

Procesos de transformación de energía.

Prof. Militza Quintero Vega

Programa

El estudio de las moléculas biológicas diseñadas y sintetizadas en el interior de las células, es uno de los más importantes, porque sienta las bases para la explicación de los procesos complejos del metabolismo celular y de los procesos fotosintéticos de las células vegetales responsables ambos de que la vida permanezca en la tierra.

El Licenciado en Educación de la mención Ciencia Físico-Naturales requiere de una formación sólida en el campo de las ciencias biológicas, pues su papel principal a desempeñar es la enseñanza de los procesos de la vida, por tanto debe adquirir conocimientos profundos en el área de Bioquímica y de esta manera poder tener la capacidad de diseñar las estrategias que le permitan explicar estos procesos.

El presente programa ha sido diseñado y optimizado para llevar al alumno de la mención Ciencias Físico-Naturaleza a desarrollar los mecanismos cognitivos que le permitan comprender el funcionamiento de las biomoléculas más importantes y luego el desarrollo de los procesos metabólicos más trascendentales que ocurren dentro de la célula.

MODULO I

Tema N° 1. El agua.

- Principal componente de las células.
- Características y Propiedades moleculares.
- Interacciones electrostáticas, Iónicas, de Van der Waals, puentes de Hidrógeno e Hidrofóbicas.
- El producto iónico del agua y la definición de pH.

Tema N° 2. Biomoléculas: aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

- Ubicación en los diferentes compartimientos celulares.
- Funciones principales que cumplen estas biomoléculas.

Tema N° 3. Estructura y Función de las proteínas.

- Estructuras primarias, secundarias y terciarias de una proteína
- Técnicas de Aislamiento y Caracterización de Proteínas.
- La Hemoglobina como ejemplo de proteína alostérica.
- Las Enzimas como ejemplo de proteínas catalizadores biológicos.
- Características y funciones de las enzimas
- Estado de transición y velocidades de reacción
- Cinética de Michaelis-Menten

MODULO II

Tema N° 4. Leyes de la Termodinámica.

- Sistemas abiertos, sistemas cerrados, sistemas biológicos.
- Energía libre de Gibbs.
- El ATP es la moneda universal de energía.
- El poder reductor del NADH y NADPH.

Tema N° 5. La glicólisis, como proceso metabólico central de extracción de energía.

- La ruta metabólica más ancestral.
- Rendimiento en ATP y poder reductor
- Fermentación y rendimiento energético.

Tema N° 6. Ciclo de Krebs y respiración celular

- Desarrollo Histórico y elucidación de la ruta.
- Importancia desde el punto de vista de rendimiento energético y productos.
- Los intermediarios son catalíticos.

Tema N° 8. La fosforilación oxidativa y la formación de ATP.

- Los electrones del poder reductor son transferidos a una cadena de compuestos oxido-reductores.
- La ATP sintetasa es responsable de formar el ATP usando el gradiente de protones.
- Rendimiento energético de la oxidación completa de una molécula de glucosa.

Tema N° 9. La Fotosíntesis, el proceso primario de obtención de energía.

- Las plantas son responsables de captar la energía luminosa y transformarla en energía útil para hacer trabajo celular.
- Compartimientos celulares donde se verifica la fotosíntesis.
- Las reacciones de luz y de oscuridad.
- Rendimiento energético y Productos de la ruta.

Tema N° 10. El Metabolismo una visión de conjunto.

- Metabolismo de grasas
- Metabolismo de ayuno prolongado
- Metabolismo de ejercicio intenso
- Diabetes y nivelación de azúcar en sangre

Bibliografía a consultar:

Bioquímica. Matheus & Van Holden. McGraw-Hill Interamericana

Bioquímica. Stryer Lubert. Editorial Reverté.

Biochemistry. Voet & Voet. John Wiley & Sons, INC.

Bioquímica. Rawn.

Plan de Evaluación.

La evaluación del curso teórico-práctico es de carácter formativo-sumativo.

Teoría.

