

~~114~~
I/605

LAS
FRATICAS
DE
LABORATORIO
COMO
PROYECTOS
DE
INVESTIGACION

BASTIDA DE LA CALLE, M^A FELIX
RAMOS FERNANDEZ ,FRANCISCO
SOTO LOPEZ, JULIO

I N D I C E

- INTRODUCCION	1
- LAS PRACTICAS DE LABORATORIO COMO PROYECTOS DE INVESTIGACION	6
- IMPLICACIONES ECONOMICAS	13
- IMPLICACIONES EN LA ORDENACION ACADEMICA	16
a) En cuanto al Alumno	16
b) En cuanto al centro	17
c) En cuanto al Profesorado	20
- EVALUACION	25

INTRODUCCION

A pesar de que hoy en día la mayoría de los docentes admiten la necesidad de una renovación pedagógica en la enseñanza, lo cierto es que las múltiples tentativas realizadas en dicho sentido, no han cuajado en un modelo didáctico aplicable a la generalidad de los Centros educativos. En el campo de la enseñanza de las Ciencias las tentativas han sido, por lo general, declaraciones de principio acerca del método científico, de las metodologías activas y de la necesidad de rebajar la extensión de los contenidos, para valorar, por el contrario, el desarrollo de las diferentes capacidades, hábitos y actitudes.

En este sentido, los redactores del presente Informe se plantearon la necesidad de llevar a cabo una investigación de innovación educativa que intentase clarificar las posibilidades reales de utilizar una metodología activa y coherente para la enseñanza de la Biología en el Curso de Orientación Universitaria.

El trabajo desarrollado por este equipo comenzó a principios del curso académico 82/83. Pretendíamos concretar una alternativa didáctica que, partiendo de las concepciones genrales acerca del papel del Bachillerato y COU en la formación del joven, posibilitase un cambio real en la

práctica educativa.

El proyecto partió del análisis de la realidad docente de los Centros, la cual a nuestro juicio, podría resumirse en:

- 1.- Polarización en la docencia magistral.
- 2.- El trabajo docente se limita a proporcionar conocimientos ya elaborados para su aprendizaje por los alumnos.
- 3.- Se establece como símbolo representativo de un determinado nivel, exclusivamente la cantidad de información almacenada.

Se trataba, por tanto, de colocar a los alumnos, en la medida de lo posible, en situación de producir conocimientos y explorar alternativas, superando la mera asimilación de información que estos deben memorizar y repetir. Concebíamos la actividad de los alumnos como un cuádruple diálogo: con las cosas mismas (observación de formas, magnitudes y diferencias significativas, experimentación,...), con los demás compañeros (trabajo y discusión en equipo), con los libros y, sobre todo, consigo mismos (imaginación creadora, sensibilidad científica, voluntad de conocimiento,...).

Bajo esta perspectiva, el profesor desempeñaría un papel de moderador, orientador, dinamizador y sistematizador del trabajo de los alumnos, pretendiendo con ello:

0-5

1.- Posibilitar la adquisición de técnicas de trabajo intelectual por los discentes en cuanto al manejo de información, organización y síntesis de la misma, elaboración de informes, etc..

2.- El desarrollo de las capacidades de creatividad, observación, razonamiento, interpretación y análisis, interrelación, etc..

3.- El desarrollo del espíritu crítico hacia la propia y ajena labor, así como de las capacidades dialécticas.

4.- La familiarización con el método científico.

5.- La comprensión y el conocimiento de los conceptos fundamentales, así como de las líneas de investigación y perspectivas de la Biología moderna.

En definitiva, buscábamos el establecimiento de una praxis inteligente, un proceder en el que pensamiento y acción se impliquen y exijan mutuamente.

De acuerdo con lo anterior y una vez seleccionados los contenidos del temario del COU que mejor se ajustaban para facilitar una visión dinámica y actual de la Biología, el proceso de aprendizaje de los alumnos se centraba en la

realización de una serie de actividades cuidadosamente seleccionadas, programadas y coordinadas, en las que se combinaba el análisis y discusión de documentos científicos con la realización de actividades experimentales.

El trabajo sobre la documentación suministrada (separatas de artículos de alta divulgación científica que, adaptados al nivel de los alumnos, ofrecen una ciencia más viva y menos estructurada que los libros de texto; comentarios de texto que facilitasen el análisis de los mismos: extracción de conceptos, razonamientos, evidencias, ...; textos de trabajo donde se explicitaba los conocimientos a adquirir y cuestionarios de autoevaluación), debiera promover el intercambio de ideas como método más eficaz para posibilitar el desenvolvimiento intelectual con respecto a los puntos más oscuros del tema bajo estudio. Por ello, tras el trabajo en clase sobre documentación, se aboca a la confrontación y discusión en mesa redonda de los diferentes conceptos y alternativas, lo que obligaba al profesor a una labor de reformulación o de síntesis, destacando determinadas intervenciones o, en ocasiones, a tener que aportar más información.

Este trabajo se materializó en un Proyecto de Investigación e Innovación Educativa que, tras ser aprobado por la Subsecretaría de Ordenación Educativa del MEC, fue llevado a término durante el curso académico 1982/83, en los

Centros: I. B. "Jose María de Pereda" de Santander y en el I.B. "Virgen del Puerto" de Santoña (Santander), y cuyos resultados se recojen en la memoria: "PRAXIS PROYECTIVA DE LA ENSEÑANZA DE LA BIOLOGIA EN EL COU.: Estudio experimental para la reforma de métodos y pruebas".

El intento de plantear una serie de actividades experimentales, con la pretensión de que fuesen el punto de partida para adquirir determinados conceptos o conocimientos, fue la mayor dificultad encontrada durante la realización del citado Proyecto. La mayor parte de la abundante bibliografía disponible sobre "prácticas de laboratorio", concibe las mismas como complemento de la teoría y no como punto de partida, lo que nos llevó a la necesidad de su replanteamiento global. Consecuencia de ello es el presente Proyecto de investigación didáctica, que pretende dar solución a las siguientes cuestiones:

¿De qué forma pueden ensamblarse las prácticas de laboratorio en una didáctica activa de la Biología?. ¿De qué forma se puede potenciar y desarrollar significativamente la creatividad, la observación, la experimentación, la formulación de hipótesis, el diseño de experimentos, la crítica, la sistematización, y tantas otras actitudes y hábitos inherentes al método científico?.

LAS PRACTICAS DE LABORATORIO COMO PROYECTOS DE INVESTIGACION

La respuesta a estos interrogantes nos condujo a plantear experiencias de laboratorio en las que los alumnos asumiesen una responsabilidad significativa en cuanto a la estructuración, búsqueda de información, formulación de hipótesis, diseño de experimentos, observación cuidadosa, orden, análisis e interpretación de los resultados, así como a realizar inferencias en cuanto a su posible utilidad, aplicación a otras situaciones y planteamiento de nuevos interrogantes. Consideramos que una vía eficaz para la concreción de estos planteamientos era el enfoque de la actividad experimental como pequeñas investigaciones, en las que los alumnos:

1. Planifiquen: es decir, sean capaces de definir el problema o cuestión a investigar, y participen activamente en el diseño de experimentos, lo que implica el análisis de las posibles alternativas y, consecuentemente, se estimule la creatividad. Se celebren mesas redondas, se formulen hipótesis, se busque bibliografía y se seleccionen los procedimientos de laboratorio idóneos; en definitiva, se potencie el razonamiento.

2. Ejecuten: es decir, adquieran el dominio de una técnica, atraviesen por las situaciones que se plantean durante la ejecución de las actividades planificadas. Realicen observaciones cualitativas y cuantitativas a medida que manipulan, registran y calculan. Identifiquen variables que puedan influir en los resultados.

3. Analicen e Interpreten: transformen datos, representen los mismos en tablas, gráficos o ecuaciones que permitan su análisis cualitativo o cuantitativo. Realicen deducciones a partir de los datos obtenidos. Expliquen los supuestos subyacentes en la interpretación adoptada. Determinen la precisión de las observaciones realizadas así como las posibles fuentes de error. Realicen comparaciones estadísticas de errores o probabilidades, determinen correlaciones y sometan los resultados obtenidos a tratamiento estadístico.

4. Finalmente, investiguen el posible valor científico de los resultados y su aplicación a otras situaciones. Se planteen nuevos interrogantes como consecuencia del trabajo realizado.

Así pues, se proyectaba confeccionar y facilitar una variedad de Módulos o Proyectos de Investigación tales que permitiesen desarrollar en los alumnos las siguientes

capacidades en orden al trabajo experimental:

1.- En orden a la fase de Planificación:

- a) Definir el problema o cuestión a investigar.
- b) Formular hipótesis.
- c) Proyectar experimentos.
- d) Buscar información bibliográfica.
- e) Buscar procedimientos de laboratorio idóneos.

2.- En orden a la fase de Ejecución:

- a) Adquirir el dominio de una técnica.
- b) Realizar observaciones cualitativas.
- c) Realizar medidas cuantitativas.
- d) Identificar variables que influyen en los resultados.

3.- En orden a la fase de Análisis e Interpretación:

- a) Elaborar los datos en bruto, representarles gráficamente y realizar cálculos.
- b) Realizar deducciones a partir de los datos obtenidos.
- c) Determinar la precisión y las posibles fuentes de error de las observaciones realizadas.
- d) Interpretar afinidades y sugerir interrelaciones

4.- En orden a la fase de Conclusiones:

- a) Analizar el valor científico o la posible utilidad de la resolución del problema planteado.
- b) Aplicar el principio bajo estudio a otras situaciones.
- c) Plantear nuevos interrogantes como consecuencia del trabajo realizado.

Como es lógico, cada Proyecto o Módulo de Investigación no puede incluir necesariamente todos y cada uno de los epígrafes relacionados, si bien la Programación en su conjunto deba ser tal, que los estudiantes atraviesen a lo

largo del curso por todas las conductas mencionadas y que les exija diferentes niveles de razonamiento.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, durante el curso académico 84-85 se elaboraron y ensayaron los siguientes cinco Módulos que se adjuntan en el ANEXO:

-PROYECTO DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN BIOQUIMICA:
Factores que influyen en la actividad enzimática.

-PROYECTO DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN BIOQUIMICA:
Cromatografía.

-PROYECTO DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN MICROSCOPIA:
Dinoflagelados del fitoplancton marino.

-PROYECTO DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN GENETICA:
Experiencias con mazorcas de maíz.

-PROYECTO DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN GENETICA:
Experiencias con plantas de tomate.

No obstante, es deseo de este equipo llegar a elaborar del orden de unos 12 Módulos de Investigación, para que cada estudiante, al comienzo del curso, pueda escoger aquellas investigaciones que le susciten mayor interés o bien aquellas más acordes con su propio proyecto de curriculum personal.

Para que el alumno pueda adquirir y perfeccionar las técnicas de trabajo intelectual inherentes al método científico, será preciso que cada trabajo experimental vaya acompañado de la redacción de un Informe que recoja las investigaciones realizadas, y en el que habrán de valorarse, no sólo los aspectos referentes a los contenidos, sino también a la forma de presentarlos. Correlativamente, ello implica la necesidad de que dichos informes sean detallada y escrupulosamente corregidos y devueltos, para discutir, caso por caso, las deficiencias encontradas y así plantear una vía de superación de las limitaciones de cada estudiante. Este aspecto nos ha parecido esencial para lograr que realmente desarrollen las capacidades y hábitos que se persiguen. De acuerdo con el documento "Reflections on writing in science", del Departamento de Educación del Estado de la Universidad de New York, una corrección integral de los trabajos experimentales debiera valorar los puntos siguientes:

CONTENIDOS

	INVESTIGACION 1			INVESTIGACION 2			INVESTIGACION 3			etc
	ACEPTAB.	NO ACEPTAB.	NO EVALUAB.							
1. PLANIFICACION -Identifica el problema a investigar -Hipotesis formuladas. -Explicaciones o referencias al diseno experimental. -Planifica controles adecuados.										
2. EJECUCION -Demuestra conocimiento de la tecnica. -Describe y observa con precision y completamente. -Realiza medidas cuantitativas. -Identifica variables dependientes e independientes.										
3. ANALISIS E INTERPRETACION -Transforma apropiadamente los datos en bruto. -Interpreta adecuadamente los datos observados. -Muestra las relaciones cualitativas. -Muestra las relaciones cuantitativas. -Analiza la precision de los datos. -Sugiere limitaciones que afectan a los datos. -Propone una generalizacion o modelo. -Justifica conclusiones.										
4. APLICACION -Integra conocimientos previos. -Sugiere hipotesis originales. -Sugiere aplicaciones contemporaneas.										

FORMA

	INVESTIGACION 1			INVESTIGACION 2			INVESTIGACION 3			etc
	ACEPTAB.	NO ACEPTAB.	NO EVALUAB.							
1. PERICIAS MECANICAS -Ortografia correcta. -Puntua correctamente. -Utiliza las mayusculas correctamente. -Escribe legiblemente.										
2. ELECCION DE PALABRAS -Utiliza las palabras correctamente. -Utiliza el vocabulario apropiado. -Utiliza un lenguaje concreto y claro (sin vulgarismos).										
3. ESTRUCTURA DE ORACIONES Y SINTAXIS -Estructura variada de las oraciones. -Utiliza oraciones completas. -Concuenda sujeto/verbo. -Uso adecuado de las conjunciones.										
4. TECNICAS GRAFICAS -Dibuja con precision. -Adapta los graficos de forma que sean comparables. -Rotula correctamente. -Presenta los datos de manera visualmente eficaz.										
5. ORGANIZACION DEL INFORME -Compone graficos internamente consistentes. -Interrelaciona ideas. -Sumariza y deduce ideas principales. -Articula y coordina un modelo coherente.										
6. COMPRENSION DEL EXPERIMENTO -Sigue las instrucciones del formato. -Se concentra en el tema excluyendo el material irrelevante. -Apoya las generalizaciones con ejemplos y detalla. -Demuestra comprension del objetivo.										

IMPLICACIONES ECONOMICAS

En ocasiones son aspectos aparentemente distantes de la Pedagogía los que condicionan decisivamente la posibilidad de introducir reformas cualitativas en la docencia. Sin pretender con ello justificar el inmovilismo que subyace en un cierto número de docentes -es bien conocido que, en ocasiones, con escasos medios pueden darse pasos de gigante-, es igualmente cierto que no basta con imaginación y voluntad para cambiar las "situaciones de hecho". Por otra parte, uno no puede escapar a la sospecha de que en momentos de crisis económica, es precisamente la Educación una de las actividades que mayores recortes experimenta en los presupuestos.

Es precisamente el aspecto económico el que de forma continua se echa en falta en la inmensa mayoría de las propuestas de renovación didáctica, olvidando que es un condicionante básico para la viabilidad de su implantación en los Centros. Por ello, nos ha parecido esencial analizar un factor limitante tan básico como es el relativo a los recursos económicos implícitos en toda reforma de los objetivos y métodos de la enseñanza. En dicho sentido, se han evaluado, aunque tan solo sea a título orientativo, los costes por alumno y año que ha supuesto el empleo de la metodología activa aquí reseñada.

A grandes rasgos, las cifras pueden sumarse de la siguiente manera:

-material de copistería.....	92.500
-proyectos experimentales:	
*material fungible.....	105.800
*material inventariable (inversion de 311.600, admitiendo una amorti- zación de cuatro años).....	<u>77.900</u>
	276.200

Puesto que la planificación se ha realizado en base a 90 alumnos entre los diferentes grupos experimentales, ello supone un coste por alumno y año de 3.067 pta. Aún prescindiendo de las necesidades de infraestructura -laboratorios, seminarios, fondos bibliográficos, etc.-, destaca a todas luces que una enseñanza activa es significativamente más cara que el modelo tradicional de enseñanza por transmisión verbal. Verosimilmente, la generalización del empleo de metodologías activas, acarrearía una disminución de los costos unitarios, pero es evidente que, en cualquier caso, los costes sobrepasan con creces las actuales posibilidades presupuestarias de las Cátedras experimentales; ello implica que esta vertiente económica va a constituir un serio condicionante para su generalización a todo el sistema educativo.

No obstante, consideramos que si realmente se desea avanzar hacia una reforma educativa global y coherente, esta

no puede basarse en el simple voluntarismo individual; será preciso sacar a los Centros de la penuria económica en que se encuentran, no ya para evitar las pretendidas justificaciones de la inactividad sino para posibilitar el cambio.

IMPLICACIONES EN LA ORDENACION ACADEMICA

a) En cuanto al Alumno:

Como es sabido, la relación entre motivación y aprendizaje es esencial y necesaria, de forma tal que entre ambos procesos existe una interacción según la cual la primera estimula el aprendizaje, y éste, a su vez, genera nueva motivación.

Igualmente, es una realidad constatada la ausencia de motivación entre el alumnado por varias razones, entre las que suelen mencionarse: el alejamiento de la enseñanza de los intereses reales de los estudiantes, la enseñanza excesivamente teórica, unos programas recargados con ausencia de tiempo para el ocio y la creatividad, un futuro laboral incierto, etc..

La metodología ensayada, por si sola, no puede superar toda la problemática mencionada, pero si paliar algunas de las deficiencias señaladas en el actual modelo educativo, especialmente en lo referente a la participación activa del alumno en la elaboración de sus propios conocimientos, y en el recorte del temario aproximandoles a una ciencia viva, en elaboración y

esencialmente práctica, con lo que ello conlleva de motivación.

Nos atreveríamos a afirmar que largos años en la escuela y en el bachillerato han adoctrinado al alumno con una metodología puramente receptiva en la que ciertamente no se encuentra a gusto, pero si le es familiar, conoce las reglas de juego y le supone un menor compromiso personal. Es obligado avanzar, por tanto, en una reforma de la organización del sistema que permita crear un ambiente de estudio que posibilite una simbiosis eficaz entre motivación y aprendizaje; en este sentido, creemos que puede considerarse como muy positiva la realización de este Proyecto por parte de los alumnos, especialmente en lo que concierne a los factores de motivación y de participación en la planificación de su propio quehacer, lo que concuerda con el hecho de que la valoración subjetiva que ellos realizan de la misma sea notoriamente favorable.

b) En cuanto al Centros:

Insistiendo en el punto anterior, la actual organización de los Centros potencia una enseñanza memorística y puramente pasiva por parte de los alumnos, por:

1. Masificación de las aulas: Es indudable que este punto tiene unas claras y directas concomitancias presupuestarias, pero aún con ello, se hace preciso rebajar el número de alumnos por aula a una cifra en torno a los 30; porque si bien para una metodología por transmisión este no es un problema de envergadura, para una enseñanza activa supone la posibilidad o no de realizar un verdadero trabajo de seguimiento del proceso de aprendizaje.

