

Práctica #5

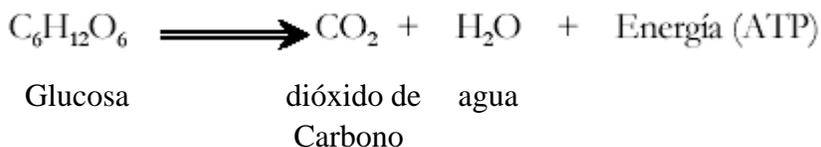
FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN

I. Objetivos

- * Identificar los tipos de respiración celular
- * Observar la producción de dióxido de carbono durante el proceso de la respiración.
- * Identificar la clorofila y otros pigmentos presentes en las hojas por medio de las técnicas de cromatografía
- * Observar la formación de azúcar como un producto de la fotosíntesis.
- * Observar la formación de almidón como una de las etapas finales de la fotosíntesis

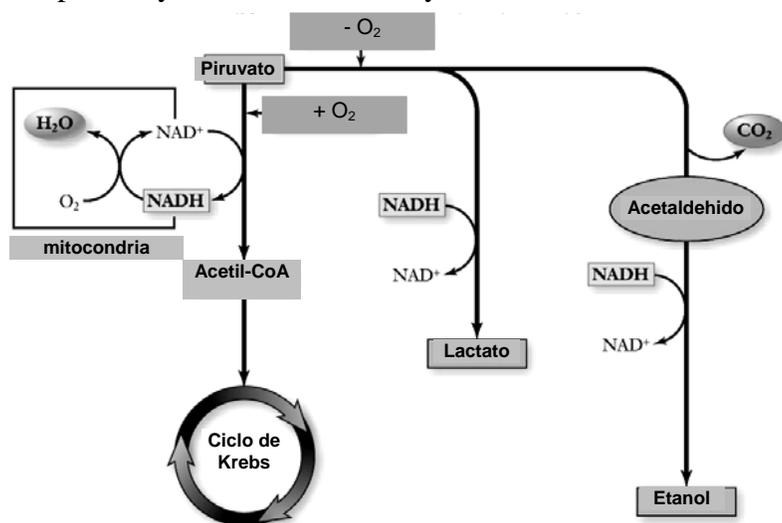
II. Introducción

Las células llevan a cabo diversos procesos para mantener su funcionamiento normal, muchos de los cuales requieren energía. La respiración celular es una serie de reacciones mediante las cuales la célula degrada moléculas orgánicas y produce energía. Todas las células vivas llevan a cabo respiración celular para obtener la energía necesaria para sus funciones. Usualmente se usa glucosa como materia prima, la cual se metaboliza a dióxido de carbono y agua, produciéndose energía que se almacena como ATP y se utiliza en la mayoría de las reacciones metabólicas



La molécula de ATP está formada por adenina, ribosa y tres grupos fosfatos con enlaces ricos en energía. Cuando la molécula se hidroliza, el fosfato terminal se separa para formar ADP (difosfato de adenosina) y se libera energía. El ATP es la fuente de energía que se usa como combustible para llevar a cabo el metabolismo celular

La respiración celular incluye una secuencia de etapas metabólicas definidas como: **glicólisis** en el citoplasma y el **ciclo de Krebs** y las **reacciones de transferencia de electrones** (redox) en la mitocondria.



Esta secuencia de pasos puede seguir una ruta diferente en presencia o ausencia de oxígeno. En ausencia de oxígeno, a partir del piruvato (producto de la glicólisis), ocurre **fermentación** o **respiración anaeróbica**. Dependiendo del organismo, existen dos tipos de respiración anaeróbica: **fermentación alcohólica** y **fermentación láctica**.

Por otra parte, el proceso de fotosíntesis es uno de los fenómenos más extraordinarios de la naturaleza y tiene una gran influencia sobre la mayoría de los seres vivos. Las algas y las plantas tienen la capacidad de sintetizar materia orgánica a partir de compuestos simples de la naturaleza (CO₂ y H₂O). Tanto

la vida vegetal como la animal dependen de la biomasa vegetal obtenida por la fotosíntesis para subsistir, ya

que no existe otra fuente de materia orgánica que pueda servir de alimento a la mayoría de los seres vivos. Si las algas y las plantas desaparecieran, la gran mayoría de animales perderían, tarde o temprano, todas sus fuentes de alimento.