La evaluación se realizará mediante la implementación de exámenes generales que contemplen el contenido de uno o dos temas relacionados. Estos exámenes se diseñarán en función de evaluar la capacidad de construir relaciones entre los diferentes y nuevos términos propios del campo de la bioquímica, capacidad de integrar los procesos que explican el metabolismo y análisis y resolución de problemas planteados. Se propone la elaboración de al menos cuatro exámenes parciales, cuyas notas aportarán el 50% de la nota final.

Práctica. La evaluación es principalmente de tipo formativa, los alumnos deben participar activamente en la realización de las actividades propuestas y de las prácticas y talleres como tales. Se realizará una prueba o examen corto al inicio de cada período de práctica o taller, el cual pretende evaluar la preparación previa del alumno para afrontar el trabajo en la práctica. El alumno debe adquirir destreza en la elaboración de ensayos e informes de carácter científico, por tanto, al final de cada período práctico se requerirá la presentación de un informe o ensayo según se requiera. Por último, dado que la asistencia y participación en cada período de práctica es obligatoria, el alumno debe realizar las actividades propuestas, tales como resolución de problemas, análisis de lecturas pertinentes, resúmenes y otros, los cuales deben ser entregados al final de la jornada y cuya nota aportará el 15% restante de la nota de práctica. La inasistencia injustificada a tres períodos de prácticas obliga al alumno al retiro de su materia.

En resumen, el 50% de la nota final lo aporta la práctica de la siguiente forma:

Exámenes cortos: 20%

Informes, Ensayos, Cuestionarios y Modelos: 15%

Asistencia y Participación: 15%

Horario de Consultas:

Martes y Jueves de 3 a 5 p.m. en las instalaciones de Labiomex-ULA, Facultad de Medicina, teléfono: 2403117.

e-mail: milyq@hotmail.com

Programa de talleres y prácticas.
Prof. Militza Quintero Vega.

Práctica N° 1. Preparación de Soluciones.

Contenido:

1. Uso de la Balanza Analítica. Cálculo de Concentración final de una solución. Peso Molecular, Molaridad, Normalidad, % Peso/Peso, % Peso/Volumen.
2. Preparación de Soluciones: Tampones. Uso del pH metro. Calibración y lectura. Acidez y basicidad.

Objetivos:

1. Conocer y utilizar la balanza analítica para pesar reactivos caseros: Azúcar de mesa, Sal común, Harinas; y de uso en el laboratorio.
2. Aprender a realizar los cálculos para preparación de soluciones de uso común en el laboratorio utilizando los conceptos de Peso Molecular, Molaridad, Porcentajes de Pesos y otros.
3. Conocer y utilizar el pH-metro para medir la acidez y basicidad de soluciones de uso doméstico: Vinagre, jugo de limón, cloro de uso doméstico.
4. Preparar soluciones a determinados pH utilizando HCl y NaOH.
5. Aprender a preparar soluciones tamponadas y su utilización.

Estrategias:

1. Resolución de problemas y ejercicios de preparación de soluciones.
2. Utilización de la balanza para pesar reactivos, y preparación de soluciones con reactivos de uso común.
3. Utilización del pH-metro, Calibración del aparato. Medición del pH de soluciones de uso común.

Bibliografía:

- Cálculos de Bioquímica. Segel Irwin H. Editorial Acribia Zaragoza (España).
- Libros de texto recomendados en el programa de teoría.

Práctica N° 2. El Agua.

Contenido:

1. El Agua, diferentes estados: Hielo, Vapor, líquida. Propiedades del agua que permiten la vida, comparación con otras moléculas de fórmula similar.
2. La luz. La Ley de Lambert-Beer y el cálculo de concentraciones mediante espectrofotometría.

Objetivos:

1. Conocer la molécula del agua para entender sus diferentes propiedades. Relacionar los diferentes estados del agua y bajo cuales se permite la vida.
2. Conocer el espectrofotómetro y su utilización para el cálculo de la concentración de soluciones.

Estrategias:

1. Realizar moléculas de agua con materiales comunes: ánimo, foami, plastilina, varillas de plástico, madera, y pinturas.
2. Construir un modelo que represente las fuerzas y el estado en que se encuentran las moléculas de agua en el hielo, en el vapor, y en estado líquido; inferir la importancia de estas fuerzas para permitir la vida.
3. Preparar soluciones con colorantes y reactivos y conocer su concentración mediante la utilización del concepto de espectrofotometría y el espectrofotómetro.