2. Rigidez de horarios: Con el actual sistema de 6-7 horas lectivas diarias, el alumno no tiene tiempo material mas que para recibir información, sin existir posibilidades horarias para actividades de consulta, laboratorio, discusión y elaboración de documentación. Consideramos que sería más apropiado un horario en el que las mañanas estén dedicadas a horas lectivas por asignaturas o áreas, y las tardes dedicadas a actividades educativas complementarias -lo que debe evitarse se confundan con secundarias-, tales como: actividades experimentales, consulta bibliográfica, consulta con profesores,

discusión en grupos, trabajo personal, etc..

Incidentalmente, ello supone que los actuales Seminarios deban remodelarse en lo referente a los espacios físicos, necesitándose además del laboratorio y del despacho de profesores, un Aula-Seminario para trabajo de y con los alumnos.

3. Recursos insuficientes: Es bien conocido que la mayor parte de los Centros reciben unos presupuestos anuales totalmente insuficientes, en los que los gastos de mantenimiento -luz, agua, gasoleo, etc.- llegan al 80% de los ingresos anuales. La actual situación en la que el presupuesto anual de los Seminarios en raras ocasiones supera las 25.000 pta es absolutamente incompatible con cualquier intento de verdadera reforma educativa.

c) En cuanto al Profesorado:

Es un hecho indudable que una mayoría de los docentes españoles no están -no estamos- familiarizados con el empleo de metodologías activas, hecho que puede ser generalizado a la Administración como un todo. En dicho

sentido, nos permitimos exponer aquella problemática que más ha incidido sobre nuestra experiencia:

1. La puesta en práctica de un proyecto de trabajo en el que la metodología activa es el factor dominante requiere, por parte del profesorado, una dedicación muy superior a la de la enseñanza tradicional. Contra lo que suele creerse y pueda parecer, la metodología activa implica la necesidad de una mayor preparación científica por parte del profesor, una mayor exigencia, especialmente en lo que concierne a la permanencia en el Seminario y dedicación a los alumnos, así como la necesidad de una elaboración previa y exhaustiva de todo el material didáctico que requiere este tipo de enseñanza. Además conviene destacar, y así lo expresan los alumnos, la importancia del seguimiento continuo del trabajo, a fin de analizar y discutir, sobre la marcha, los resultados de las pruebas que realizan, sus errores y dificultades, al objeto de orientar su aprendizaje y, al mismo tiempo, evitar el desaliento y la desorientación.
2. Secularmente se ha considerado, por parte de la Administración, a las clases prácticas como

clases de "segundo orden", que exigen menor entrega y menor competencia por parte del profesorado, lo que ha motivado que los laboratorios hayan permanecido cerrados y que únicamente, merced al voluntarismo de determinados profesores, algunos alumnos hayan podido tener algún contacto con estos aspectos enriquecedores en su formación, en igual o mayor medida que la sola información teórica.

Prueba de lo anterior lo constituyen las enormes dificultades que es preciso superar en la mayoría de los Centros para cualquier tipo de actividad fuera del mismo, o la rigidez de los horarios cuya falta de flexibilidad se extiende hasta el simple hecho de que los alumnos "se van" porque lo hacen los autobuses que los transportan.

Consideramos necesario que la Administración incluya dentro del horario lectivo las clases experimentales, con igual categoría y reconocimiento que las clases teóricas. No es necesario insistir que la preparación de las primeras requiere una dedicación adicional del profesorado muy superior a la de la preparación de las clases teóricas, por lo que se debiera

tener en cuenta este hecho y obrar en consecuencia.

3. Otro motivo de insatisfacción de este grupo de trabajo es la falta de reconocimiento y de apoyo por parte de la Administración hacia los profesores que, de una forma voluntaria, tratan de abrir nuevas vías en el proceso educativo.

Como siempre, es fácil buscar culpables en estamentos ajenos a los propios, y posiblemente cualquier generalización en este sentido puede ser injusta. No obstante, si nos atrevemos a confirmar como realidad objetiva el hecho de que la estructuración de la Administración es tal que potencia los obstáculos y minimiza los estímulos. Sirva como ejemplo el hecho de que la solicitud de impartir dos horas lectivas seguidas -a efectos de laboratorio- fue interpretada por un miembro de la Inspección como intento de justificar una menor dedicación al Centro (!). Por supuesto ello no supera la categoría de simple anécdota, pero no deja de poner de manifiesto las reticencias a las que ha de enfrentarse cualquier intento de innovación educativa.

Aunque ello desborda el campo de nuestro estudio, no ocultamos que nuestra impresión es que cualquier intento de generalización de estas metodologías, necesitaría ir acompañado de un claro apoyo institucional, en cuanto a la motivación del profesorado, apoyo que posiblemente debiera extenderse a:

-mejora de la infraestructura, posibilitando el acceso a documentación ya elaborada, inversión en equipamiento de los laboratorios y bibliotecas, el clima y posibilidad física de trabajo útil en el centro, etc.

-fabricación de material didáctico ad-hoc.

-y algún mecanismo institucional que promocióne al profesorado, tanto en lo que concierne al simple reconocimiento de su labor como en lo referente a concursos de méritos y traslados.

EVALUACION

Todo experiencia de investigación educativa debe incluir como componente sistemático de la misma la evaluación (interna y externa) de su propia validez. Evidentemente, el ideal sería que dicha evaluación fuese externa a la experiencia en cuestión -máxime cuando, como en este caso, se trata de analizar su posible valor para una generalización ulterior de la misma-. Al carecer de apoyo institucional se ha procurado elegir la tipología de evaluación de programas más rigurosa a nuestro alcance.

Se trata por tanto, de evaluar el posible valor discente de la metodología ensayada frente a las prácticas de laboratorio tradicionales, como potenciadora del proceso de aprendizaje en sus diversos aspectos, comprobando si supone una mejora significativa de las capacidades y hábitos reseñados en los puntos anteriores.

Para ello se han elaborado dos baterías de pruebas de semejante dificultad, a realizar por los alumnos al principio y al final de la experiencia. En su confección se han utilizado las obras de: Eysenk, Kirst y Diekmeyer, Clauster, Klausritzer, Drnicher, Guilford, Hunt, Thomson, Vinacke, Wertheimer, etc., y cuya pertinencia ha sido contrastada con un grupo de doscientos alumnos de características similares a

los que han realizado la experiencia.

Dichas baterías incluyen:

MeT

- 1.- En lo referente a la capacidad de observación y percepción de relaciones espaciales, descomposición de conceptos en partes y momentos, notas y relaciones etc.; ejercicios para medir objetivos tales como la capacidad de identificación, gradación de matices, diferenciación de oposiciones, división, situación, reducción y comparación.
- 2.- Ejercicios referidos a capacidades susceptibles de desarrollo y perfeccionamiento, como consecuencia de la práctica experimental.
- 3.- Datos acerca de la inteligencia natural de los alumnos participantes en la experiencia, si bien teniendo en cuenta aquellos aspectos (técnicas generales, procedimientos, sistematización, algoritmos, etc.), que dependen en mayor medida del aprendizaje.
- 4.- Una prueba de creatividad que incluye ejercicios referentes a producción de ideas, resolución de problemas, cambios de perspectiva, analogías, combinatoria e imaginación, que, aunque por su naturaleza no permiten una medición tan objetiva como las anteriores, se

calificaron de acuerdo con criterios uniformes y fijos, previa y claramente establecidos.

5.- Una prueba en la que los alumnos deban utilizar sus destrezas cognoscitivas para transformar datos en tablas, gráficos, ecuaciones o diagramas que permitan su análisis cualitativo o cuantitativo.

6.- Una prueba para valorar las destrezas de laboratorio.

7.- Una prueba de vocabulario biológico.

Para la realización de la experiencia se tomó una muestra de 140 alumnos pertenecientes tanto a Centros privados como a Institutos de Bachillerato del distrito universitario de Cantabria y distribuidos con arreglo a la siguiente estructura:

- 2 grupos experimentales:

*EXPERIMENTAL 1: I.B. "La Albericia" de Santander.

*EXPERIMENTAL 2: I.B. "J.O. Cano" de Los Corrales de Buelna (Santander)

- 2 grupos testigo:

*TESTIGO 1

*TESTIGO 2

Tanto los grupos experimentales como los grupos testigos realizaron al comienzo y al final del curso las correspondientes baterías de test. No obstante, debe señalarse que la aplicación de las pruebas finales presentó

serias dificultades debidas no sólo a la disminución del numero de alumnos, sinó también a la falta de rigidez a la hora de aplicar dichas pruebas y a las tensiones a que se encuentran sometidos los alumnos a final de curso, lo que repercute de forma notable a la hora de analizar y valorar los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en las pruebas iniciales y finales se muestran en la tabla siguiente:

TABLA DE RESULTADOS

	P. INICIALES		P. FINALES	
	media	desv. tipica	media	desv. tipica
<u>LOGICA</u>				
EXPERIMENTAL 1	20,697	4,896	25,905	3,853
EXPERIMENTAL 2	19,833	4,349	25,133	4,241
TESTIGO 1	23,303	3,224	20,966	4,709
TESTIGO 2	23,935	3,224	23,935	3,826
<u>RELACIONES ESPACIALES</u>				
EXPERIMENTAL 1	18,182	5,317	22,318	5,040
EXPERIMENTAL 2	20,611	4,373	23,800	3,936
TESTIGO 1	20,235	3,726	18,567	4,794
TESTIGO 2	20,618	4,722	19,258	4,436
<u>CREATIVIDAD</u>				
EXPERIMENTAL 1	6,000	2,651	5,217	2,875
EXPERIMENTAL 2	5,277	3,392	5,571	3,457
TESTIGO 1	5,486	2,268	6,275	2,281
TESTIGO 2	5,551	2,599	5,173	2,569
<u>OBSERVACION</u>				
EXPERIMENTAL 1	34,150	8,900	33,215	10,891
EXPERIMENTAL 2	30,800	7,850	28,889	12,998
TESTIGO 1	28,350	7,450	28,712	6,955
TESTIGO 2	47,300	8,230	47,601	6,570
<u>VOCABULARIO BIOLOGICO</u>				
EXPERIMENTAL 1	15,906	3,146	15,727	4,863
EXPERIMENTAL 2	18,555	4,704	20,143	5,718
TESTIGO 1	18,257	7,080	19,720	5,056
TESTIGO 2	18,486	3,887	21,161	4,807
<u>COMENTARIO DE TEXTO</u>				
EXPERIMENTAL 1	3,266	1,116	3,456	0,782
EXPERIMENTAL 2	4,507	0,968	3,730	1,522
TESTIGO 1	3,798	0,869	3,552	0,941
TESTIGO 2	4,537	0,968	4,265	0,958

RESULT

Como consecuencia de las dificultades indicadas anteriormente en la realización de las pruebas finales, consideramos improcedente el incluir un análisis pormenorizado de los resultados. No obstante, y por su interés general señalaremos:

- Existe una falta de adiestramiento en el análisis y comentario de textos científicos, que en términos generales no ha experimentado mejoría a lo largo del curso.

- Como pudiera sospecharse previamente, en las pruebas dirigidas a la evaluación de conocimientos, los resultados más bajos aparecen en aquellos Centros en los que su alumnado procede, en gran medida, de sectores socialmente deprimidos.

- Por el contrario, en las pruebas relativas a otras capacidades (lógica, relaciones espaciales) no se observan estas diferencias, sino que, por el contrario, los alumnos de estos últimos centros son los que obtienen mejores resultados. Se observan en estos casos pequeñas diferencias a favor de los grupos experimentales.

Lamentablemente, la metodología utilizada no permite extraer con confianza conclusiones más específicas; en el

transcurso de la realización del Proyecto se han puesto de manifiesto algunas serias limitaciones que sugieren la necesidad de investigaciones complementarias antes de que dichas conclusiones puedan ser enunciadas específicamente y con evidencia significativa. Tal y como señalaba Hunt en 1977 (*), un determinado método de enseñanza puede tener efectos marcadamente divergentes sobre los diferentes estudiantes. Un método de enseñanza que es efectivo con un determinado tipo de estudiante puede tener un pequeño efecto positivo -e incluso un efecto negativo- cuando es utilizado con otros estudiantes. Muchas de las "diferencias no significativas" observadas cuando se comparan métodos de enseñanza pueden ser debidas a que al contraponerse los efectos sobre los diferentes estudiantes el promedio se aproxima a cero. Variables tales como historial precedente, desarrollo cognoscitivo, estructura de la presentación y compatibilidad de grupo deben tenerse en cuenta en el diseño, instrumentación, implementación y evaluación de las experiencias de Laboratorio.

En una valiosa revisión acerca del papel del Laboratorio en la enseñanza de la Ciencia, Bates en 1978 (**) extrae las

(*) HUNT D.: Matching Models in Education. Monograph Series n.10. The Ontario Institute for Studies in Education. Toronto, Ontario. 1971.

(**) BATES G.C.: The Role of the laboratory in Secondary School Science Programs. What Research Says to the Science teacher. Volume 1; Mary Budd Rowe, Editor. National Science Teachers Association.

siguientes conclusiones:

"Dado el incremento en el costo de la enseñanza y las presiones solicitando una mayor eficiencia de la misma, es apropiado preguntarse si la contribución de las experiencias de laboratorio es algo único y suficientemente importante para justificar el gasto de dinero y tiempo. Las conclusiones provisionales realizadas son:

1.- Los métodos de enseñanza que se basan ya sea en la lectura, en la demostración o en el laboratorio, parecen igualmente efectivos para transmitir el contenido de una ciencia.

2.- Las experiencias de laboratorio son más eficaces para suministrar a los estudiantes habilidades para el manejo de instrumentación.

3.- Aún cuando la mayoría de las investigaciones han fracasado en cuanto a señalar que resultados pueden ser específicos del laboratorio, pueden desarrollarse medidas significativas acerca de la enseñanza mediante el trabajo en el laboratorio; este laboratorio parece representar un área del aprendizaje de la Ciencia significativamente diferente de la adquisición de contenidos.

4.- Algunos tipos de actividades de laboratorio orientadas hacia la investigación parecen ser mejores que la lectura/demostración o la verificación en el laboratorio para la enseñanza del proceso de investigación. Sin embargo, los profesores necesitan ser instruidos en los métodos de enseñanza basados en la investigación; se debería suministrar adiestramiento específico sobre la misma durante periodos prolongados. Los estudiantes necesitan tanto tiempo como asesoramiento para llegar a estar a gusto con los nuevos métodos y expectativas.

5.- Los laboratorios parecen tener potencial para promover actitudes positivas en el estudiante y para suministrar a una variedad de estudiantes mas extensa capacidades para tener éxito en la ciencia".

Los profesores que deseen que el laboratorio suponga algo especial para sus estudiantes deberán considerar cuidadosamente cuáles deben ser estos resultados, y entonces encontrar vías para medirlos. Aunque no sea mas que ello, este documento es una invitación sistemática en orden a responder a la pregunta que aún no ha sido respondida definitivamente: ¿Qué es lo que suministra el laboratorio que

no puede ser suministrado igualmente por otras alternativas menos costosas y que consuman menos tiempo?"

Constituye un objetivo prioritario de este equipo redactor el realizar una investigación más detallada en dicho sentido.

BASTIDA DE LA CALLE, M^A FELIX

RAMOS FERNANDEZ , FRANCISCO

SOTO LOPEZ, JULIO

~~II/605~~
I/605

**PROYECTO
DE
TRABAJO
EXPERIMENTAL
EN BIOQUIMICA**

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA
ACTIVIDAD ENZIMATICA**

BASTIDA DE LA CALLE, MARIA FELIX
RAMOS FERNANDEZ, FRANCISCO
SOTO LOPEZ, JULIO

SANTANDER-NOVIEMBRE - 1984

I N D I C E

- * INTRODUCCION
- * PRIMERA PARTE: ACTIVIDAD EXPERIMENTAL
 - I. Introducción
 - II. Instrucciones y precauciones generales
 - III. Investigaciones
- * SEGUNDA PARTE: ASPECTOS TEORICOS
- * APENDICE I: Instrucciones para la realización de los Informes

INTRODUCCION

El objetivo general de la presente actividad experimental será la familiarización con la metodología y técnicas de trabajo utilizadas en Bioquímica. Para ello se ha proyectado realizar una Investigación sobre la posible influencia de determinados factores en la actividad enzimática y, en su caso, sobre la forma en que lo hacen. Esta Investigación consta de seis experimentos agrupados en dos apartados.

OBJETIVOS A CONSEGUIR:

a) Objetivos específicos:

Como consecuencia de la realización de este proyecto de investigación, el alumno deberá conocer y comprender:

- Que los enzimas modifican la velocidad de las reacciones
- Que la velocidad de la catálisis enzimática no es fija, sino que varía de acuerdo con las condiciones del medio.
- Cómo afectan a la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente, factores tales como:
 - ‡ la concentración del enzima.
 - * la concentración del sustrato.
 - * el pH.
 - * la temperatura.
 - * la presencia de inhibidores y los tipos de inhibición.
- La especificidad enzimática y explicarla en términos del modelo llave-cerradura.

b) Objetivos operativos:

- Familiarizarse con la correcta utilización de:
 - * pipetas y probetas.
 - * indicadores.
- Ser capaz de preparar soluciones con exactitud.
- Recoger y elaborar resultados experimentales, representándolos gráficamente.
- Extraer conclusiones a partir de los datos obtenidos a lo largo de una investigación y formular hipótesis explicativas de los mismos.
- Determinar la precisión y las posibles fuentes de error de las observaciones realizadas.

PRIMERA PARTE: ACTIVIDAD EXPERIMENTAL

I. INTRODUCCION

En este proyecto de investigación trabajaremos con la Ureasa y la alfa-Amilasa, enzimas que han sido seleccionadas por suministrar buenos resultados sin necesidad de recurrir a un equipo sofisticado.

