en: metabolic pathways / H. Danielson y otros. 3 ed. London: Academic Press, 1968. Vol.3.
77. The structure and action of proteins / E. Richard Dickerson y otros. Menlo Park Benjamin, 1969.
78. Structure of a Ribonucleic acid (estructura la. del t-RNA para Ala) / R.W. Holley y otros. Science. Vol.147, 1965.

79. Tabla de composición de alimentos colombianos / ICBF. 4 ed. Bogotá: ICBF, 1978.
80. Técnicas de bioquímica aplicada! George Rendina. México, 1971.
81. The three dimensional structure of transfer RNA (determinacion de la estructura terciaria de t-RNA) / A. Rich y otros. Scientific American. Vol. 238, No. 52, 1978.
82. Toxic constituents of plant food stuffs / Irvin Liener. New York: Academic Press, 1969.
83. The tricarboxilic acid cycle en: metabolic pathways / J.M. Lowenstein. 3 ed. New York: Academic press, 1967. Vol. 1.
84. Tnpsin and chymotripsín inhibitors from soy beans 1V. Birk. Enzymology. Vol. 45, No. 700, 1976.
85. Tripsin inhibitor from Lima bean / Y. Birk. Enzymology. Vol.45, No. 707, 1976.

MATERIAL
EN
REVISIÓN