Las algas y las plantas realizan fotosíntesis en presencia de luz solar; ésta es captada por la clorofila presente en los cloroplastos. Las clorofilas *a* y *b* son pigmentos de color verde azulado. En la captación y la transformación de la energía de la luz intervienen otros pigmentos que conforman un complejo junto con la clorofila: las xantofilas, de color amarillo, y los carotenos, de color rojo-anaranjado. Las clorofilas están formadas por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y magnesio, siendo los pigmentos más importantes y que pueden ser separados con facilidad de los otros compuestos.

El fenómeno de la fotosíntesis, que desde el punto de vista bioquímico tiene numerosas etapas complejas, consiste en tomar agua a través de las raíces y dióxido de carbono por medio de los estomas, para elaborar a partir de estos dos compuestos las moléculas orgánicas necesarias para la vida del vegetal. Para que el proceso pueda ocurrir, se requiere de energía que proviene del sol. Los compuestos orgánicos sintetizados son fundamentalmente carbohidratos. El primero que se forma de modo estable es la glucosa. Este azúcar forma polímeros tales como el almidón, que se acumula como sustancia de reserva en los vegetales y es uno de los productos finales elaborados a partir de la fotosíntesis.

III. Procedimiento

Durante la sesión de laboratorio se realizarán 4 experimentos que le permitirán conocer algunos aspectos de los procesos de fotosíntesis y respiración. Para ello, el grupo será dividido en 8-10 subgrupos de trabajo conformados por 3-4 estudiantes. Cada subgrupo realizara los experimentos especificados en la práctica.

Al finalizar los experimentos, se hará una discusión de los resultados obtenidos. Cada subgrupo debe estar preparado para discutir sus resultados

Experimento 1.- Respiración celular

(a) Respiración anaeróbica

Este mecanismo no es tan eficiente como la respiración aeróbica, ya que sólo produce 2 moléculas de ATP, pero al menos permite obtener alguna energía a partir del piruvato que se produjo en la glucólisis. Hay dos tipos de respiración celular anaeróbica: fermentación láctica, que ocurre en algunas bacterias y en el músculo esquelético humano) y fermentación alcohólica (levaduras, ciertos hongos y algunas bacterias) que tiene como productos finales alcohol (etanol) y CO₂

En este ejercicio se estudiará el proceso de fermentación alcohólica que llevan a cabo las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Primero, redacte una hipótesis que trate de explicar el efecto del tipo y concentración de carbohidratos sobre la tasa de fermentación en levadura

1. Se le entregará un frasco que contiene un cultivo de levadura al 2% (preparado antes de iniciar el laboratorio).
2. Rotular 2 tubos y mezclar lo siguiente:

Tubo 1: 2 ml de glucosa (5%) y 2 ml de levadura	(subgrupos 1 y 2)
Tubo 2: 2 ml fructosa (5%) y 2 ml de levadura	(subgrupos 3 y 4)
Tubo 3: 2 ml sacarosa (5%) y 2 ml de levadura	(subgrupos 5 y 6)
Tubo 4: 2 ml de maltosa (5%) y 2 ml de levadura	(subgrupos 7 y 8)
Tubo 5: 2 ml de dH ₂ O y 2 ml de levadura	(subgrupos 9 y 10)

3. Utilizando un pipeteador, llenar una pipeta graduada de 1-2 ml con la solución del tubo 1 hasta prácticamente desbordar. Sea cuidadoso de no formar burbujas a lo largo de la columna de solución que contiene la pipeta y no tomar sedimentos del frasco de cultivo.
4. Retire la pipeta de la solución y tape con el dedo índice el extremo libre (inferior) de la pipeta mientras la sostiene. Retire el pipeteador, dejando libre el extremo superior de la pipeta. Selle éste extremo de la pipeta con *parafilm* (parafilm es un papel especial con apariencia de papel de cera, que funciona como sellador si se **estira** sobre la superficie (vidrio) que se va a sellar).
5. Invierta la pipeta y selle el extremo libre de la pipeta con *parafilm*. Debe asegurarse de tener una columna de solución sin burbujas y libre de sedimentos que obstruyan el flujo de solución y gases en la pipeta.
6. Colocar la pipeta invertida dentro de un tubo de ensayo y anotar el tiempo inicial en la columna correspondiente en la tabla del reporte
7. Luego de un período de 2 min, registrar la producción de CO₂ (volumen de burbujas que se acumula en la punta de cada pipeta) como la diferencia entre la lectura real cada 2 min y la lectura anterior
8. Repetir el procedimiento (pasos 3-5) con la solución del tubo 2 u otras soluciones experimentales. Recuerdo registrar el tiempo de inicio

(b) Respiración aeróbica (demostrativo)

(todos los grupos)