Como requisito previo deberán leerse cuidadosamente las instrucciones y precauciones generales que figuran en el apartado siguiente. Igualmente, a medida que se desarrolla la investigación, el alumno deberá ir familiarizándose con los diversos aspectos teóricos acerca de los enzimas y su modo de acción, para lo cual precisará consultar bibliografía. En la segunda parte de este documento se facilita una breve y sencilla documentación teórica que puede servir como punto de partida.

II. INSTRUCCIONES Y PRECAUCIONES GENERALES

A) Sobre la limpieza:

Todos los experimentos con enzimas requieren prestar una especial atención a la limpieza de los aparatos y material empleado, ya que indicios de metales o de álcalis pueden afectar a la actividad enzimática. Por ello, todos los aparatos y cristalería, especialmente los nuevos, deberán ser cuidadosamente lavados varias veces y enjuagados con agua destilada o desionizada. No deben utilizarse detergentes que contengan enzimas para lavar el material, a causa de que contienen proteasas que son de difícil eliminación durante el lavado y que pueden digerir la Ureasa y Amilasa.

Al final de cada sesión experimental debe lavarse todo el vidrio y no dejar esta tarea doméstica para otro día. La sujeción a estas reglas prevendrá los errores debidos a la contaminación de una solución con otra. Nunca se insistirá lo suficiente en la importancia de la limpieza en el trabajo de laboratorio.

B) Sobre las soluciones:

Siempre debe utilizarse agua destilada o desionizada para preparar las diferentes soluciones y reactivos.

Los enzimas se suministran en polvo y sus soluciones no son permanentes, una vez realizadas mantienen su actividad durante varios días si se conservan en un refrigerador, por ello habrá que prepararlas inmediatamente antes de realizar el experimento correspondiente.

Las soluciones enzimáticas no deben ser agitadas demasiado vigorosamente ya que es causa de desnaturalización y de inactivación, lo cual viene indicado por la excesiva espuma de las soluciones. Por la misma razón, deben agitarse suavemente las soluciones de Albúmina.

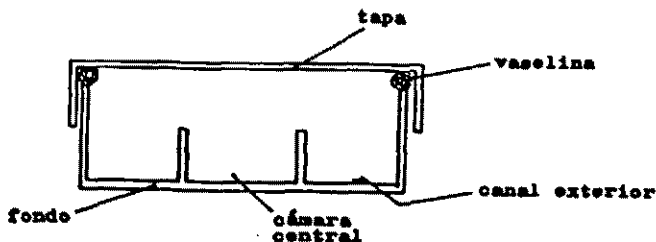
Cuando se trabaje con el enzima alfa-Amilasa, todas las pipetas deben taponarse en el extremo superior con algodón para prevenir la contaminación con la Amilasa salivar.

En los experimentos con Ureasa se utilizará un reactivo ácido ($\text{ClH } 0,1 \mu\text{mol/ml}$) que es sensible a indicios de álcali y puede volverse verde o azul si se utiliza vidrio sucio o agua de mala calidad. En este caso, añadir unas gotas de $\text{ClH } 0,01 \text{ N}$ hasta que se vuelva amarillo sin un tinte verdoso.

Cuando se utilicen el Metanol y la Ninhydrina debe tenerse especial precaución pues son productos venenosos.

C) Sobre las cápsulas de microdifusión:

Para la realización de algunos de los experimentos es necesario utilizar cápsulas de microdifusión. Dichas cápsulas son de plástico y están formadas por una tapa y un fondo. En el fondo de cada cápsula hay una cámara central y un canal exterior. Para utilizar la cápsula se quita primero la tapa y se aplica una capa de vaselina, de aproximadamente 1 mm. de espesor, en el borde superior del fondo. Aunque no se debe aplicar mucha vaselina, debe colocarse la suficiente para asegurar que, una vez depositados los reactivos correspondientes, cuando se coloca la tapa halla un sello estanco entre esta y el fondo. No se debe permitir que la vaselina manche las superficies internas del fondo de la cápsula. Únicamente se deberán manipular las superficies externas de la cápsula, con el fin de que las superficies internas no se contaminen con la grasa natural de la piel.



Después de utilizar las cápsulas de microdifusión deben ser lavadas y la vaselina retirada del borde superior del fondo. Debe tenerse especial cuidado para impedir que el interior del fondo quede graiento, por lo que es necesario lavar la cápsula con detergente seguido de un lavado completo varias veces en agua caliente.

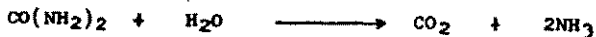
Durante los diferentes experimentos en que se utilizan cápsulas de microdifusión habrá que depositar un reactivo ácido en la cámara central, y diferentes soluciones (Urea, Ureasa, etc) en el canal exterior. Debe tenerse cuidado para que nada de la solución del canal exterior salpique a la cámara central. Un suave movimiento circular es el mejor para agitar, ya que minimiza el riesgo de derrame y asegura una mezcla homogénea de la cámara central.

D) Sobre las pipetas:

Siempre que se utilicen pipetas deberá tenerse extremado cuidado en reservar una pipeta para cada tipo de uso. Es decir, la pipeta marcada con "ENZIMA" deberá utilizarse exclusivamente con las soluciones del enzima correspondiente, y análogamente, la pipeta marcada con "SUSTRATO" sólo debe utilizarse con las soluciones del sustrato correspondiente. En caso de no disponer de un número suficiente de pipetas, una tercera puede ser reservada para otros usos generales. En todos los casos, cuando una pipeta ha sido utilizada con una solución determinada debe lavarse (por dentro y por fuera) al menos tres veces antes de utilizarla con una nueva solución, lo cual es extensivo a todos los experimentos, se empleen o no enzimas.

E) Sobre el cálculo de la actividad de la Ureasa:

La Ureasa cataliza la reacción:



La detección de la actividad enzimática se realiza por medio de un reactivo ácido (HCl 0,1 μ mol/ml) combinado con un indicador de pH, de forma que cuando el pH se neutraliza adquiere color azul.

El reactivo ácido se coloca en la cámara central y la solución de Urea (sustrato) en el canal exterior. La reacción enzimática se pone en marcha pipeteando la solución de Ureasa en el canal exterior, moviendo la pipeta a lo largo del canal para distribuir la Ureasa regularmente en la solución de Urea.

Se coloca la tapa y se presiona suavemente de forma que la vaselina forme un sello continuo.

A medida que se verifica la reacción enzimática se desprende Amoniaco que se difunde a la cámara central interna, donde es absorbido por el reactivo ácido. La absorción es más rápida en la periferia de la cámara interna y es necesario agitar suavemente la cápsula durante la reacción para asegurar una mezcla homogénea.

El ácido diluido de la cámara central cambia de color, primero al verde y luego al azul. Se toma como punto final cuando no hay gotas verdes en todo el reactivo ácido y su color es azul claro. Es conveniente colocar 1 ml. del ácido diluido en un tubo de ensayo vacío y añadir una pequeña cantidad de OHNa 1N (con una sola gota basta), el reactivo se vuelve azul y puede ser utilizado como referencia visual para comprobar y determinar el punto final de la reacción en la cámara de microdifusión.

Al terminar la experiencia las cápsulas y todo el material debe ser lavado.

Siempre hay que anotar el tiempo que lleva para que el color del reactivo ácido diluido llegue a azul. Dicho tiempo es el TIEMPO DE REACCIÓN, a partir del cual se podrá calcular la actividad del enzima.

Una UNIDAD INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD (U.I.A.) de cualquier enzima, viene definida como la cantidad de enzima que cataliza 1 μ mol de sustrato por minuto, bajo condiciones óptimas de pH y preferiblemente a 25°C.

La Ureasa cataliza la hidrólisis de la Urea liberando CO₂ y 2NH₃ por cada molécula de Urea hidrolizada. Por tanto se producen 2 μ moles de NH₃ por cada μ mol de Urea hidrolizado. Admitiendo que todo el NH₃ desprendido fuese absorbido por el reactivo ácido (recuerde que su concentración es de 0,1 μ moles/ml y que en la cámara central se han depositado 2 ml.), entonces el reactivo será neutralizado y se volverá azul cuando se hayan hidrolizado 0,1 μ moles de Urea.



Por tanto, cuanto más enzima añadamos más rápidamente se hidrolizará la Urea y más corto será el tiempo de reacción.

Si hubiese una U.I.A. en la cápsula de microdifusión, tardaría 0,1 minutos en hidrolizar 0,1 μ moles de Urea y producir 0,2 μ moles de Amoniaco, y (admitiendo un desprendimiento del 100% del Amoniaco, una difusión instantánea y un 100% de absorción por el reactivo ácido) neutralizar el ácido. Es decir, con una U.I.A. el tiempo de reacción sería de 0,1 minutos.

Si hubiese sólo $\frac{1}{2}$ U.I.A. en la cápsula, en 0,1 minutos sólo hubiese hidrolizado la mitad de la cantidad de Urea (0,05 μ moles) y tardaría el doble de tiempo: 0,2 minutos para la hidrólisis de 0,1 μ moles de Urea. Por ello con $\frac{1}{2}$ U.I.A. el tiempo de reacción sería de 0,2 minutos.

¿Podemos deducir alguna relación numérica entre la actividad y el tiempo de reacción?

F) Sobre el cálculo de la actividad de la Amilasa:

En los experimentos con Amilasa se utilizarán tubos de ensayo como recipientes para las reacciones. La reacción enzimática se pone en marcha cuando a la solución de Amilosa le añadimos la solución de alfa-Amilasa. Es preciso anotar la hora (con minutos y segundos) del momento en que se realiza dicha operación y a continuación agitar el tubo para mezclar el contenido enteramente, haciéndolo siempre con suavidad. Exactamente 1 minuto después de la adición de la Amilasa sumerja el extremo de una tira de papel indicador, corte el extremo mojado y repita la operación cada minuto.

En presencia de Amilosa (almidón), en la tira de papel indicador aparecerá un color azul/negro, pero a medida que se verifica la reacción la Amilosa es hidrolizada, y por ello el color cambia primero al marrón oscuro y posteriormente al marrón claro. Se toma este estado (marrón claro) para indicar reacción no coloreada en la tira de papel indicador. Una tira de papel indicador sumergida en agua puede ser utilizada como referencia standart.

Anote el tiempo transcurrido desde la adición de la solución de Amilasa hasta que la tira de papel indicador no de color. Dicho tiempo será el TIEMPO DE REACCION, el cual es una medida de la velocidad de acción del enzima.

La determinación de la actividad de la alfa-Amilasa en U.I.A. no es fácil puesto que éstas se refieren a micromoles de sustrato degradadas por minuto, y en este caso el sustrato (Amilosa) es un polímero de peso molecular indeterminado. Sin embargo la actividad de la alfa-Amilasa puede ser calculada en Unidades Arbitrarias de Actividad (U.A.A.), y en estos experimentos definiremos la U.A.A. como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 mgr. de Amilosa por minuto hasta el estado en que no aparece reacción coloreada detectable en las tiras de papel indicador.

En una solución de sustrato en que hubiese 80 mgr. de Amilosa (como las que vamos a utilizar), si hubiese 1 U.A.A. emplearía 80 minutos en completar la reacción enzimática medida con las tiras de papel indicador. Si hubiera 2 U.A.A. llevaría 40 minutos para completar la reacción.

¿Podemos deducir alguna relación numérica, según lo anteriormente señalado, entre las unidades de actividad y el tiempo de reacción?

III. INVESTIGACION

APARTADO PRIMERO:

EXPERIMENTO 1* (*)

Preparar las siguientes soluciones:

Tampón pH=7

Ureasa

Urea 0,75 M

Thiourea 1,0 M

Acido diluido (HCl 0,1 μ mol/ml.)

Preparar 3 cápsulas de microdifusión y numerarlas del 1 al 3. Pipetear 2ml. de la solución de ácido diluido en la cámara central de cada cápsula. Pipetear 2 ml de la solución de Urea 0,75 M en el canal exterior de las cápsulas nº 1 y 2; y pipetear 2 ml. de la solución de Thiourea 1,0 M en el canal exterior de la cápsula nº 3. No olvide lavar cuidadosamente esta pipeta antes de utilizarla nuevamente.

Añadir una gota del reactivo "Iodina" (Lugol) en el canal exterior de la cápsula 2.

Añadir 1ml de la solución de Ureasa en el canal exterior de cada una de las tres cápsulas, anotando el momento en que se hace (hora, minutos y segundos). Coloque las tapas y comience a agitar. Anote el tiempo de fin de la reacción.

Determinar la actividad de la Ureasa en cada cápsula y explicar lo sucedido.

(*) No olvide volver a leer detenidamente los apartados A,B,C,D y E de las Instrucciones y Precauciones.

EXPERIMENTO 2* (*)

Preparar las soluciones:

Tampón pH=7
Thiourea/Urea 75:25
Thiourea/Urea 50:50
Thiourea/Urea 0:100
Ureasa
Reactivo ácido diluido (HCl 0,1 μ mol/ml)

Preparar tres cápsulas de microdifusión y pipetear 2ml del reactivo ácido en la cámara central de cada cápsula. En los canales exteriores pipetear:

2 ml. de solución Thiourea/Urea 75:25 en la cápsula nº 1
2 ml. de solución Thiourea/Urea 50:50 en la cápsula nº 2
2 ml. de solución Thiourea/Urea 0:100 en la cápsula nº 3

Ahora añadir 1 ml. de la solución de Ureasa en el canal exterior de cada una de las cápsulas, anotar el tiempo, colocar las tapas y comenzar la agitación.

Anotar los tiempos de reacción, calcular la actividad del enzima en cada cápsula y llevar a un sistema de coordenadas los valores de actividad frente a los de concentración de Thiourea. Extraer conclusiones.

(*) No olvide volver a leer detenidamente los apartados A,B,C,D y E de las Instrucciones y Precauciones.

EXPERIMENTO 3* (*)

Preparar las soluciones:

Tampón pH=7
Urea 0,75 M
Urea 0,075 M
Urea 0,015 M
Ureasa
Acido diluido (HCl 0,1 μ mol/ml)

Preparar tres cápsulas de microdifusión y numerarlas del 1 al 3. Pipetear 2 ml. del reactivo ácido diluido en la cámara central de cada cápsula. En los canales exteriores pipetear:

2 ml de solución Urea 0,75 M en la cápsula nº 1
2 ml de solución Urea 0,075 M en la cápsula nº 2
2 ml de solución Urea 0,015 M en la cápsula nº 3

Añadir ahora 1 ml de la solución de Ureasa en los canales exteriores de las tres cápsulas. Anotar el tiempo, colocar las tapas y comenzar a agitar. Anotar los tiempos de reacción y calcular la actividad del enzima en cada cápsula.

Representar gráficamente los resultados (**), comentar la forma del gráfico, analizar los resultados y calcular (de forma aproximada) la K_m del enzima.

(*) No olvide volver a leer detenidamente los apartados A,B,C,D y E de las Instrucciones y Precauciones.

(**) Puesto que la solución contiene 2 ml de Urea y 1 ml de solución del enzima, la concentración final de Urea en dicha solución es de 0,5 M en la cápsula 1; 0,05 M en la cápsula 2 y 0,01 M en la cápsula 3.

EXPERIMENTO 4: (*)

Preparar las siguientes soluciones:

Tampón pH=7

Ureasa

Ureasa diluida $\frac{1}{2}$

Ureasa diluida $\frac{1}{4}$

Urea 0,75 M

Acido diluido (HCl 0,1 μ mol/ml)

Preparar tres cápsulas de microdifusión y numerarlas del 1 al 3. Pipetear 2 ml del reactivo ácido en la cámara central de cada cápsula, pipetear 2 ml de Urea 0,75 M en el canal exterior de cada cápsula. En las cámaras exteriores de cada cápsula pipetear:

1 ml de la solución de Ureasa sin diluir en la cápsula nº 1

1 ml de la solución de Ureasa diluida $\frac{1}{2}$ en la cápsula nº 2

1 ml de la solución de Ureasa diluida $\frac{1}{4}$ en la cápsula nº 3

Anotar el tiempo, colocar las tapas y comenzar la agitación. Anotar los tiempos de reacción, calcular la actividad del enzima en cada cápsula y representar gráficamente los resultados. Comentar los resultados y extraer conclusiones.

(*) No olvide volver a leer detenidamente los apartados A,B,C,D y E de las Instrucciones y Precauciones.

APARTADO SEGUNDO

EXPERIMENTO 3: (*)

Preparar las soluciones:

- Tampón pH=7
- Tampón pH=4
- Tampón pH=9
- Tampón pH=5,9
- Tampón pH=6,5
- Tampón pH=7,9
- Tampón pH=8,3
- Amilosa (40 mgr/ml)
- Amilasa diluida

Añadir 2 ml de la solución de Amilosa a cada uno de los siete tubos de ensayo: A, B, C, D, E, F y G.

Añadir 2 ml. de la solución	Tampón	pH=5,9	al tubo	A
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"

Añadir 1 ml de la solución de Amilasa diluida a cada uno de los tubos y utilizar Tiras de papel indicador a intervalos de 1 minuto para determinar el tiempo de reacción en cada tubo.

Calcular la actividad del enzima en cada tubo, representar gráficamente los resultados y extraer conclusiones.

(*) No olvide volver a leer detenidamente los apartados A,B,D y F de las Instrucciones y Precauciones.

EXPERIMENTO 6: (*)

Preparar las soluciones:

Tampón pH=7
Amilosa
Amilasa diluida

Colocar de 3 a 4 ml de la solución de Amilasa en cada uno de cuatro tubos de ensayo.

Situar los tubos en un baño de agua hirviendo enérgicamente. Al cabo de 2 minutos sacar el tubo nº 1 y sumergirle en un baño de agua fría; al cabo de tres minutos hacer lo mismo con el tubo nº 2; al cabo de cuatro minutos hacer lo mismo con el tubo nº 3, y al cabo de cinco minutos lo mismo con el tubo nº 4.

Preparar 5 tubos (A,B,C,D,E) conteniendo cada uno 2 ml de la solución de Amilosa y 2 ml de solución tampón pH=7. Añadir:

1 ml de Amilasa sin calentar al tubo A
1 ml del enzima del tubo nº1 al tubo B
1 ml del enzima del tubo nº2 al tubo C
1 ml del enzima del tubo nº3 al tubo D
1 ml del enzima del tubo nº4 al tubo E

Agitar bien cada tubo para mezclar completamente los contenidos y utilizar Tiras de papel indicador a intervalos de un minuto para determinar el Tiempo de Reacción para cada tubo. Calcular la actividad del enzima en cada tubo. Representar gráficamente los resultados y extraer conclusiones.

