

RESPIRACIÓN.

Presentación:

El mantenimiento de la vida requiere de un continuo suministro de energía, que en la mayoría de los organismos proviene del proceso respiratorio.

La respiración consta de tres etapas bien definidas: glicólisis, ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones- fosforilación oxidativa (Figura 1).

La glicólisis, que tiene lugar en el citosol, consiste en una serie de reacciones en las que la molécula de glucosa de seis átomos de carbonos, se escinde en dos moléculas de piruvato, de tres átomos de carbono. Luego, el piruvato es degradado a grupos acetilos de dos átomos de carbono, que ingresan al ciclo de Krebs, en la matriz mitocondrial. En el ciclo de Krebs, los grupos acetilos son completamente oxidados a CO₂. En el curso de este proceso se produce ATP, NADH y FADH₂.

En la etapa final del proceso respiratorio, las moléculas de NADH y FADH₂ ceden sus electrones a transportadores proteicos situados en la membrana interna mitocondrial, reoxidándose. A lo largo de esta serie de transportadores, los electrones de alta energía transportados por el NADH y el FADH₂ van “cuesta abajo” hasta el oxígeno. En tres puntos de su pasaje a lo largo de la cadena, se desprenden grandes cantidades de energía libre, que impulsan el bombeo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial. Esto genera un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial. Cuando los protones pasan a través del complejo ATP - sintasa, a medida que vuelven a fluir a favor del gradiente electroquímico al interior de la matriz, la energía liberada se utiliza para formar moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

Otras moléculas alimenticias que incluyen grasas, polisacáridos y proteínas, son utilizadas, previa degradación a moléculas más simples que pueden ingresar en estas vías centrales en diferentes pasos.

Las semillas, almacenan diferentes sustancias de reserva (almidón, lípidos, proteínas, etc) que mediante el proceso respiratorio suministran la energía y los esqueletos carbonados necesarios para las rutas de biosíntesis propias de la germinación. De esta manera, una vez iniciada la imbibición de las semillas, se observa un importante incremento en la tasa respiratoria con la concomitante disminución en la concentración de sustancias de reserva.

Las mediciones de respiración consisten principalmente en cuantificar el intercambio gaseoso por métodos manométricos, o por titulación.

Este trabajo práctico tiene como objetivo medir la tasa respiratoria de semillas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L) en las distintas etapas del proceso de germinación.

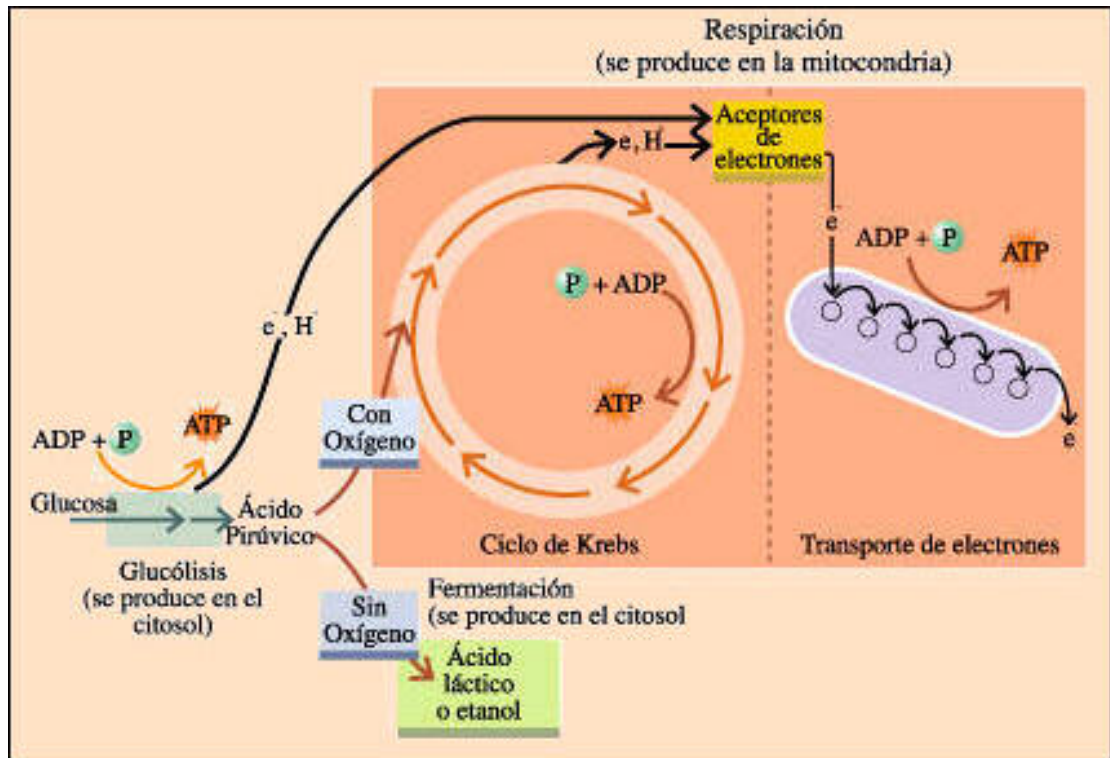


Figura 1: Esquema del proceso respiratorio. Tomado de Curtis *et al.*, 2000. Biología, 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana.