Cada grupo observará cambios en el volumen y coloración de una solución indicadora (rojo fenol) como una medida de la producción de CO₂ (figura anexa). La cámara de germinación consiste de un frasco (erlenmeyer) sellado, el cuál contiene semillas germinadas. Por un extremo del frasco, el contenido del frasco hace contacto con al hacer contacto con los productos finales provenientes de una cámara de germinación

Formule una hipótesis para éste experimento y prediga los posibles resultados



1. Dispense un volumen pequeño de solución diluida de rojo fenol en el tubo de ensayo (**5 ml**). Haga un marca en el menisco de la solución
2. Cierre la cámara de germinación con el tapón y libere la prensa que cierra la manguera.
3. Coloque la pipeta pasteur dentro del tubo de ensayo
4. Después de un período de una hora y 30 min, s, cierre la manguera y retire el tapón del erlenmeyer.

Observe la solución indicadora y registre en el reporte algún cambio en coloración y/o volumen

Al finalizar el experimento, no descarte el rojo fenol

Experimento 2.- El papel de la luz en la fotosíntesis

La importancia de la luz en el proceso de la fotosíntesis puede observarse mediante los siguientes procesos: (1) absorción de dióxido de carbono de una planta de *Elodea* en condiciones de luz y sombra (4 grupos), y (2) diferencias en la formación de almidón en las plantas de *Coleous* o Geranio mantenidas en condiciones de luz y sombra (4 grupos)

(a) Absorción del dióxido de carbono

(grupos impares)

La absorción del dióxido de carbono por las plantas en presencia de luz es una evidencia indirecta del proceso de fotosíntesis. Uno de los métodos más simples para demostrarlo es estimar cambios en los niveles de CO₂ disuelto en una solución que contiene una planta acuática bajo condiciones de iluminación (*Elodea*)

En el siguiente experimento se estudiará si *Elodea* lleva a cabo el proceso de fotosíntesis en la oscuridad o en presencia de luz. El CO₂ en solución acuosa se convierte en un ácido (ácido carbónico), cuya concentración se medirá por medio de una titulación usando un indicador de pH (fenolftaleína). Con este indicador se observará el punto de cambio en pH, donde se obtiene el equilibrio entre pH ácido y básico. Este cambio en pH sucede al añadirle una solución básica de NaOH a la muestra ácida, y se observa por un cambio en color; de esta forma se podrá calcular la producción de CO₂ para cada organismo

Formule una hipótesis de trabajo en el reporte y haga una predicción de los posibles resultados

Prepare el siguiente material:

1. Agregue en tres frascos de vidrio etiquetados, 25 ml de dH₂O. En el frasco número 1 no agregue ninguna planta, mientras a los frascos número 2 y 3 agregue en cada uno una rama de *Elodea*.
2. Sople vigorosamente con una pajilla cada uno de los frascos.
3. Tape herméticamente los frascos y al frasco 3 cúbralo completamente con papel de aluminio.
4. Coloque los frasco 1 y 2 cerca de una fuente de iluminación y espere unos 30 min
5. Al finalizar los 30 min, añada 5 gotas de fenolftaleína (éste indicador es incoloro en soluciones ácidas y se torna rosado en soluciones alcalinas) y mezcle bien.
6. Llene la bureta de titulación con la solución de 0.0025 mM de NaOH.
7. Mueva el vaso en círculos y añada gotas de la solución de NaOH hasta obtener un color rosado persistente.
8. Anote en la Tabla de resultados cantidad de NaOH que utilizó para la titulación.
9. Calcule el consumo de CO₂ mediante esta ecuación:

$$[\text{CO}_2] = \frac{\text{ml de NaOH (experimental)} - \text{ml de NaOH (control)} * [\text{NaOH}]}{\text{Volumen de la Elodea (ml)}}$$

10. Repita el proceso con los demás vasos.

Para determinar el volumen de *Elodea*, siga el siguiente procedimiento:

- a.- Coloque la *Elodea* en un vaso (beaker) pequeño con 50 ml de agua
- b.- Haga una marca donde queda el menisco.
- c.- Remueva cuidadosamente el organismo con la precaución de no derramar agua.
- d.- Con una pipeta llena añada agua hasta llegar a la marca.
- e.- La diferencia de lectura en la pipeta indicará el volumen del organismo.