(*) No olvide volver a leer detenidamente los apartados A,B,D y F de las Instrucciones y Precauciones.

Una de las características más sorprendentes de los organismos vivos es su capacidad para llevar a cabo una gran variedad de reacciones químicas. Con su alimentación, cada organismo capta como nutrientes una diversidad de moléculas que podrán utilizar ya sea como fuente de energía para realizar las distintas modalidades de trabajo celular, o bien como precursoras de los centenas o miles de biomoléculas estructurales o funcionales de las células, moléculas tan diferentes como un anticuerpo proteico, una hormona esteroide o un ácido nucleico. Así pues, mientras dura su vida, todo organismo es la sede de una actividad incesante que implica tanto procesos de biosíntesis de los componentes celulares, como de su degradación y eliminación. Globalmente toda esta actividad bioquímica la incluimos bajo la denominación de metabolismo celular, y dado que el metabolismo procede de forma escalonada a través de numerosos compuestos intermediarios, con frecuencia se emplea el término de metabolismo intermediario para designar a sus diversas rutas bioquímicas. Los productos intermedios del metabolismo se llaman también metabolitos.

Ahora bien, gran parte de las reacciones que intervienen en el metabolismo celular, o bien no se realizan espontáneamente fuera de la célula -a la temperatura, presión y pH que caracterizan al medio viviente- o bien lo hacen con un ritmo incompatible con las necesidades de los seres vivos. Cabe, por tanto, preguntarse como es posible que aún los organismos más sencillos puedan llevar a cabo esta química tan compleja que humillaría al químico más competente. Ello se debe a que los millares de reacciones de síntesis y degradación necesarios para el mantenimiento y supervivencia de la especie, ofrecen la particularidad de efectuarse y regularse por obra de catalizadores específicos que llamamos enzimas y que pueden definirse como prótidos dotados de actividad catalítica específica y capaces de actuar tanto dentro como fuera de la célula u organismo que los produce.

Como ejemplo de lo anterior podemos considerar la hidrólisis del azúcar común de mesa: la Sacarosa. Una molécula de Sacarosa se compone de una molécula de glucosa junto a una molécula de fructosa. Es muy fácil romper la Sacarosa en glucosa y fructosa por hidrólisis; esto ocurre muy lentamente cuando la sacarosa se disuelve en agua, pero se acelera bastante calentando la solución de sacarosa con un ácido, por ejemplo el ácido clorhídrico. En este caso el ácido está actuando como un catalizador. En la célula viva, donde las reacciones tienen lugar sin ácidos ni calor, la hidrólisis de la sacarosa se lleva a cabo gracias al enzima invertasa. En presencia de Invertasa una solución de sacarosa se convierte rápidamente en una solución de glucosa y fructosa, sin necesidad de ácido ni calor.

Ahora bien, basta pensar en la gran cantidad de enzimas presentes en cualquier célula, y en la extrema diversidad de sus funciones, para que nos demos cuenta de que la suma de sus actividades conduciría a un verdadero caos, a no ser que existan mecanismos encargados de coordinar sus actividades en un sistema coherente.

Así como en los animales el sistema nervioso y el sistema endocrino aseguran la coordinación en el funcionamiento de los órganos y tejidos, es decir, la coordinación entre células, también será preciso que en el seno de cada célula exista una red cibernética que asegure la coherencia funcional de la maquinaria química intracelular. Ello es obra de los enzimas denominados alostéricos que juegan el papel de detectores e integradores de la información química.

Así pues, los enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, y entre sus propiedades más significativas, destacaremos:

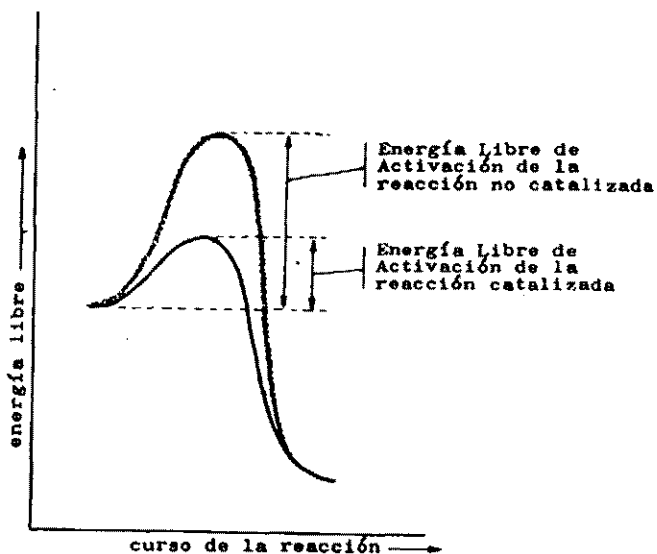
- * Su eficiencia o eficacia catalítica, muy superior a la de los catalizadores no biológicos. Se ha podido estimar que las reacciones catalizadas enzimáticamente tienen lugar a velocidades que son por lo menos 10^7 veces mayores que las correspondientes reacciones no catalizadas. Con el número de recambio (turn-over) expresamos el número de moléculas de sustrato transformadas por minuto por una sola molécula de enzima. Este número es del orden de 10^3 a 10^6 .
- * Su extraordinariamente alta especificidad, y que comprende un doble aspecto: por una parte, cada enzima solo cataliza un tipo particular de reacción química, y por otro, cada enzima es más o menos estrictamente específico de un cierto sustrato e incluso, en ocasiones, actúan sobre un determinado compuesto, al tiempo que carecen de acción sobre sus estereoisómeros.
- * Los enzimas están sometidos a un doble sistema de regulación:
 - Un sistema de control de su síntesis (Teoría del Operón, que veremos en temas posteriores).
 - La activación (o inhibición) de los enzimas presentes (enzimas alostéricos, véase pag).

Energía Libre de Activación

Una reacción química, tal como $S \longrightarrow P$, tiene lugar porque, en cualquier instante, una cierta proporción de la población de moléculas S posee la suficiente energía como para encontrarse en un estado activado, llamado estado de transición, en el que la probabilidad de que se establezca o se rompa un enlace químico para formar el producto P es máxima. Este estado de transición reside en la cima de la barrera de energía que separa a los reaccionantes y a los productos.

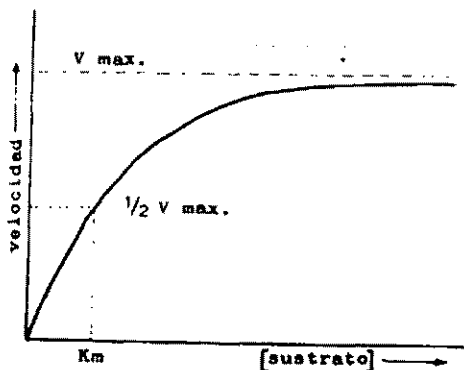
La Energía Libre de Activación es la cantidad de energía necesaria para llevar a todas las moléculas de un mol de S al estado de transición.

Después bien, los catalizadores aceleran las reacciones químicas porque disminuyen la energía de activación. El enzima se combina con el sustrato y se produce un estado de transición de menor energía de activación que el correspondiente a la reacción no catalizada.



Velocidad de las reacciones enzimáticas

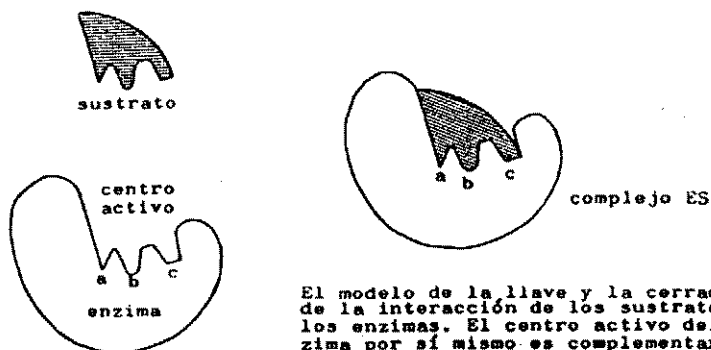
Un rasgo característico de las reacciones catalizadas por enzimas es el de que la velocidad de catálisis $-v-$ varía con la concentración de sustrato en la forma que muestra la figura. Como puede verse, para una concentración dada del enzima, si la concentración del sustrato es pequeña, la velocidad de la reacción es casi proporcional a la $[S]$. Cuando la concentración del sustrato es alta, la velocidad de la reacción llega a ser prácticamente independiente de la $[S]$ y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante.



Este efecto de saturación condujo a formular la hipótesis de que el enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo enzima-sustrato -ES-, que podrá exci dirse formando el producto -P- y liberando E.



Ya hemos indicado que la mayoría de los enzimas son altamente selectivos con respecto a los sustratos, lo que verosimilmente está relacionado con su conformación tridimensional. Podemos imaginar que la molécula del enzima (actuando a la manera de una cerradura) tiene una cavidad en la que encaja la molécula del sustrato (la llave), y sólo cuando el sustrato está alojado en el lugar correcto puede verificarse la interacción catalítica.



El modelo de la llave y la cerradura de la interacción de los sustratos y los enzimas. El centro activo del enzima por sí mismo es complementario a la forma del sustrato.

La región específica del enzima que contacta con el sustrato y que participa directamente en la ruptura y producción de enlaces se denomina centro activo y un enzima sólo actuará sobre un sustrato cuando dicha sustancia pueda establecer la correcta relación. Es decir, si la molécula no encaja en el centro activo no tiene lugar la reacción catalizada, e incluso aún cuando haya encajado, será necesario un correcto alineamiento de las cargas eléctricas entre el enzima y el sustrato.

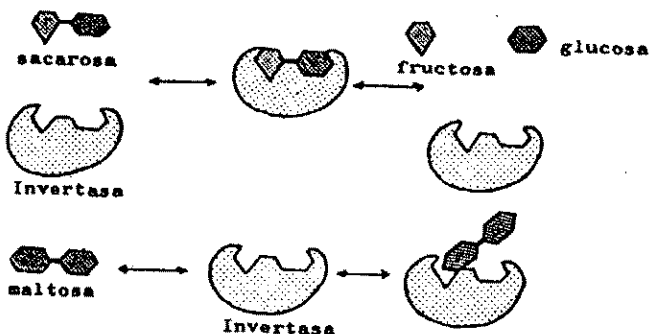
No obstante, se ha encontrado que algunos enzimas experimentan un cambio de su conformación tridimensional cuando se unen a sus sustratos. El "anclaje inducido" del enzima con el sustrato que modernamente se propone, determinaría la alineación y la orientación precisas de los grupos catalíticos y de unión necesarios para producir la reacción. Este cambio de conformación del enzima podría originar también una torsión o una compresión en la molécula del sustrato y hacerlo, de este modo, más susceptible al ataque catalítico. Así mismo, otra función del cambio de conformación inducido por el sustrato, podría ser la de hacer posible la eliminación de los productos de la reacción del centro activo, después de lo cual la conformación del enzima puede volver a su estado inicial.

Los enzimas no catalizan únicamente reacciones de disgregación de un determinado sustrato, sino que también pueden catalizar reacciones de síntesis o la transferencia de partes de una molécula a otra (véase figura). En estos casos es posible que el factor más importante implicado en la reacción sea el que dos (o más) moléculas sustrato sean puestas en contacto íntimo.

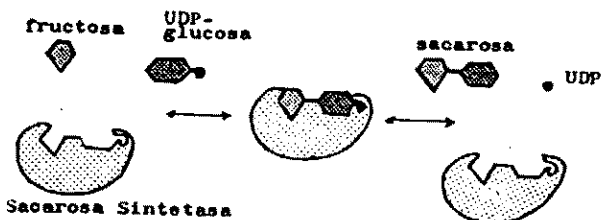
El modelo de la llave y la cerradura para la acción enzimática

- a) Invertasa
- b) Sacarosa Sintetasa

a)



b)



La formación del complejo ES es, en gran medida un proceso aleatorio, ya que en una solución las moléculas del enzima y del sustrato se encontrarán en movimiento casual y descontrolado, chocando unas con otras aleatoriamente. Bajo condiciones favorables, una cierta colisión lleva a la formación del complejo ES, con lo que se induce la reacción dando origen a los productos de misma y a la liberación del enzima apto para formar un nuevo complejo ES.

Modificación de la actividad enzimática

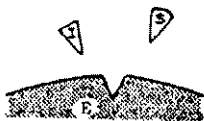
La actividad de los enzimas puede ser afectada por diversos factores, así como por metabolitos específicos, y podemos decir que, desde un punto de vista genérico, un activador es aquél que aumenta la velocidad de la reacción enzimática, y un inhibidor el que disminuye la velocidad de la misma; pudiendo distinguir entre:

- * Inhibición competitiva. El inhibidor puede combinarse con el enzima libre, de tal modo que compete con el sustrato normal para unirse al centro activo, y por tanto la unión del enzima al sustrato o al inhibidor competitivo son acontecimientos mutuamente excluyentes.

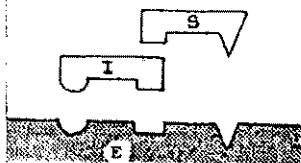
Así, por ejemplo, la Ureasa actúa sobre la Urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ y no lo hace sobre la Thiourea $\text{CS}(\text{NH}_2)_2$. En el caso de que ambas estén presentes, la Thiourea es tan parecida al verdadero sustrato, la urea, que puede ocupar el centro acti

vo y mientras permanezca en el mismo no dejará que lleguen al mismo las moléculas de Urea. Así pues, la Thicurea actúa como inhibidor competitivo ya que disminuye la velocidad de la catálisis al reducir la proporción de moléculas de enzima ligadas al sustrato.

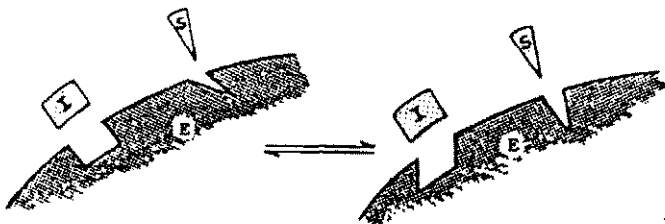
Los esquemas siguientes visualizan diversas posibilidades acerca del mecanismo de interacción.



Tanto el inhibidor como el sustrato encajan en el centro activo del enzima.

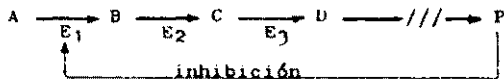


Inhibidor y sustrato compiten por un lugar distinto al centro activo del enzima



La molécula del enzima puede oscilar entre dos conformaciones espaciales. En una de ellas reconoce y se une al sustrato; en la otra, reconoce y se une al inhibidor, al tiempo que no puede hacerlo con el sustrato

Frecuentemente la inhibición de un enzima es utilizada como mecanismo de regulación de la actividad del mismo. El enzima que cataliza la primera etapa de una vía metabólica es inhibido por el producto final



Así, la Galactosidasa, que hidroliza galactósidos liberando Galactosa, es inhibida por la propia Galactosa.

La inhibición selectiva de los enzimas es la base de la acción de algunos medicamentos. Así, las Sulfamidazoles ejercen su acción medicamentosa porque inhiben los enzimas relacionados con el metabolismo del ácido p-amino-benzoico.

Este compuesto es un componente vital del metabolismo de muchas bacterias, pero no de la especie humana, de forma que la inhibición de dichos enzimas interfiere el metabolismo bacteriano pero no el humano.

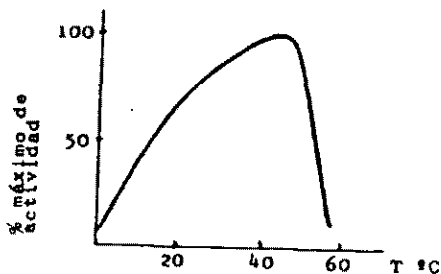
- * En la inhibición no competitiva el inhibidor no actúa disminuyendo la proporción de moléculas enzimáticas ligadas al sustrato (como en el caso anterior), sino disminuyendo el número de recambio (turn-over) del enzima. La inhibición, por tanto, depende fundamentalmente de la concentración del inhibidor, sin que importe la concentración del sustrato.

Los enzimas que se denominan SH-activos (como la Ureasa) por necesitar un grupo sulfhidrilo libre en el centro activo son extremadamente sensibles a la inhibición por cationes de metales pesados (Pb^{++} , Hg^{++} , Ag^+ , etc.). Los cianuros son inhibidores de los enzimas oxidativos, ya que forman complejos con sus coenzimas. Son estas razones por las que compuestos como el plomo, el mercurio y el cianuro son venenosos para muchos organismos.

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Quando se relaciona la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura, se han de considerar dos efectos antagónicos. De un lado, la elevación de la temperatura se traduce en una aceleración de las reacciones químicas, y las reacciones catalizadas por enzimas no hacen excepción a esta regla. Ello es consecuencia de que el aumento de la temperatura da lugar a un incremento de la movilidad de las moléculas, facilitando por tanto que alcancen el estado de transición.

De otra parte, los enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por la acción del calor y se inactivan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa un cierto punto, lo que permite explicar el pico que se observa en la gráfica.



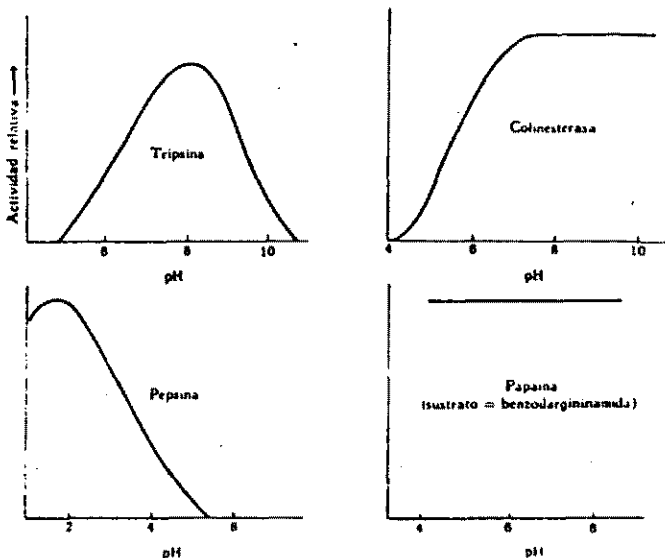
Frecuentemente bastan temperaturas de 55-60 °C para producir inactivación térmica de los enzimas, aunque no falten las excepciones (bacterias termocidófilas). En cualquier caso su máximo de actividad se encuentra dentro del margen de temperaturas a que están adaptados los organismos.