Aspectos teóricos necesarios:

Para comprender los fundamentos teóricos de este práctico de laboratorio, la Cátedra aconseja realizar una revisión de los siguientes temas:

- Titulaciones: generalidades.
- Aspectos bioquímicos del proceso respiratorio: Glicólisis, Ciclo de Krebs, cadena de transportadores de electrones, fosforilación oxidativa.

Actividades:

Pese 20g de semillas de poroto secas, germinadas durante 24 hs a 25°C, y germinadas durante 48 hs a 25°C, respectivamente. Envuélvalas en gasa y colóquelas en frascos conteniendo 15 ml de NaOH 0,1N. Use un cuarto frasco como testigo, con 15 ml de NaOH 0,5 N, sin semillas. Cierre los recipientes herméticamente e incube en estufa, a 30°C durante una hora.

Tome una muestra de semillas de cada tratamiento, péselas y colóquelas en estufa de secado, a 70°C hasta peso constante (requiere de aproximadamente 24 hs). Una vez secas péselas nuevamente.

Trascurrido el tiempo de incubación, retire los frascos de la estufa, descarte las semillas y adicione 0,5 ml de BaCl₂ al 20%. Observará la formación de un precipitado blanquecino; compare su espesor en cada uno de los tratamientos.

Titule el NaOH de cada frasco con HCl 0,1N, usando fenolftaleína como indicador. Registre los ml de HCl requeridos para que el indicador vire de coloración violeta a incoloro.

Calcule los mg de CO₂ respirados, expresándolos como mg CO₂. g PS⁻¹. h⁻¹.

Cuestionario:

- 1) ¿Qué es el precipitado blanquecino que se forma?. ¿Por qué el espesor del precipitado es diferente en cada tratamiento?.
- 2) ¿A qué se debe el precipitado blanquecino observado en el testigo?.
- 3) ¿Cuál es la función del NaOH?. Escriba la reacción correspondiente.
- 4) ¿Cuál es la importancia de la respiración, y cuál su relación con la germinación?
- 5) ¿Cuáles son las posibles fuentes de error en el método empleado?.
- 6) Proponga otro método para cuantificar la respiración en semillas.
- 7) Discuta con sus compañeros las siguientes situaciones problemáticas:

7.1. En células de un tejido especializado, conocido como grasa parda, la membrana interna mitocondrial es permeable a H^+ . Estas células contienen grandes depósitos de moléculas grasas, que se degradan gradualmente, y cuyos grupos acetilo resultantes, pasan al ciclo de Krebs. Los electrones capturados por el NADH y $FADH_2$, a su vez, alimentan a la cadena de transporte de electrones, y son finalmente aceptados por el O_2 . Sin embargo, no se sintetiza ATP. ¿Por qué no?. Este tejido existe en algunos animales que hibernan ¿qué función cumpliría?. ¿Mediante que proceso se producirán los grupos acetilos?.

7.2- En una experiencia se midió la tasa respiratoria en semillas de cebada secas, o germinadas a $10^\circ C$ y $22^\circ C$, respectivamente. Los resultados se detallan en la siguiente tabla:

Tiempo (minutos)	10	20	30	40
Secas	0,0	0,2	0,1	0,2
Germinadas a $10^\circ C$	2,9	6,2	9,4	12,5
Secas	0,2	0,1	0	0,1
Germinadas a $22^\circ C$	8,8	16	24	32

Interprete los resultados obtenidos. ¿Qué relación considera Ud. que existe entre la respiración y la germinación de las semillas?.

7.3- El trematol es un compuesto tóxico, presente en las hojas de una especie vegetal. El ganado que se alimenta de estas plantas concentra el veneno en la leche. Éste veneno inhibe en el hígado a las enzimas que convierten el ácido láctico en otros componentes del metabolismo. Los síntomas de la intoxicación se incrementan con el aumento de la actividad física. ¿a qué atribuye éste efecto?. Por otra parte, se ha demostrado que la intoxicación es acompañada por una disminución en el pH de la sangre ¿por qué?.

7.4- En un práctico de laboratorio, los estudiantes obtienen mediante fraccionamiento subcelular, una suspensión de mitocondrias de plántulas de cebada. Cuando ajustan el pH del medio en el orden de 5 unidades, detectan una importante producción de ATP. Justifique este resultado.

7.5- El bioquímico francés Luis Pasteur, describió un fenómeno muy particular, en el proceso de elaboración del vino, actualmente conocido como "efecto Pasteur". Observó que en los toneles sellados, que contenían el jugo de uvas y las levaduras, los azúcares se consumían muy lentamente mientras el oxígeno estaba presente.

Cuando el oxígeno se agotaba, las levaduras consumían rápidamente los azúcares y la concentración de etanol se incrementaba. Discuta esta observación

Bibliografía recomendada:

- Campbell, N. 1987. **Biology**, 5ta. Edición. Longman, Inc.
- Curtis, H. 2000. **Biología**, 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana
- Taiz, L y Zeiger, E. 1999. **Plant Physiology**. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc.

Recursos de Internet:

En la siguiente página encontrará una síntesis del tema (en castellano), y animaciones interesantes:

<http://www.arrakis.es/~lluengo/biologia1.html>