(b) Formación de almidón en las plantas*(grupos pares)*

Una de las etapas finales de la fotosíntesis es la formación de almidón. Para demostrarlo se toman hojas nuevas de plantas de *Coleus blumei* con diferentes patrones de coloración (o en su defecto hojas nuevas de Geranio que fueron cultivadas en condiciones de luz u oscuridad)

1. Haga un dibujo del patrón de coloración.
2. Cada hoja se hierva por varios minutos en alcohol al 90% hasta que las hojas tomen un color blanquecino. Posteriormente, y con cuidado de no dañar o doblar la superficie de la hoja, se transfiere a una caja de petri con una solución yodada.
3. Observe en que área de la hoja hubo reacción. Haga un dibujo del patrón de coloración en presencia de Lugol.

Experimento 3.- Separación de los pigmentos vegetales**(a) Cromatografía***(grupos pares)*

La cromatografía es una técnica físico-química que se usa para separar e identificar sustancias en sus constituyentes individuales. Consiste en una migración de los componentes de la mezcla entre la fase fija, que es la fase estacionaria y otra fase móvil. La separación es posible debido que algunas sustancias se retienen mejor en la fase estacionaria, mientras que otras se mueven mejor en la fase móvil. Se puede identificar varios tipos de cromatografía dependiendo del estado físico de las fases que participan: (1) cromatografía de adsorción en la cual, la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida, y (2) cromatografía de reparto. En este caso, la fase líquida o gaseosa se desplaza sobre una fase líquida estacionaria colocada en la superficie de un soporte sólido.

La cromatografía de papel se fundamenta en una combinación entre la cromatografía de adsorción y cromatografía de reparto. La partición ocurre entre el agua que hidrata la celulosa y la fase móvil orgánica.

Siga el siguiente procedimiento

1. Marque en una tira de papel a 1,5 cm de distancia del fondo del papel un punto, donde colocará una gota del extracto de pigmentos, el cual consiste en hojas frescas de espinacas (*Spinacia oleracea*, Chenopodiaceae) o güitite (*Acnistus arborescens*, Solanaceae), cuando esta gota esté seca añada 2 gotas más, esperando que cada una seque antes de poner la siguiente.
2. En el borde superior de la tira de papel marque una raya a 2 cm del borde superior, cuidando que el frente de migración no lo sobrepase (cuando el frente llegue a este punto, saque inmediatamente el papel del tubo de ensayo).
3. Suspenda la tira de papel con un gancho dentro de un tubo de ensayo que contenga la solución reveladora (acetona al 8% y éter de petróleo del 92%). Cuide que el papel no haga contacto con las paredes del tubo de ensayo.
4. Regule la superficie de contacto con el líquido sacando o introduciendo el gancho dentro del corcho. El papel debe tocar la superficie del líquido, pero no debe introducirse en el mismo.
5. Cuando el frente llegue al punto final (2 cm del borde) saque el papel y póngalo a secar al aire, en un sitio oscuro.
6. Cada una de las bandas coloreadas del extracto de las plantas es un pigmento diferente. Para cada uno de los pigmentos que observa aplique la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el pigmento}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

El Rf es un indicador de la afinidad de cada pigmento por las fases sólida y líquida. Se utiliza para caracterizar pigmentos; por lo tanto, el pigmento que tenga mayor Rf, será el más afín a la fase líquida y el de menor Rf será el más afín a la fase sólida.

Haga un esquema en el reporte de sus resultados

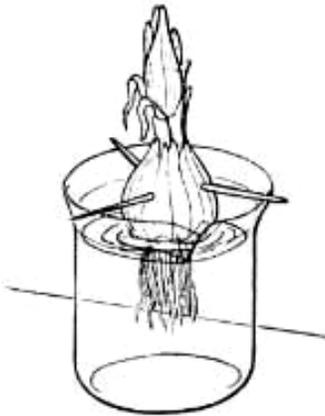
Experimento 4.- Observación de estomas

(grupos impares)

La función de los estomas es la regulación de la pérdida de vapor de agua y el ingreso de dióxido de carbono. Su estudio se ha centralizado principalmente en el estudio de la transpiración y fotosíntesis. También, la función de los estomas es importante para mantener la homeostasis de la planta, la cuál es indispensable en todo ser vivo para regular el medio interno cuando se relaciona con el ambiente.

Observe al microscopio los estomas de una hoja de “zebrina” realizando las siguientes preparaciones:

1. Coloque un pedacito de envés de hoja sobre un portaobjetos.
2. Obsérvela al microscopio.
3. Observe las células guardas y pigmentos. De ser necesario, añada poco agua carbonatada
4. Observe corte transversal de una hoja. Haga un esquema de sus observaciones e identifique las distintas estructuras que la componen



PARA LA PRÓXIMA PRÁCTICA:

En un pequeño frasco de vidrio, ponga a enraizar un bulbo de cebolla por aproximadamente una semana. Tenga cuidado de no sumergir la cebolla en el agua.