Los efectos de las radiaciones, ultrasónicas, rayos X, neutrones, etc. suelen ser también inactivantes y muy enérgicos, como resultado de su acción desnaturalizante.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La mayoría de los enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye. En cualquier caso, no hay que olvidar que el pH fisiológico de los organismos se mantiene sensiblemente constante.

Aunque el perfil de la curva de actividad en función del pH es frecuentemente acampanado, no faltan las excepciones.



Los efectos del pH sobre la actividad de los enzimas pueden ser explicados en función de:

- * A que la variación del pH provoca cambios en la ionización (carga) de ciertos aminoácidos, lo que puede traducirse en cambios en el centro activo, lo que implica desnaturalización del enzima.
- * A que afecte a la carga del sustrato.

Metabolismo del Nitrógeno

La degradación de las proteínas conduce a la liberación de aminoácidos, los cuales, a su vez, pueden ser degradados por diversas vías metabólicas hasta compuestos más sencillos. Los productos de la degradación de los aminoácidos son los cetoácidos y el amoníaco. Los cetoácidos pueden ser utilizados para construir nuevos aminoácidos o pueden ser aún más degradados en las rutas del metabolismo de los hidratos de carbono y de los ácidos grasos. Por otro lado, el amoníaco es un producto tóxico y debe ser neutralizado o eliminado de algún modo. Una porción de él se usa inmediatamente para la síntesis de nuevos aminoácidos, otra porción puede ser guardada para usos futuros incorporándose a diversos compuestos, y finalmente, lo que queda puede ser convertido a pro

ductos menos tóxicos como la Urea o el ácido Úrico. Estos compuestos se forman principalmente en el hígado y son transportados por el torrente circulatorio hasta los riñones donde son filtrados y excretados en la orina junto con algo de amoníaco.

La Ureasa, de algún modo, es un enzima peligroso para los animales, ya que si dicho enzima estuviese en la sangre convertiría la urea de ésta en anhídrido carbónico y amoníaco, y esto envenenaría al animal. La Ureasa es así un enzima no típico de los animales. Una porción de la urea excretada por los animales llega al suelo, así que no es difícil ni sorprendente encontrar bacterias del suelo productoras de Ureasa.

El enzima produce amoníaco que es utilizado por la bacteria para sintetizar aminoácidos y otros compuestos que contienen nitrógeno. Como resultado de la producción bacteriana de Ureasa, este enzima se encuentra en la mayoría de los suelos, y su cantidad depende de cómo de activas sean sus bacterias, lo cual a su vez depende de un elevado número de factores como son el pH del suelo, los métodos de cultivo y fertilización, etc.

Un hecho sorprendente es que muchos tejidos vegetales (frutas de leguminosas, semillas de melón, etc.) contienen extremadas cantidades de Ureasa sin razón aparente. No utilizan Urea como fuente de nitrógeno ni externa ni internamente, así que no parece que adquieran ninguna ventaja conservando una proporción considerable de sus síntesis proteicas como provisión de Ureasa. Sigue siendo un enigma.

Metabolismo del Almidón

El almidón es un compuesto alimenticio importante en la nutrición humana, actuando como fuente básica de energía. Se forma en las plantas y es una mezcla de dos hidratos de carbono complejos de elevado peso molecular: la amilosa y la amilopectina.

La amilosa está constituida por moléculas de glucosa unidas en cadenas, de forma que cada cadena contiene alrededor de 200-300 residuos de glucosa unidas por enlaces alfa 1-4. Cada cadena esta en forma de hélice en donde hay 6-7 residuos de glucosa por vuelta. Las moléculas de Iodo pueden ser acopladas a la hélice, y en esta posición aportan un color azul a la amilosa (Reacción del Lugol). La amilopectina también esta formada por moléculas de glucosa pero, a diferencia de la amilosa, se unen en cadenas con múltiples ramificaciones, en las que cada ramal contiene de 24-30 residuos de glucosa. En la amilopectina las moléculas de glucosa se unen por enlaces alfa 1-4, salvo en los puntos de ramificación donde se dan enlaces alfa 1-6. La amilopectina también da una reacción coloreada con el Lugol.

La amilosa y la amilopectina pueden ser atacadas por la acción de varios enzimas, generalmente la alfa-amilasa y la beta-amilasa. La beta-amilasa hidroliza los enlaces alfa 1-4 empezando desde los extremos de las cadenas, de tal forma que libera maltosas (dos moléculas de glucosa unidas). La alfa-amilasa también hidroliza enlaces alfa 1-4, pero actúa sobre las moléculas de amilosa y amilopectina en puntos de sus cadenas al azar, de forma que no libera unidades sino pequeñas cadenas irregulares. Durante este proceso de hidrólisis enzimática las propiedades de coloración con el Iodo se pierden.

La alfa-amilasa se encuentra en muchos organismos, incluyendo mamíferos, plantas y bacterias. En muchos animales, incluido el hombre, se produce en las glándulas salivares y en el jugo pancreático, así que es el primer enzima que entra en contacto con los alimentos ingeridos.

APENDICE III: INSTRUCCIONES PARA LA REALIZACION DE LOS INFORMES:

En todo informe habrá que diferenciar dos aspectos igualmente importantes: el contenido y la forma.

En lo concerniente a los contenidos, cada informe habrá de contar con los siguientes apartados:

- 1) Planificación. En el cual se describe la situación pre-laboratorio: se define el problema a estudiar, se formulan cuestiones, hipótesis, se diseñan los diferentes experimentos, los procedimientos de trabajo, se seleccionan los aparatos e instrumental a utilizar, se describen las técnicas, se busca bibliografía, etc.
- 2) Ejecución. Se describen las situaciones que tienen lugar durante la ejecución de los experimentos o actividades previamente planificadas. Igualmente, se describen las observaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, que han sido registradas o calculadas a medida que se manipula y desarrolla la actividad.
- 3) Análisis e Interpretación. Transformación de los datos, representación de los mismos en forma de tablas, gráficos o ecuaciones que permitan su análisis cualitativo o cuantitativo. Se explican suposiciones subyacentes a una interpretación, se realizan comparaciones estadísticas de errores o probabilidades, se determinan correlaciones cualitativas o cuantitativas, se proponen sugerencias sobre errores, limitaciones o supuestos que afecten a los datos recogidos. Proposición de una generalización o modelo, etc.
- 4) Aplicación. Valoración de la posibilidad de aplicación a otras situaciones del principio bajo estudio, exponiendo tal predicción en términos de hipótesis verificables. Sugerencias acerca de las aplicaciones contemporáneas, etc..

Finalmente, habrá que poner especial cuidado en los aspectos referidos a la forma (vocabulario y sintaxis, representación gráfica, organización general, presentación, coherencia y comprensión general de la actividad).

**PROYECTO
DE
TRABAJO
EXPERIMENTAL
EN BIOQUIMICA**

CROMATOGRAFIA

BASTIDA DE LA CALLE, MARIA FELIX
RAMOS FERNANDEZ, FRANCISCO
SOTO LOPEZ, JULIO

SANTANDER - NOVIEMBRE - 1984

PRIMERA PARTE: ACTIVIDAD EXPERIMENTAL

I. INTRODUCCION

El objetivo general de la presente actividad experimental consiste en la familiarización con la metodología y técnicas de trabajo utilizadas en Bioquímica. Para ello se ha proyectado realizar una Investigación que ponga de manifiesto el fundamento de la cromatografía, como método empleado para la separación e identificación de compuestos biológicos.

En este proyecto de investigación utilizaremos el enzima Tripsina en tres experimentos diferentes.

Como requisito previo deberán leerse cuidadosamente las instrucciones y precauciones generales que figuran en el apartado siguiente. Igualmente, a medida que se desarrolla la investigación, el alumno precisará adquirir determinados conceptos teóricos acerca de los enzimas, su modo de acción y la base de las técnicas cromatográficas, para lo cual deberá consultar la bibliografía correspondiente. En la segunda parte de este documento se facilita una breve y sencilla documentación teórica que puede servir como punto de partida.

Objetivos operativos:

- Familiarizarse con la correcta utilización de:
 - * pipetas y probetas.
 - * indicadores.
- Ser capaz de preparar soluciones con exactitud.
- Recoger y elaborar resultados experimentales, representándolos gráficamente.
- Extraer conclusiones a partir de los datos obtenidos a lo largo de una investigación y formular hipótesis explicativas de los mismos.
- Determinar la precisión y las posibles fuentes de error de las observaciones realizadas.

II. INSTRUCCIONES Y PRECAUCIONES GENERALES

A) Sobre la limpieza:

Todos los experimentos con enzimas requieren prestar una especial atención a la limpieza de los aparatos y material empleado, ya que indicios de metales o de álcalis pueden afectar a la actividad enzimática. Por ello, todo el instrumental, especialmente el nuevo, debe ser cuidadosamente lavado varias veces y enjuagados con agua destilada o desionizada. No deben utilizarse detergentes que contengan enzimas para lavar el material, ya que las proteasas que éstos contienen son difíciles de eliminar durante el lavado y pueden digerir a los enzimas empleados en la experiencia.

Al final de cada sesión experimental debe lavarse todo el vidrio, no dejando esta labor doméstica para otro día. La sujeción a estas normas prevendrá los errores debidos a la contaminación de una solución con otra. Nunca se insistirá lo suficiente en la importancia de la limpieza en el trabajo de laboratorio.

B) Sobre las soluciones:

Siempre debe utilizarse agua destilada o desionizada para preparar las diferentes soluciones y reactivos.

Los enzimas se suministran en polvo y sus soluciones no son permanentes. Una vez realizadas mantienen su actividad durante varios días si se conservan en refrigerador, por ello habrá que prepararlas inmediatamente antes de realizar el experimento correspondiente.

Las soluciones enzimáticas no deben ser agitadas demasiado vigorosamente ya que ello es causa de desnaturación y de inactivación, lo cual viene indicado por la excesiva espuma de las soluciones. Por la misma razón, deben agitarse suavemente las soluciones de Albúmina.

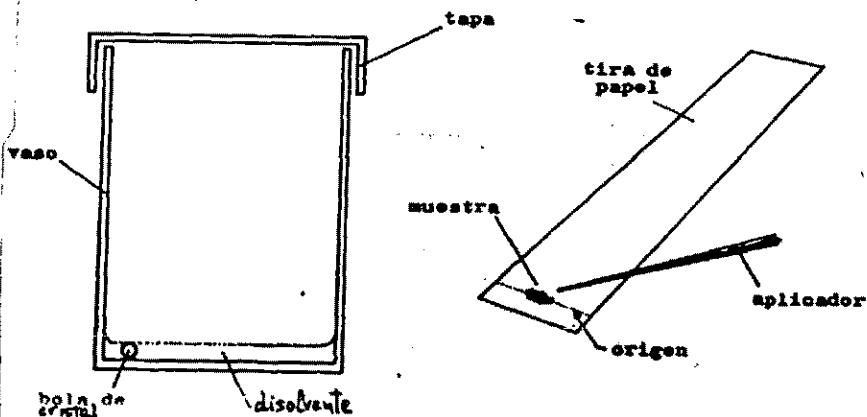
Quando se utilice el Metanol y la Ninhydrina debe tenerse especial precaución pues son productos venenosos.

C) Sobre las pipetas:

Siempre que se utilicen pipetas deberá tenerse extremo cuidado en reservar una pipeta para cada tipo de uso. Es decir, la pipeta marcada con "ENZIMA" deberá utilizarse exclusivamente con las soluciones del enzima correspondiente, y análogamente, la pipeta marcada con "SUSTRATO" sólo

debe usarse con las soluciones del sustrato correspondiente. En caso de no disponer de un número suficiente de pipetas, una tercera puede ser reservada para usos generales. En todos los casos, cuando una pipeta ha sido utilizada con una solución determinada debe lavarse (por dentro y por fuera) al menos tres veces antes de utilizarla con una nueva solución, lo cual es extensivo a todos los experimentos, se empleen o no enzimas.

D) Sobre los Cromatogramas:



La cromatografía es un método utilizado para la separación de sustancias químicamente similares. El principio básico consiste en aplicar la mezcla de compuestos a estudiar a una fase estacionaria (sea sólida o líquida). Una fase móvil (líquida o gas) atraviesa la fase estacionaria. Los compuestos de la mezcla se separarán según su relación de solubilidad entre la fase estacionaria y la fase móvil.

En la cromatografía de papel, éste actúa como soporte de la fase estacionaria acuosa, siendo la fase móvil un disolvente orgánico. La técnica general es la siguiente:

Para la cromatografía sobre papel que vamos a realizar utilizaremos vasos cromatográficos. Dichos recipientes constan de un vaso que dispone de una bola de cristal en el fondo y una tapa. El disolvente (Metanol + Ninhidrina) de la fase móvil se deposita en el fondo del vaso de forma que cubra la bola de cristal pero sin sobrepasarla.

La mezcla de compuestos a separar se preparan en disolución y una muestra de ella se deposita (por medio de un aplicador, previamente bien empapado en ella) en uno (o ambos) extremos de la tira de papel cromatográfico. Este área de aplicación se denomina origen.

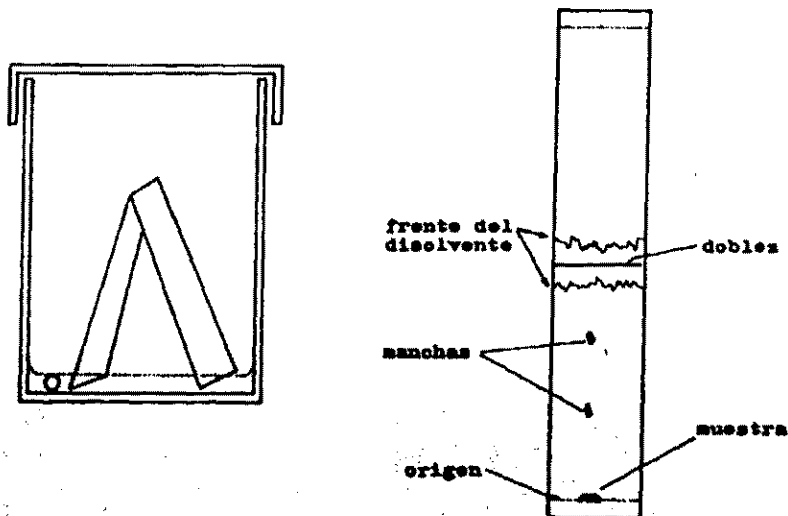
A continuación doblar la tira de papel a la mitad y dejar la reposar durante unos 5 minutos para que se seque la muestra (o muestras).

La tira de papel conteniendo la muestra (o muestras) a separar se coloca doblada (a modo de V invertida) dentro del vaso cromatográfico de forma que sus extremos se sumerjan en el disolvente. Finalmente se coloca la tapa.

El disolvente empapará el papel y poco a poco es absorbido comenzando a ascender. Cada producto de la mezcla tiene dos posibilidades: puede emigrar con el disolvente (que es completamente apolar) o quedar retenido por el soporte de celulosa hidratado que es altamente polar.

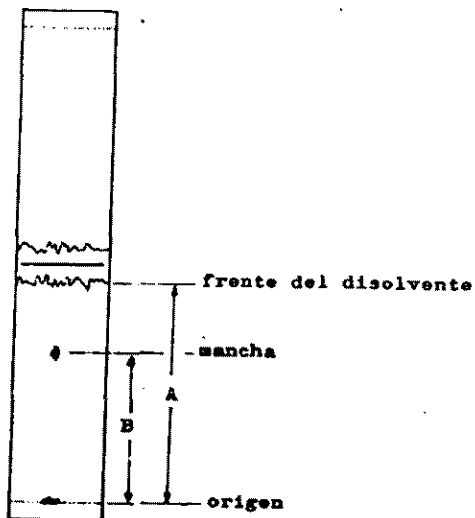
Después de transcurridos 5-10 minutos, con unas pinzas se extrae la tira de papel cromatográfico. En ese momento el avance del disolvente se detendrá y cada uno de los compuestos permanecerá en el lugar a donde hubiese llegado en ese momento; los más solubles estarán cerca del frente del disolvente y los menos más retrasados. Los productos de la mezcla se habrán separado según su relación de solubilidad entre el agua y el disolvente.

Una vez extraída la tira de papel del vaso cromatográfico se la dejará secar en una estufa a 70-110°C durante 2-3 minutos con objeto de secar y revelar el cromatograma. La presencia de Ninhydrina junto al disolvente permite teñir los aminoácidos, los cuales aparecerán de color púrpura o amarillo.



Una vez revelado el cromatograma rodee las manchas con lápiz y mida la distancia -A- desde el origen hasta donde ha llegado el frente del disolvente. Igualmente mida la distancia -B- desde el origen a la mancha. La relación $B/A = R_f$ es característica para cada aminoácido en un determinado disolvente y su empleo permite la determinación de la presencia de los distintos aminoácidos en una solución proteica problema.

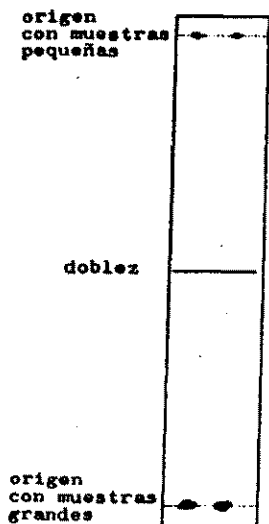
Finalmente rotule y guarde el cromatograma.



III. Investigaciones

EXPERIMENTO 1:

Deposite 10 gotas del aminoácido Valina en un vaso graduado y otras 10 gotas del aminoácido Acido Aspártico en otro. Coloque un aplicador en cada uno de los vasos durante unos minutos para que los aminoácidos empapen la madera) y, a continuación, deposite con la punta de cada aplicador una muestra grande de cada aminoácido en un extremo (una junto a otra) de una tira de papel cromatográfico, y una muestra pequeña de cada aminoácido en el otro extremo (una junto a otra) de la tira de papel.



Proceda a realizar la cromatografía introduciendo el papel cromatográfico (una vez secas las muestras) en el vaso cromatográfico con el disolvente.