Bibliografía.

- Cálculos de Bioquímica. Segel Irwin H. Editorial Acribia Zaragoza (España).
- Libros de texto recomendados en el programa de teoría.

Procesos de transformación de energía.

Programa de talleres y prácticas.

Prof. Militza Quintero Vega.

Práctica N° 3: DIGESTION DE POLISACARIDOS CON ENZIMAS DIGESTIVAS: AMILASA

1. INTRODUCCION.

La primera etapa del metabolismo está constituida por las sucesivas degradaciones de los alimentos, que de unidades grandes pasan progresivamente a formar unidades más pequeñas. En el caso de los hidratos de carbono se comienzan a digerir en la boca por acción de la α -amilasa de la saliva, líquido orgánico segregado de modo reflejo ante la presencia de la comida.

La α -amilasa, llamada también **ptialina**, cataliza la hidrólisis de las unidades glucosa a nivel del enlace glucosídico α -1,4 (pero no a nivel de las uniones α -1,6). Es interesante indicar que los hidratos de carbono se encuentran en el intestino con otra α -amilasa, proveniente del páncreas y que posee la misma especificidad que la salival, pero que es segregada ante estímulos diferentes (la amilasa pancreática se segrega junto con otras enzimas pancreáticas). Ambas enzimas poseen la capacidad de originar como productos de hidrólisis maltosa (2 unidades), maltotriosa (tres unidades) y oligosacáridos ramificados (n unidades). Es obvio que los oligosacáridos sean ramificados, si se piensa que estas enzimas no hidrolizan a nivel de los enlaces α -1,6.

La α -amilasa continúa ejerciendo su efecto en el bolo alimenticio hasta que este llega al estómago. Allí, el pH del jugo gástrico (que tiene un valor aproximado de 3 unidades de pH) frena la actividad enzimática. La digestión de los hidratos de carbono continúa en el duodeno, una vez sorteado el píloro. En ese lugar los jugos intestinales contienen la α -amilasa segregada por el páncreas. Si bien esta enzima posee igual especificidad de sustrato que la ptialina salival, es mucho más activa. Así los restos de almidón que aún no fueron atacados en la boca se convierten en el duodeno en unidades más pequeñas.

Las enfermedades relacionadas con el tubo digestivo y sus glándulas anexas dan la oportunidad de investigar la actividad de una serie de enzimas. Una de las enfermedades más severas es la **pancreatitis aguda**, ya que se instala de modo dramático y exige rápidas definiciones por parte del médico. Su diagnóstico clínico es muy difícil, y a veces el laboratorio puede brindar ayuda inestimable mediante la medición de algunas actividades enzimáticas, sobre todo de amilasa y lipasa. De hecho, casi todos los pacientes que padecen de pancreatitis aguda presentan una elevación de su amilasa sérica dentro de las 24 horas de producida la inflamación de la glándula. Como la amilasa es una proteína relativamente pequeña (45.000 daltons) se filtra fácilmente a nivel del glomérulo renal. Esa propiedad de la enzima es usada por los bioquímicos para detectar mejor la pancreatitis. Hay que insistir en que la rapidez es importante, porque a veces es necesario medir los niveles de enzima en función del tiempo. No debemos olvidar que la pancreatitis aguda es una de las emergencias médicas más dramáticas.

La amilasa puede medirse por varios métodos, pero los más recomendados son el iodométrico y el sacarogénico.

Método iodométrico. En este método (como en todos los que se utilizan para medir amilasa) el pH óptimo de la reacción debe ser 6.9-7.0. El método se basa en la capacidad que posee el yodo de combinarse con el almidón y dar un color azul. Cuando la amilasa actúa sobre el complejo almidón-yodo se producen otros compuestos coloreados pero que absorben a otra longitud de onda. El sustrato (almidón con solución tampón a pH 7.0) se mezcla con la muestra de suero y se incuba por un período determinado. Entonces se agrega una solución de yodo. Normalmente el yodo forma un complejo con el almidón y da color que se lee a 660 nm. En la muestra incubada más tiempo habrá menos color, puesto que los productos de la acción de la amilasa reducen los niveles de lectura considerablemente. Por lo tanto, la actividad de la enzima se relaciona inversamente con la intensidad de color o de lectura a 660 nm.