Al cabo de 5-10 minutos proceda a revelar el cromatograma, secándolo en una estufa a 70-110°C durante unos 2-3 minutos. Rotule y conserve el cromatograma.

Observe las manchas aparecidas y su trayectoria, determinando cual corresponde a cada aminoácido. Comente los resultados. (**).

(**) Un rastro abundante quiere decir que el cromatograma está sobrecargado, indicando que hay demasiada cantidad de muestra aplicada. Tenga esto presente a la hora de depositar la muestra en el experimento 8°.

EXPERIMENTO 2:

Mezcle las dos soluciones de aminoácidos del experimento 7º en un vaso graduado. Aplique una gota de la muestra (**) en el extremo de una tira de papel cromatográfico. Proceda, como en el caso del experimento 7º, a realizar la cromatografía y revelar el cromatograma. Rotule y conserve el cromatograma.

Determine los R_f de cada aminoácido y decida, en base a ello, cual corresponde a cada uno. Comente los resultados.

(**) Para determinar el tamaño de la muestra a depositar tenga presente los resultados del experimento 7º.

EXPERIMENTO 3:

Preparar las soluciones:

Albúmina
Tampón pH=7
Tampón pH=3
Tripsina

Tome 2 tubos de ensayo y deposite:

en el tubo nº 1: 10 gotas de solución de albúmina
10 gotas de tampón pH=7
10 gotas de solución de Tripsina

en el tubo nº 2: 10 gotas de solución de albúmina
10 gotas de tampón pH=3
10 gotas de solución de Tripsina

Deposite una muestra grande de cada mezcla sobre el extremo de una tira de papel cromatográfico (utilice una tira para cada muestra). Guarde las tiras de papel una vez secas.

Rotule los tubos de ensayo y manténgalos durante 1-7 días a la temperatura ambiente en un lugar sin vibraciones. Al cabo de dicho tiempo deposite una muestra grande de cada tubo en el extremo libre de la correspondiente tira de papel que conserva. Doble las tiras de papel y déjelas secar. Proceda a realizar la cromatografía y al revelado del cromatograma. Rotule y conserve los cromatogramas.

Comente los resultados e intente determinar la presencia de los aminoácidos Valina y Acido Aspártico.

SEGUNDA PARTE: ASPECTOS TEORICOS

Una de las características más sorprendentes de los organismos vivos es su capacidad para llevar a cabo una gran variedad de reacciones químicas. Con su alimentación, cada organismo capta como nutrientes una diversidad de moléculas que podrán utilizar ya sea como fuente de energía para realizar las distintas modalidades de trabajo celular, o bien como precursoras de los centenares o miles de biomoléculas estructurales o funcionales de las células, moléculas tan diferentes como un anticuerpo proteico, una hormona esteroide o un ácido nucleico. Así pues, mientras dura su vida, todo organismo es la sede de una actividad incesante que implica tanto procesos de biosíntesis de los componentes celulares, como de su degradación y eliminación. Globalmente toda esta actividad bioquímica la incluimos bajo la denominación de metabolismo celular, y dado que el metabolismo procede de forma escalonada a través de numerosos compuestos intermediarios, con frecuencia se emplea el término de metabolismo intermediario para designar a sus diversas rutas bioquímicas. Los productos intermedios del metabolismo se llaman también metabolitos.

Ahora bien, gran parte de las reacciones que intervienen en el metabolismo celular, o bien no se realizan espontáneamente fuera de la célula -a la temperatura, presión y pH que caracterizan al medio viviente- o bien lo hacen con un ritmo incompatible con las necesidades de los seres vivos. Cabe, por tanto, el preguntarse como es posible que aún los organismos más sencillos puedan llevar a cabo esta química tan compleja que humillaría al químico más competente. Ello se debe a que los millones de reacciones de síntesis y degradación necesarios para el mantenimiento y supervivencia de la especie, ofrecen la particularidad de efectuarse y regularse por obra de catalizadores específicos que llamamos enzimas y que pueden definirse como prótidos dotados de actividad catalítica específica y capaces de actuar tanto dentro como fuera de la célula u organismo que los produce.

Como ejemplo de lo anterior podemos considerar la hidrólisis del azúcar común de mesa: la Sacarosa. Una molécula de Sacarosa se compone de una molécula de glucosa junto a una molécula de fructosa. Es muy fácil romper la Sacarosa en glucosa y fructosa por hidrólisis; esto ocurre muy lentamente cuando la sacarosa se disuelve en agua, pero se acelera bastante calentando la solución de sacarosa con un ácido, por ejemplo el ácido clorhídrico. En este caso el ácido está actuando como un catalizador. En la célula viva, donde las reacciones tienen lugar sin ácidos ni calor, la hidrólisis de la sacarosa se lleva a cabo gracias al enzima Invertasa. En presencia de Invertasa una solución de sacarosa se convierte rápidamente en una solución de glucosa y fructosa, sin necesidad de ácido ni calor.

Ahora bien, basta pensar en la gran cantidad de enzimas presentes en cualquier célula, y en la extrema diversidad de sus funciones, para que nos demos cuenta de que la suma de sus actividades conduciría a un verdadero caos, a no ser que existan mecanismos encargados de coordinar sus actividades en un sistema coherente.

Así como en los animales el sistema nervioso y el sistema endocrino aseguran la coordinación en el funcionamiento de los órganos y tejidos, es decir, la coordinación entre células, también será preciso que en el seno de cada célula exista una red cibernética que asegure la coherencia funcional de la maquinaria química intracelular. Ello es obra de los enzimas denominados alostéricos que juegan el papel de detectores e integradores de la información química.

Así pues, los enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, y entre sus propiedades más significativas, destacaremos:

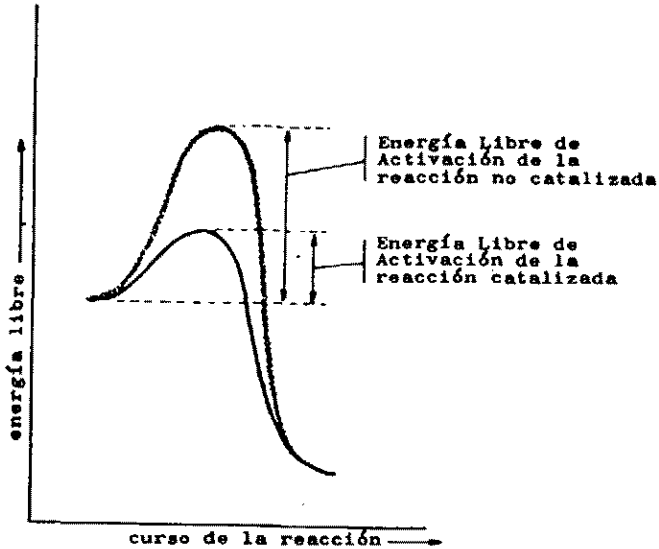
- * Su eficiencia o eficacia catalítica, muy superior a la de los catalizadores no biológicos. Se ha podido estimar que las reacciones catalizadas enzimáticamente tienen lugar a velocidades que son por lo menos 10^7 veces mayores que las correspondientes reacciones no catalizadas. Con el número de recambio (turn-over) expresamos el número de moléculas de sustrato transformadas por minuto por una sola molécula de enzima. Este número es del orden de 10^3 a 10^6 .
- * Su extraordinariamente alta especificidad, y que comprende un doble aspecto: por una parte, cada enzima solo cataliza un tipo particular de reacción química, y por otro, cada enzima es más o menos estrictamente específico de un cierto sustrato e incluso, en ocasiones, actúan sobre un determinado compuesto, al tiempo que carecen de acción sobre sus estereoisómeros.
- * Los enzimas están sometidos a un doble sistema de regulación:
 - Un sistema de control de su síntesis (Teoría del Operón, que veremos en temas posteriores).
 - La activación (o inhibición) de los enzimas presentes (enzimas alostéricos, véase pag).

Energía Libre de Activación

Una reacción química, tal como $S \longrightarrow P$, tiene lugar porque, en cualquier instante, una cierta proporción de la población de moléculas S posee la suficiente energía como para encontrarse en un estado activado, llamado estado de transición, en el que la probabilidad de que se establezca o se rompa un enlace químico para formar el producto P es máxima. Este estado de transición reside en la cima de la barrera de energía que separa a los reaccionantes y a los productos.

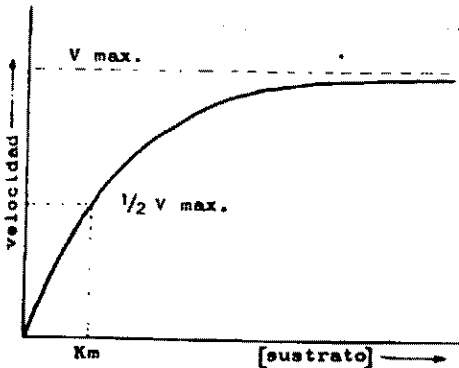
La Energía Libre de Activación es la cantidad de energía necesaria para llevar a todas las moléculas de un mol de S al estado de transición.

Es bien, los catalizadores aceleran las reacciones químicas porque disminuyen la energía de activación. El enzima se combina con el sustrato y se produce un estado de transición de menor energía de activación que el correspondiente a la reacción no catalizada.



Velocidad de las reacciones enzimáticas

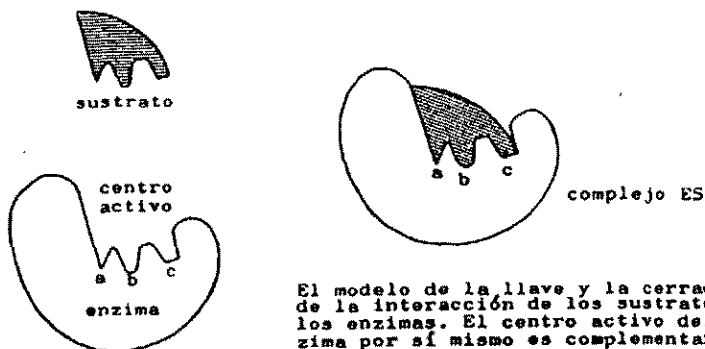
Un rasgo característico de las reacciones catalizadas por enzimas es el de que la velocidad de catálisis -v- varía con la concentración de sustrato en la forma que muestra la figura. Como puede verse, para una concentración dada del enzima, si la concentración del sustrato es pequeña, la velocidad de la reacción es casi proporcional a la [S]. Cuando la concentración del sustrato es alta, la velocidad de la reacción llega a ser prácticamente independiente de la [S] y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante.



Este efecto de saturación condujo a formular la hipótesis de que el enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo enzima-sustrato -ES-, que podrá exci dirse formando el producto -P- y liberando E.



Ya hemos indicado que la mayoría de los enzimas son altamente selectivos con respecto a los sustratos, lo que verosimilmente está relacionado con su conformación tridimensional. Podemos imaginar que la molécula del enzima (actuando a la manera de una cerradura) tiene una cavidad en la que encaja la molécula del sustrato (la llave), y sólomente cuando el sustrato está alojado en el lugar correcto puede verificarse la interacción catalítica.



El modelo de la llave y la cerradura de la interacción de los sustratos y los enzimas. El centro activo del enzima por sí mismo es complementario a la forma del sustrato.

La región específica del enzima que contacta con el sustrato y que participa directamente en la ruptura y producción de enlaces se denomina centro activo y un enzima sólo actuará sobre un sustrato cuando dicha sustancia pueda establecer la correcta relación. Es decir, si la molécula no encaja en el centro activo no tiene lugar la reacción catalizada, e incluso aún cuando haya encajado, será necesario un correcto alineamiento de las cargas eléctricas entre el enzima y el sustrato.

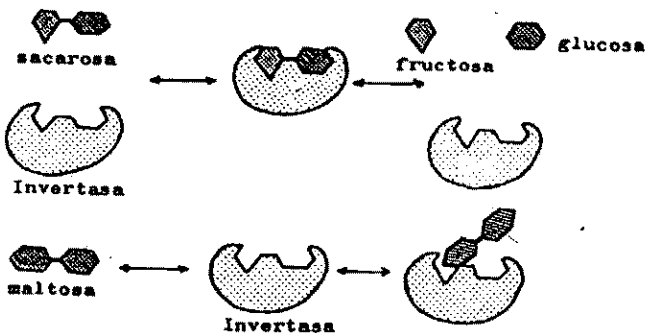
No obstante, se ha encontrado que algunos enzimas experimentan un cambio de su conformación tridimensional cuando se unen a sus sustratos. El "anclaje inducido" del enzima con el sustrato que modernamente se propone, determinaría la alineación y la orientación precisas de los grupos catalíticos y de unión necesarios para producir la reacción. Este cambio de conformación del enzima podría originar también una torsión o una compresión en la molécula del sustrato y hacerlo, de este modo, más susceptible al ataque catalítico. Así mismo, otra función del cambio de conformación inducido por el sustrato, podría ser la de hacer posible la eliminación de los productos de la reacción del centro activo, después de lo cual la conformación del enzima puede volver a su estado inicial.

Los enzimas no catalizan únicamente reacciones de disgregación de un determinado sustrato, sino que también pueden catalisar reacciones de síntesis o la transferencia de partes de una molécula a otra (véase figura). En estos casos es posible que el factor más importante implicado en la reacción sea el que dos (o más) moléculas sustrato sean puestas en contacto íntimo.

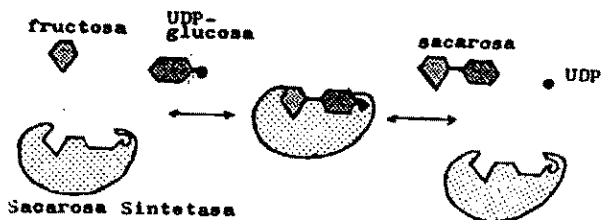
El modelo de la llave y la cerradura para la acción enzimática

- a) Invertasa
- b) Sacarosa Sintetasa

a)



b)



La formación del complejo ES es, en gran medida un proceso aleatorio, ya que en una solución las moléculas del enzima y del sustrato se encontrarán en movimiento casual y descontrolado, chocando unas con otras aleatoriamente. Bajo condiciones favorables, una cierta colisión lleva a la formación del complejo ES, con lo que se induce la reacción dando origen a los productos de la misma y a la liberación del enzima apto para formar un nuevo complejo ES.

Modificación de la actividad enzimática

La actividad de los enzimas puede ser afectada por diversos factores, así como por metabolitos específicos, y podemos decir que, desde un punto de vista genérico, un activador es aquél que aumenta la velocidad de la reacción enzimática, y un inhibidor el que disminuye la velocidad de la misma; pudiendo distinguir entre:

- * Inhibición competitiva. El inhibidor puede combinarse con el enzima libre, de tal modo que compete con el sustrato normal para unirse al centro activo, y por tanto la unión del enzima al sustrato o al inhibidor competitivo son acontecimientos mutuamente excluyentes.

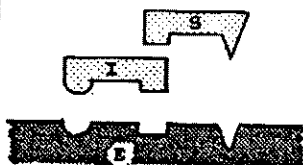
Así, por ejemplo, la Ureasa actúa sobre la Urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ y no lo hace sobre la Thiourea $\text{CS}(\text{NH}_2)_2$. En el caso de que ambas estén presentes, la Thiourea es tan parecida al verdadero sustrato, la urea, que puede ocupar el centro acti

vo y mientras permanezca en el mismo no dejará que lleguen al mismo las moléculas de Urea. Así pues, la Thicurea actúa como inhibidor competitivo ya que disminuye la velocidad de la catálisis al reducir la proporción de moléculas de enzima ligadas al sustrato.

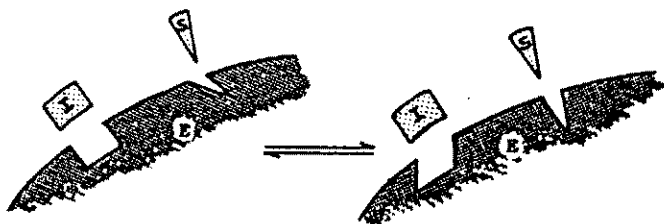
Los esquemas siguientes visualizan diversas posibilidades acerca del mecanismo de interacción.



Tanto el inhibidor como el sustrato encajan en el centro activo del enzima.

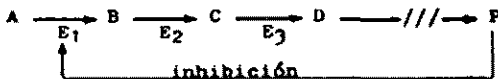


Inhibidor y sustrato compiten por un lugar distinto al centro activo del enzima



La molécula del enzima puede oscilar entre dos conformaciones espaciales. En una de ellas reconoce y se une al sustrato; en la otra, reconoce y se une al inhibidor, al tiempo que no puede hacerlo con el sustrato.

Frecuentemente la inhibición de un enzima es utilizada como mecanismo de regulación de la actividad del mismo. El enzima que cataliza la primera etapa de una vía metabólica es inhibido por el producto final



Así, la Galactosidasa, que hidroliza galactósidos liberando Galactosa, es inhibida por la propia Galactosa.

La inhibición selectiva de los enzimas es la base de la acción de algunos medicamentos. Así, las Sulfamidas ejercen su acción medicamentosa porque inhiben los enzimas relacionados con el metabolismo del ácido p-amino-benzoico.

Este compuesto es un componente vital del metabolismo de muchas bacterias, pero no de la especie humana, de forma que la inhibición de dichos enzimas interfiere el metabolismo bacteriano pero no el humano.

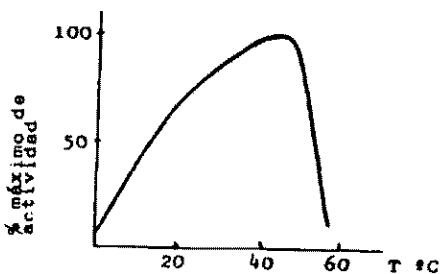
- * En la inhibición no competitiva el inhibidor no actúa disminuyendo la proporción de moléculas enzimáticas ligadas al sustrato (como en el caso anterior), sino disminuyendo el número de recambio (turn-over) del enzima. La inhibición, por tanto, depende fundamentalmente de la concentración del inhibidor, sin que importe la concentración del sustrato.

Los enzimas que se denominan SH-activos (como la Ureasa) por necesitar un grupo sulfhidrilo libre en el centro activo son extremadamente sensibles a la inhibición por cationes de metales pesados (Pb^{++} , Hg^{++} , Ag^+ , etc.). Los cianuros son inhibidores de los enzimas oxidativos, ya que forman complejos con sus coenzimas. Son estas razones por las que compuestos como el plomo, el mercurio y el cianuro son venenosos para muchos organismos.

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Quando se relaciona la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura, se han de considerar dos efectos antagónicos. De un lado, la elevación de la temperatura se traduce en una aceleración de las reacciones químicas, y las reacciones catalizadas por enzimas no hacen excepción a esta regla. Ello es consecuencia de que el aumento de la temperatura da lugar a un incremento de la movilidad de las moléculas, facilitando por tanto que alcancen el estado de transición.

De otra parte, los enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por la acción del calor y se inactivan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa un cierto punto, lo que permite explicar el pico que se observa en la gráfica.



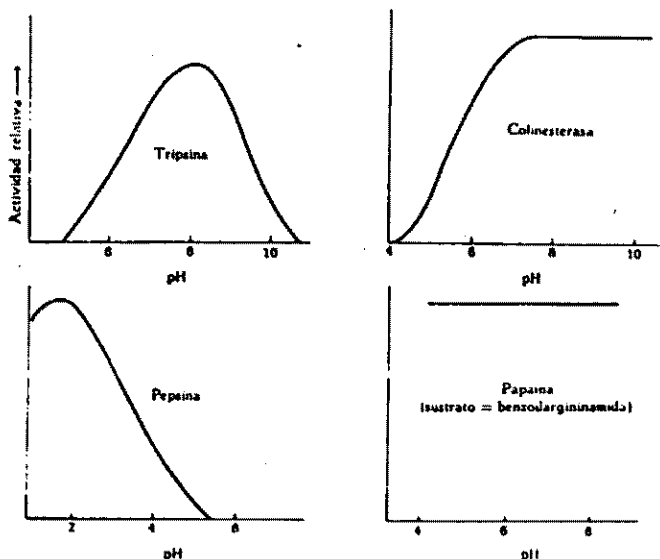
Frecuentemente bastan temperaturas de 55-60 °C para producir inactivación térmica de los enzimas, aunque no falten las excepciones (bacterias termoacidófilas). En cualquier caso su máximo de actividad se encuentra dentro del margen de temperaturas a que están adaptados los organismos.

Los efectos de las radiaciones, ultrasónicas, rayos X, neutrones, etc. suelen ser también inactivantes y muy enérgicos, como resultado de su acción desnaturalizante.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La mayoría de los enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye. En cualquier caso, no hay que olvidar que el pH fisiológico de los organismos se mantiene sensiblemente constante.

Aunque el perfil de la curva de actividad en función del pH es frecuentemente acampanado, no faltan las excepciones.



Los efectos del pH sobre la actividad de los enzimas pueden ser explicados en función de:

- * A que la variación del pH provoca cambios en la ionización (carga) de ciertos aminoácidos, lo que puede traducirse en cambios en el centro activo, lo que implica desnaturalización del enzima.
- * A que afecte a la carga del sustrato.

Metabolismo del Nitrógeno

La degradación de las proteínas conduce a la liberación de aminoácidos, los cuales, a su vez, pueden ser degradados por diversas vías metabólicas hasta compuestos más sencillos. Los productos de la degradación de los aminoácidos son los cetoácidos y el amoniaco. Los cetoácidos pueden ser utilizados para construir nuevos aminoácidos o pueden ser aún más degradados en las rutas del metabolismo de los hidratos de carbono y de los ácidos grasos. Por otro lado, el amoniaco es un producto tóxico y debe ser neutralizado o eliminado de algún modo. Una porción de él se usa inmediatamente para la síntesis de nuevos aminoácidos, otra porción puede ser guardada para usos futuros incorporándose a diversos compuestos, y finalmente, lo que queda puede ser convertido a pro

ductos menos tóxicos como la Urea o el ácido Úrico. Estos compuestos se forman principalmente en el hígado y son transportados por el torrente circulatorio hasta los riñones donde son filtrados y excretados en la orina junto con algo de amoníaco.

La Ureasa, de algún modo, es un enzima peligroso para los animales, ya que si dicho enzima estuviese en la sangre convertiría la urea de ésta en anhídrido carbónico y amoníaco, y esto envenenaría al animal. La Ureasa es así un enzima no típico de los animales. Una porción de la urea excretada por los animales llega al suelo, así que no es difícil ni sorprendente encontrar bacterias del suelo productoras de Ureasa.

El enzima produce amoníaco que es utilizado por la bacteria para sintetizar aminoácidos y otros compuestos que contienen nitrógeno. Como resultado de la producción bacteriana de Ureasa, este enzima se encuentra en la mayoría de los suelos, y su cantidad depende de cómo de activas sean sus bacterias, lo cual a su vez depende de un elevado número de factores como son el pH del suelo, los métodos de cultivo y fertilización, etc.

Un hecho sorprendente es que muchos tejidos vegetales (frutas de leguminosas, semillas de melón, etc.) contienen extremadas cantidades de Ureasa sin razón aparente. No utilizan Urea como fuente de nitrógeno ni externa ni internamente, así que no parece que adquieran ninguna ventaja conservando una proporción considerable de sus síntesis proteicas como provisión de Ureasa. Sigue siendo un enigma.

Metabolismo del Almidón

El almidón es un compuesto alimenticio importante en la nutrición humana, actuando como fuente básica de energía. Se forma en las plantas y es una mezcla de dos hidratos de carbono complejos de elevado peso molecular: la amilosa y la amilopectina.

La amilosa está constituida por moléculas de glucosa unidas en cadenas, de forma que cada cadena contiene alrededor de 200-300 residuos de glucosa unidas por enlaces alfa 1-4. Cada cadena esta en forma de hélice en donde hay 6-7 residuos de glucosa por vuelta. Las moléculas de Iodo pueden ser acopladas a la hélice, y en esta posición apertan un color azul a la amilosa (Reacción del Lugol). La amilopectina también esta formada por moléculas de glucosa pero, a diferencia de la amilosa, se unen en cadenas con múltiples ramificaciones, en las que cada ramal contiene de 24-30 residuos de glucosa. En la amilopectina las moléculas de glucosa se unen por enlaces alfa 1-4, salvo en los puntos de ramificación donde se dan enlaces alfa 1-6. La amilopectina también da una reacción coloreada con el Lugol.

La amilosa y la amilopectina pueden ser atacadas por la acción de varios enzimas, generalmente la alfa-amilasa y la beta-amilasa. La beta-amilasa hidroliza los enlaces alfa 1-4 empezando desde los extremos de las cadenas, de tal forma que libera maltosas (dos moléculas de glucosa unidas). La alfa-amilasa también hidroliza enlaces alfa 1-4, pero actúa sobre las moléculas de amilosa y amilopectina en puntos de sus cadenas al azar, de forma que no libera unidades sino pequeñas cadenas irregulares. Durante este proceso de hidrólisis enzimática las propiedades de coloración con el Iodo se pierden.

La alfa-amilasa se encuentra en muchos organismos, incluyen do mamíferos, plantas y bacterias. En muchos animales, incluido el hombre, se produce en las glándulas salivares y en el jugo pancreático, así que es el primer enzima que entra en contacto con los alimentos ingeridos.

APENDICE III: INSTRUCCIONES PARA LA REALIZACION DE LOS INFORMES:

En todo informe habrá que diferenciar dos aspectos igualmente importantes: el contenido y la forma.

En lo concerniente a los contenidos, cada informe habrá de contar con los siguientes apartados:

- 1) Planificación. En el cual se describe la situación pre-laboratorio: se define el problema a estudiar, se formulan cuestiones, hipótesis, se diseñan los diferentes experimentos, los procedimientos de trabajo, se seleccionan los aparatos e instrumental a utilizar, se describen las técnicas, se busca bibliografía, etc.
- 2) Ejecución. Se describen las situaciones que tienen lugar durante la ejecución de los experimentos o actividades previamente planificadas. Igualmente, se describen las observaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, que han sido registradas o calculadas a medida que se manipula y desarrolla la actividad.
- 3) Análisis e Interpretación. Transformación de los datos, representación de los mismos en forma de tablas, gráficos o ecuaciones que permitan su análisis cualitativo o cuantitativo. Se explican suposiciones subyacentes a una interpretación, se realizan comparaciones estadísticas de errores o probabilidades, se determinan correlaciones cualitativas o cuantitativas, se proponen sugerencias sobre errores, limitaciones o supuestos que afecten a los datos recogidos. Proposición de una generalización o modelo, etc.
- 4) Aplicación. Valoración de la posibilidad de aplicación a otras situaciones del principio bajo estudio, exponiendo tal predicción en términos de hipótesis verificables. Sugerencias acerca de las aplicaciones contemporáneas, etc..

Finalmente, habrá que poner especial cuidado en los aspectos referidos a la forma (vocabulario y sintaxis, representación gráfica, organización general, presentación, coherencia y comprensión general de la actividad).

**PROYECTO
DE
TRABAJO
EXPERIMENTAL
EN GENETICA**

EXPERIENCIAS CON MAZORCAS DE MAIZ

BASTIDA DE LA CALLE, MARIA FELIX
RAMOS FERNANDEZ, FRANCISCO
SOTO LOPEZ, JULIO

SANTANDER-ENERO-1984

I N D I C E

- I. INTRODUCCION
- II. EXPERIENCIAS CON MAZORCAS DE MAIZ
- III. APENDICES:
 - 1. Análisis de datos.
 - 2. Instrucciones para la realización de los Informes.
 - 3. Algunas notas sobre el maiz.

I. INTRODUCCION

En esta actividad experimental van a realizarse una serie de pequeñas investigaciones, con objeto de poner de manifiesto las leyes de Mendel sobre la herencia, así como diversas "excepciones" a la tercera ley. Para ello se utilizarán mazorcas de maíz.

Antes de afrontar la realización de las diferentes experiencias, deberán leerse detenidamente las instrucciones sobre el tratamiento de datos del Apéndice I.

El alumno deberá esforzarse en la observación cuidadosa, en el muestreo riguroso, en el planteamiento de hipótesis verosímiles y verificables, así como la interpretación cuidadosa de los datos obtenidos, siempre en base a un correcto análisis estadístico. Es importante que se entienda cómo en numerosas ocasiones la ciencia precisa del análisis estadístico de los datos experimentales, como forma de aportar grados de fiabilidad para las hipótesis planteadas.

Al final de la actividad experimental cada alumno deberá elaborar un informe que recoja las investigaciones realizadas, siguiendo los pasos explicitados en el Apéndice II.

II. EXPERIENCIAS CON MAZORCAS DE MAIZ.

Se suministran nueve mazorcas de maiz (numeradas del 1 al 9), que presentan diferentes fenotipos. Los alumnos organizados en grupos, deberán estudiar al menos tres mazorcas diferentes, teniendo la precaución de anotar en cada caso el número de referencia de cada una. Los estudios se realizarán siguiendo los pasos descritos a continuación:

- 1) Observación de los caracteres fenotípicos que se presenten en la mazorca, y agrupación de los mismos en clases fenotípicas.
- 2) Muestreo de un número significativo de semillas (no inferior a 200) de forma aleatoria. Para ello, una posible forma pudiera ser elegir al azar una fila y tras muestrearla, hacer lo mismo con las filas colocadas a la derecha (o a la izquierda) a intervalos regulares.
- 3) Cálculo de las proporciones relativas para cada clase fenotípica.
- 4) Formulación de una hipótesis verosímil sobre el mecanismo de herencia del carácter (o caracteres) en cuestión.
- 5) Tratamiento estadístico de los datos obtenidos por el muestreo, por medio de un test de "chi" cuadrado para saber si las diferencias entre lo observado y lo esperado son o no significativas. (Ver Apéndice I).
- 6) En caso de diferencias significativas, formulación de una nueva hipótesis y nueva prueba de Chi cuadrado.
- 7) Elaboración de un informe que recoja el análisis de todas las mazorcas estudiadas y las conclusiones obtenidas.

IV. APENDICES:

APENDICE I: ANALISIS DE LOS DATOS:

En múltiples ocasiones, la comparación de los resultados obtenidos en una investigación entre un grupo experimental y un grupo testigo, no permite sacar conclusiones fiables porque la diferencia entre los valores no es lo suficientemente grande.

Supongamos que en el caso de 150 lanzamientos de un dado se han obtenido los siguientes resultados:

CARAS	1	2	3	4	5	6
nº veces	22	18	29	25	32	24

Es evidente que las caras de un dado tienen igual probabilidad de aparecer, por lo que deberíamos esperar que cada una hubiera salido 25 veces. ¿Hasta qué punto las diferencias encontradas son debidas al azar, a lo escaso del muestreo; o por el contrario, a que el dado estaba trucado?

Para responder a esta cuestión se puede emplear un método matemático que se aplica en el análisis de los resultados de los experimentos biológicos para decidir, con cierta probabilidad de certidumbre, si las diferencias entre los resultados observados y los esperados se deben al azar, a simples diferencias naturales inherentes a las variaciones de los organismos, o si se deben realmente a la variable experimental introducida.

El test de "chi cuadrado" (χ^2) es un método de decisión estadística por el cual los valores obtenidos cuando se inroduce una variable experimental (valores observados), se comparan con los que suponemos deberíamos obtener de no existir dicha variable (valores esperados). Esta comparación se lleva a cabo aplicando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}}$$

El valor de χ^2 obtenido se hace corresponder con un cierto valor de probabilidad en una Tabla de chi cuadrado. Este valor nos dice qué probabilidad (p) existe de que la diferencia sea debida al azar. Si p es baja, menor de un cierto valor convencional, entonces se descarta el azar como responsable de la diferencia y se considera que esta se

debe a la variable experimental. Si la p es mayor que el valor convencional se considera que las diferencias son de bidas al azar.

A este valor convencional aludido se le llama nivel de significación, y generalmente se acepta una probabilidad menor del 5% (p menor de 0,05) como prueba de discrepancia significativa entre lo esperado y lo observado. Lo que quiere decir que el azar no debe intervenir en más de 5 veces en 100.

Ahora bien, para buscar el valor de chi cuadrado en la Tabla hay que tener en cuenta el denominado grado de libertad (n), que no es mas que el número de sucesos manejados menos uno.

Tabla Distribución de χ^2

Grados de libertad	Probabilidad										
	0.95	0.90	0.80	0.70	0.50	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
1	0.004	0.02	0.06	0.15	0.46	1.07	1.64	2.71	3.84	6.64	10.83
2	0.10	0.21	0.45	0.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	9.21	13.82
3	0.35	0.58	1.01	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	11.34	16.27
4	0.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	13.28	18.47
5	1.14	1.61	2.34	3.00	4.35	6.06	7.29	9.24	11.07	15.09	20.52
6	1.63	2.20	3.07	3.83	5.35	7.23	8.56	10.64	12.59	16.81	22.46
7	2.17	2.83	3.82	4.67	6.35	8.38	9.80	12.02	14.07	18.48	24.32
8	2.73	3.49	4.59	5.53	7.34	9.52	11.03	13.36	15.51	20.09	26.12
9	3.32	4.17	5.38	6.39	8.34	10.66	12.24	14.68	16.92	21.67	27.88
10	3.94	4.86	6.18	7.27	9.34	11.78	13.44	15.99	18.31	23.21	29.59
No significativo									Significativo		

Fuente: Fisher, R.A., y Yates, F., *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* (6a. edición), Tabla IV, Oliver & Boyd, Ltd. Edimburgo. Con permiso de los autores y editores.

Analicemos hasta qué punto las diferencias en el experimento del dado son debidas al azar:

CARAS	1	2	3	4	5	6
OBSERVADOS	22	18	29	25	32	24
ESPERADOS	25	25	25	25	25	25

$$\chi^2 = \frac{(22-25)^2}{25} + \frac{(18-25)^2}{25} + \frac{(29-25)^2}{25} + \frac{(25-25)^2}{25} + \frac{(32-25)^2}{25} + \frac{(24-25)^2}{25}$$

$\chi^2 = 4,96$; lo que para $n=6-1=5$ grados de libertad da un valor de p :

$$0,50 < p < 0,30$$

por lo tanto se acepta que las diferencias son debidas al azar.

Cuando el tamaño de la muestra total es muy pequeño (inferior a 100) y únicamente hay un grado de libertad, debe aplicarse la corrección de Yates para muestras pequeñas:

$$\chi^2 = \sum \frac{((\text{Observado} - \text{Esperado}) - 0,5)^2}{\text{Esperado}}$$

Finalmente, y volviendo de nuevo a la actividad experimental en Genética, deberá tenerse presente que cuando se estudien dos o más caracteres simultáneamente habrá que plantearse, en primer lugar, el modo de herencia de cada uno de los caracteres por separado; en segundo lugar, el mecanismo de herencia de los caracteres de dos en dos, y en tercer lugar de todos ellos juntos, analizando si se transmiten independientemente o no, en cuyo caso habrá que plantearse nuevas hipótesis que justifiquen estos hechos.

APENDICE II: INSTRUCCIONES PARA LA REALIZACION DE LOS INFORMES:

En todo informe habrá que diferenciar dos aspectos igualmente importantes: el contenido y la forma.

En lo concerniente a los contenidos, cada informe habrá de contar con los siguientes apartados:

- 1) Planificación. En el cual se describe la situación pre-laboratorio; se define el problema a estudiar, se formulan cuestiones, hipótesis, se diseñan los diferentes experimentos, los procedimientos de trabajo, se seleccionan los aparatos e instrumental a utilizar, se describen las técnicas, se busca bibliografía, etc.
- 2) Ejecución. Se describen las situaciones que tienen lugar durante la ejecución de los experimentos o actividades previamente planificadas. Igualmente, se describen las observaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, que han sido registradas o calculadas a medida que se manipula y desarrolla la actividad.
- 3) Análisis e Interpretación. Transformación de los datos, representación de los mismos en forma de tablas, gráficos o ecuaciones que permitan su análisis cualitativo o cuantitativo. Se explican suposiciones subyacentes a una interpretación, se realizan comparaciones estadísticas de errores o probabilidades, se determinan correlaciones cualitativas o cuantitativas, se proponen sugerencias sobre errores, limitaciones o supuestos que afecten a los datos recogidos. Proposición de una generalización o modelo, etc.
- 4) Aplicación. Valoración de la posibilidad de aplicación a otras situaciones del principio bajo estudio, exponiendo tal predicción en términos de hipótesis verificables. Sugerencias acerca de las aplicaciones contemporáneas, etc..