Algunas limitaciones de este método son los complejos que el yodo puede formar con las proteínas, y que hay que leer constantemente contra blancos de suero, que no contienen enzima, lo que limita la rapidez que necesita el método.

2. OBJETIVOS

Determinar cualitativamente la actividad amilasa
Determinar pH óptimo de la actividad amilasa
Analizar acción de efectores

3. MATERIALES Y REACTIVOS

2 cilindros de 25 ml
2 pipetas de 2 ml
2 pipetas de 1 ml
2 pipetas de 5 ml
1 vaso de 25 ml
1 vial de centelleo de 20 ml
1 vaso de vidrio de 50 ml
Pipetas Pasteur
1 gradilla con 20 tubos de ensayo
Baño de agua a 100°C
Disolución de almidón al 1%
Disoluciones de yodo al 1% para la parte 1° y yodo 2% para la parte 2
Disoluciones tampones 0.01M fosfato sódico a distintos pHs: 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5
Disolución de Benedict (citrato sódico, carbonato sódico y sulfato de cobre)
Disolución de nitrato de plomo al 1%
Disolución de nitrato de cinc al 1%
Disolución de nitrato de cobalto al 1%

4. METODO

Determinación cualitativa de la actividad amilasa de saliva

- Se recogen varios ml de saliva en un tubo de ensayo. Se transfieren 2 ml a un vaso de 20 ml donde se diluyen con 18 ml de agua destilada. Disgregar bien la saliva. Esto constituye lo que llamamos disolución de **amilasa-1**.
- Numerar tubos del 1 al 10. Pipetear en cada uno de los diez tubos 1 ml de la disolución de yodo 1%.
- En el tubo 1 añadir 1ml de disolución de almidón. Este tubo constituye el **tiempo 0** de la reacción.
- En otro vaso se colocan 10 ml de disolución de almidón. Añadir 1 ml de la disolución de amilasa-1 y agitar bien. A partir de los 2 minutos, extraer 1 ml del vaso y añadirlo sucesivamente a los tubos 2, 3, 4, etc. Hacer un **tubo blanco** y medir Absorbancia a 660nm. Hacer una **tabla de tiempo frente a Absorbancia**.
- Añadir a los tubos en los que no haya aparecido color 10 gotas de disolución de Benedict e incubarlos en un baño a 100°C durante 3 o 4 minutos. Enfriar. Observar y anotar lo sucedido.

Efecto del pH y efectores sobre la actividad amilasa de la saliva

- Rotular tubos del 1 al 8.
- Coger 1 ml de la disolución de amilasa-1 y añadirle 19 ml de agua Esta dilución es denominada **amilasa-2**. **OJO:** Los grupos que en la primera parte no hayan observado desaparición de color hasta los tubos 9, 10, o no desaparición, NO diluiran la amilasa; usarán amilasa-1.
- Pipetear en cada uno de los tubos los volúmenes de reactivos (en ml) que se especifican:

Tubo	Agua	pH5.5	pH6.5	pH7.5	pH8.5	Amilasa-2	Pb(NO ₃) ₂
1	3					1	
2	1	2				1	
3	1		2			1	
4	1			2		1	
5	1				2	1	
6	2					1	1
							Co(NO ₃) ₂
7	2					1	1
							Zn(NO ₃) ₂
8	2					1	1

- Añadir 1 ml de almidón al primer tubo. Mezclar bien, invirtiendo el tubo con ayuda de un trozo de *parafilm*. A los 30 segundos añadir al mismo tubo 1 ml de yodo 2% y volver a mezclar bien. Hacer un **tubo blanco** y medir Absorbancia a 660nm. Repetir a continuación la misma operación con el resto de los tubos.

5. CUESTIONES

1. Confeccionar una tabla con los resultados obtenidos y la posible explicación de qué está ocurriendo en cada uno de ellos, tanto los de la determinación cuantitativa, como los del efecto del pH y efectores.
2. Esta cuestión es opcional: ¿Nos serviría el reactivo de Benedict para medir a actividad de la amilasa? Razónalo.

Bibliografía.