Finalmente, habrá que poner especial cuidado en los aspectos referidos a la forma (vocabulario y sintaxis, representación gráfica, organización general, presentación, coherencia y comprensión general de la actividad).

APENDICE III: ALGUNAS NOTAS SOBRE EL MAIZ (Zea mays L.)

El maiz es una planta herbácea gigante de la familia de las Gramíneas. Forma parte del género *Zea* y carece de congéneres cercanos. Las especies mas próximas son las pertenecientes a los géneros *Tripsacum* y *Coix*.

No esta del todo claro el lugar de origen del maiz, aun que la opinión general es que se extendió desde el centro de los Andes en el noroeste de América del Sur, y acaso desde otro centro al norte de América Central y México.

Los europeos no conocían el maiz antes de su llegada al Nuevo Mundo, y cuando los españoles desembarcaron por primera vez en América, encontraron el maiz cultivado por los indios, en tal cantidad que constituía una de sus fuentes de alimentación básica.

En 1.520 el maiz se había introducido en España aunque como planta ornamental, cultivada sólo en jardines. En el siglo XVIII se empieza a utilizar para combatir la "enfermedad de la piedra" (como diurético), aunque su uso generalizado en farmacia tardaría en llegar cerca de otro siglo.

Es el maiz una planta única por su adaptabilidad a diferentes suelos y climas. La aplicación de técnicas de mejora genética vegetal condujeron a la producción de numerosas variedades de maiz híbrido que han permitido su cultivo en todo el mundo. La mayor parte de la producción de las enormes extensiones de maiz se dedica a la alimentación humana y animal.

En el siglo actual el maiz ha desempeñado un importante papel como instrumento de investigación biológica. A causa de su variabilidad y facilidad de cruzamiento se utilizó como medio experimental en los primeros estudios científicos sobre genética de las plantas. Se puede decir que muchos de los principios fundamentales de la genética y cito genética han sido establecidos y verificados en el maiz.

Muchos de sus mutantes son el fundamento para la mejora de las cosechas, unos por su resistencia a las plagas, otros por su alto contenido en amilosa, otros por su alto contenido en lisina, otros por su alto contenido cáreo, etc.. Algunos de sus caracteres genéticos no tienen valor económico, pero son excelentes marcadores de sus 10 cromosomas en estudios genéticos; de suerte que hoy los pormenores de la herencia en el maiz se conocen mejor que los de cualquier otra planta.

PROYECTO DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN GENETICA

EXPERIENCIAS CON PLANTAS DE TOMATE

BASTIDA DE LA CALLE, MARIA FELIX
RAMOS FERNANDEZ, FRANCISCO
SOTO LOPEZ, JULIO

SANTANDER-ENERO-1984

I N D I C E

- I. INTRODUCCION
- II. EXPERIENCIAS CON PLANTAS DE TOMATE
- III. APENDICES:
 - 1. Instrucciones generales de cultivo
 - 2. Análisis de los datos
 - 3. Instrucciones para la realización de los Informes
 - 4. Algunas notas sobre el tomate.

I. INTRODUCCION

En esta actividad experimental van a realizarse una serie de pequeñas investigaciones, con objeto de poner de manifiesto las leyes de Mendel sobre la herencia, así como diversas "excepciones" a la tercera ley. Para ello se emplearán plantas de tomate.

Antes de afrontar la realización de las diferentes experiencias, deberán leerse detenidamente las instrucciones generales a que se refiere el Apéndice I; así como las instrucciones sobre el tratamiento de datos comprendidas en el Apéndice II.

El alumno deberá esforzarse en la observación cuidadosa, en el muestreo riguroso, en el cuidado de las condiciones de germinación y crecimiento de las plantas, en el planteamiento de hipótesis verosímiles y verificables, así como la interpretación cuidadosa de los datos obtenidos. Es importante que el alumno comprenda como en numerosas ocasiones la ciencia precisa del análisis estadístico de los datos experimentales, en cuanto forma de aportar grados de fiabilidad para las hipótesis planteadas.

Al final de la actividad experimental cada alumno deberá elaborar un informe que recoja las investigaciones realizadas, siguiendo los pasos explicitados en el Apéndice III.

II. EXPERIENCIAS CON PLANTAS DE TOMATE

Se suministran nueve posibles investigaciones con plantas de tomate, en las que se estudia la transmisión de los caracteres siguientes:

- Experiencia 1: Genotipo e interacción ambiental.
- Experiencia 2: Color del cotiledón.
- Experiencia 3: Vellosidad del tallo.
- Experiencia 4: Color del tallo y forma de la hoja.
- Experiencia 5: Color del tallo y vigor de la plántula.
- Experiencia 6: Color de la planta y suplementación bioquímica.
- Experiencia 7: Color del tallo.
- Experiencia 8: Color del tallo, color del cotiledón y forma de las hojas.
- Experiencia 9: Color del tallo y color y forma de las hojas.

Cada grupo de alumnos deberá realizar dos experiencias, para lo que recibirá el material biológico correspondiente en dos sobres diferentes. Cada sobre contiene las semillas de las distintas generaciones necesarias en cada caso. En cada experiencia deberán efectuarse los siguientes pasos:

- 1) Preparación del suelo, siembra, etiquetado y vigilancia de las condiciones ambientales de germinación y crecimiento. Para ello habrá que leer detenidamente y seguir escrupulosamente las instrucciones del Apéndice I sobre las técnicas de cultivo.
- 2) Observación y registro de los caracteres bajo estudio a medida que se manifiesten.
- 3) Recuento de cada clase fenotípica y determinación de las proporciones relativas.
- 4) Interpretación de los resultados y planteamiento de posibles hipótesis que los justifiquen, así como el análisis de las posibles fuentes de error.
- 5) Verificación de las hipótesis por medio de pruebas de χ^2 cuadrado. (Véase Apéndice II).
- 6) En caso de diferencias significativas, formulación de nuevas hipótesis y nuevo tratamiento estadístico.
- 7) Elaboración de un informe.

Observaciones particulares a algunos experimentos:

- Exp. 1: En este experimento se suministran semillas de varios mutantes del tomate, con objeto de estudiar la influencia de las condiciones ambientales en la expresión del genotipo. Las semillas deberán ser sometidas a diversos tratamientos ambientales (luz, humedad, temperatura y nutrientes del suelo), manteniendo siempre, en cada caso, ejemplares de control. Información complementaria será suministrada por el Profesor.
- Exp. 2: Se estudia el gen Xantofílico-2. Véase comentarios del experimento 8.
- Exp. 5: El carácter vigor de la plántula se manifiesta en dos tipos de plantas, unas de tamaño natural y otras de pequeño porte con pocas o ninguna hoja y pequeña tasa de crecimiento.
- Exp. 6: En este experimento se estudia la acción de un gen mutante que impide la síntesis de Thiamina en las plantas de tomate, lo que se traduce en que aquellas semillas que lo portan en homocigosis originan plantas cloróticas, con hojas de color verde pálido, amarillo o blanco, de porte enano que permanecen sin fructificar. Esta limitación del genotipo es superada si las plántulas se riegan tres veces por semana con una solución de Thiamina al 0,002%, (para ello se suministra un sobre conteniendo Thiamina que deberá disolverse en 1 litro de agua), o bien se aplica ésta con un pincel, poco a poco, sobre las hojas, cotiledones y ápices de crecimiento. Puede comprobarse este efecto separando las semillas P₂ en dos cubetas separadas, una de las cuales se mantiene como control y la otra es regada periódicamente con la solución de Thiamina.
- Exp. 8: Uno de los caracteres estudiados en este experimento es el gen Xantofílico-2, que reduce el contenido de clorofila de la planta. Cuando el alelo está presente, los cotiledones aparecen completamente cloróticos y las plantas mueren poco después de la germinación. Por esta razón no es posible suministrar semillas de la P₂ y de la F₁. Igualmente, y por la misma razón, deberán contarse las plantas cloróticas antes de que comience su muerte (nada más aparecer los cotiledones), observando además los caracteres que presentan respecto al color del tallo y color de los cotiledones.

IV. APENDICES.

APENDICE I: INSTRUCCIONES GENERALES DE CULTIVO.

El tomate es una planta que se manipula facilmente; su germinación es rápida y uniforme, de forma que las plántulas crecen robustas. Si se siguen las instrucciones descritas no deben encontrarse dificultades en el cultivo de las mismas.

Todos los experimentos incluyen un paquete con semillas con objeto de ensayar la técnica de germinación antes de sembrar las semillas experimentales.

a) Sobre los recipientes para las plantas (tiestos):

Lo mejor son cubetas de plástico, semejantes a las utilizadas para disecciones. Pueden habilitarse cajas de cartón o madera de 5 cm. de altura, revestidas de papel de aluminio. Tener presente que habrá que utilizar tantos recipientes como generaciones posea, siendo frecuente la necesidad de emplear dos recipientes para las semillas de la F_2 y del retrocruzamiento.

b) Sobre la naturaleza del suelo:

Se recomienda el empleo de una turba que llevo incorporado abono para germinación (de venta en floristerías y tiendas especializadas). El suelo ordinario de jardín es totalmente desaconsejable.

c) Sobre la siembra:

Rellenar el recipiente utilizado hasta unos 25 mm. del borde superior y nivelar hasta obtener una superficie plana y llana. Los suelos de turba son mas bien blandos y es recomendable una ligera compresión. Regar el suelo de turba en forma tal que este bien humedecido en su totalidad. Siembre y cuente el número de semillas sembradas. Finalmente, recubra las semillas de tomate con unos 5 mm. de turba.

d) Espaciamiento de las semillas:

Las semillas pueden sembrarse a voleo, pero debe tenerse cuidado para que no crezcan apiladas. Es preferible tomarse la molestia de espaciarlas cada 2 cm, especialmente las de la F_2 y las del retrocruzamiento, sobre todo en aquellos experimentos que impliquen caracteres de las hojas; de esta forma será mucho más sencillo examinar cada plántula individualmente.

e) Etiquetado:

No debe confiarse a la memoria, y a medida que se vaya realizando la siembra hay que etiquetar cada recipiente.

f) Sobre la temperatura de germinación:

Una germinación rápida y uniforme de las semillas se consigue a 20°C. A temperaturas inferiores será mas lenta y a temperaturas superiores puede ser errática. Hay que proteger los recipientes de la luz directa a fin de que la temperatura no suba excesivamente.

g) Sobre el tiempo de germinación:

Algunas plántulas de tomate pueden aparecer después de 4 o 5 días, pero la principal afluencia tendrá lugar entre los 6 y 8 días. Téngase en cuenta que puede haber unas pocas plántulas tardías. Si el suelo tiende a secarse a medida que germinan las semillas deberá realizarse un ligero riego.

h) Sobre el crecimiento:

Cuando aproximadamente una cuarta parte de las semillas hayan germinado, los recipientes deben ser trasladados a plena luz (por ejemplo junto a una ventana bien iluminada). Si es posible, mantenga los tomates a 20°C durante dos días y después entre 12° y 15°C.

Riegos ulteriores dependerán de las condiciones, pero hay que tener cuidado de no excederse, especialmente cuando se trate de recipientes de plástico. La mejor regla es: "en lá duda, mejor es no regar". Las plántulas crecen mejor en una atmósfera húmeda que en una seca, por lo tanto, habrá que protegerlas de las corrientes de aire. Las diferencias de color en los tallos se ven mas claramente si las plántulas han crecido en condiciones difíciles: frio, sequedad, suelo pobre en nutrientes y con luz natural intensa.

Si se desea obtener plántulas inténsamente púrpuras, una vez que ha tenido lugar la germinación, no regar mas. Situarlas a plena luz, a temperatura baja y dejar que el suelo se vaya secando naturalmente. Temperaturas tan bajas como 5°C no perjudican. Las plántulas pueden sobrevivir durante varias semanas sin marchitarse. Cuando finalmente sea necesario el agua, hacerlo parcamente. Este proceso de endurecimiento de las condiciones ambientales, promueve una fuerte síntesis de Antocianina (y por tanto del color púrpura), aunque su velocidad de crecimiento se verá ralentizada y el desarrollo de los caracteres ulteriores retrasado.

En orden a promover el crecimiento, se pueden suministrar más nutrientes a las plántulas una vez por semana durante el verano y menos frecuentemente durante el invierno.

1) Registro de los datos:

A fin de no olvidarse de contar las plántulas tardías, el registro de los datos se retrasará hasta que no se observen nuevas germinaciones; para lo cual puede ser un índice la fracción de germinación (n° de semillas germinadas / n° de semillas sembradas).

APENDICE II: ANALISIS DE LOS DATOS:

En múltiples ocasiones, la comparación de los resultados obtenidos en una investigación entre un grupo experimental y un grupo testigo, no permite sacar conclusiones fiables porque la diferencia entre los valores no es lo suficientemente grande.

Supongamos que en el caso de 150 lanzamientos de un dado se han obtenido los siguientes resultados:

CARAS	1	2	3	4	5	6
nº veces	22	18	29	25	32	24

Es evidente que las caras de un dado tienen igual probabilidad de aparecer, por lo que deberíamos esperar que cada una hubiera salido 25 veces. ¿Hasta qué punto las diferencias encontradas son debidas al azar, a lo escaso del muestreo; o por el contrario, a que el dado estaba trucado?

Para responder a esta cuestión se puede emplear un método matemático que se aplica en el análisis de los resultados de los experimentos biológicos para decidir, con cierta probabilidad de certidumbre, si las diferencias entre los resultados observados y los esperados se deben al azar, a simples diferencias naturales inherentes a las variaciones de los organismos, o si se deben realmente a la variable experimental introducida.

El test de "chi cuadrado" (χ^2) es un método de decisión estadística por el cual los valores obtenidos cuando se introduce una variable experimental (valores observados), se comparan con los que suponemos deberíamos obtener de no existir dicha variable (valores esperados). Esta comparación se lleva a cabo aplicando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}}$$

El valor de χ^2 obtenido se hace corresponder con un cierto valor de probabilidad en una Tabla de chi cuadrado. Este valor nos dice qué probabilidad (p) existe de que la diferencia sea debida al azar. Si p es baja, menor de un cierto valor convencional, entonces se descarta el azar como responsable de la diferencia y se considera que esta se

debe a la variable experimental. Si la p es mayor que el valor convencional se considera que las diferencias son de de bidas al azar.

A este valor convencional aludido se le llama nivel de significación, y generalmente se acepta una probabilidad menor del 5% (p menor de 0,05) como prueba de discrepancia significativa entre lo esperado y lo observado. Lo que quiere decir que el azar no debe intervenir en más de 5 veces en 100.

Ahora bien, para buscar el valor de chi cuadrado en la Tabla hay que tener en cuenta el denominado grado de libertad (n), que no es mas que el número de sucesos manejados menos uno.

Tabla Distribución de χ^2

Grados de libertad	Probabilidad										
	0.95	0.90	0.80	0.70	0.50	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
1	0.004	0.02	0.06	0.15	0.46	1.07	1.64	2.71	3.84	6.64	10.83
2	0.10	0.21	0.45	0.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	9.21	13.82
3	0.35	0.58	1.01	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	11.34	16.27
4	0.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	13.28	18.47
5	1.14	1.61	2.34	3.00	4.35	6.06	7.29	9.24	11.07	15.09	20.52
6	1.63	2.20	3.07	3.83	5.35	7.23	8.56	10.64	12.59	16.81	22.46
7	2.17	2.83	3.82	4.67	6.35	8.38	9.80	12.02	14.07	18.48	24.32
8	2.73	3.49	4.59	5.53	7.34	9.52	11.03	13.36	15.51	20.09	26.12
9	3.32	4.17	5.38	6.39	8.34	10.66	12.24	14.68	16.92	21.67	27.88
10	3.94	4.86	6.18	7.27	9.34	11.78	13.44	15.99	18.31	23.21	29.59
	No significativo								Significativo		

Fuente: Fisher, R.A., y Yates, F., *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* (6a. edición), Tabla IV, Oliver & Boyd, Ltd. Edimburgo. Con permiso de los autores y editores.

Analicemos hasta qué punto las diferencias en el experimento del dado son debidas al azar:

CARAS	1	2	3	4	5	6
OBSERVADOS	22	18	29	25	32	24
ESPERADOS	25	25	25	25	25	25

$$\chi^2 = \frac{(22-25)^2}{25} + \frac{(18-25)^2}{25} + \frac{(29-25)^2}{25} + \frac{(25-25)^2}{25} + \frac{(32-25)^2}{25} + \frac{(24-25)^2}{25}$$

$\chi^2 = 4,96$; lo que para $n=6-1=5$ grados de libertad da un valor de p :

$$0,50 < p < 0,30$$

por lo tanto se acepta que las diferencias son debidas al azar.

Cuando el tamaño de la muestra total es muy pequeño (inferior a 100) y únicamente hay un grado de libertad, debe aplicarse la corrección de Yates para muestras pequeñas:

$$\chi^2 = \sum \frac{((\text{Observado} - \text{Esperado}) - 0,5)^2}{\text{Esperado}}$$

Finalmente, y volviendo de nuevo a la actividad experimental en Genética, deberá tenerse presente que cuando se estudien dos o más caracteres simultáneamente habrá que plantearse, en primer lugar, el modo de herencia de cada uno de los caracteres por separado; en segundo lugar, el mecanismo de herencia de los caracteres de dos en dos, y en tercer lugar de todos ellos juntos, analizando si se transmiten independientemente o no, en cuyo caso habrá que plantearse nuevas hipótesis que justifiquen estos hechos.

APENDICE III: INSTRUCCIONES PARA LA REALIZACION DE LOS INFORMES:

En todo informe habrá que diferenciar dos aspectos igualmente importantes: el contenido y la forma.

En lo concerniente a los contenidos, cada informe habrá de contar con los siguientes apartados:

- 1) Planificación. En el cual se describe la situación pre-laboratorio: se define el problema a estudiar, se formulan cuestiones, hipótesis, se diseñan los diferentes experimentos, los procedimientos de trabajo, se seleccionan los aparatos e instrumental a utilizar, se describen las técnicas, se busca bibliografía, etc.
- 2) Ejecución. Se describen las situaciones que tienen lugar durante la ejecución de los experimentos o actividades previamente planificadas. Igualmente, se describen las observaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, que han sido registradas o calculadas a medida que se manipula y desarrolla la actividad.
- 3) Análisis e Interpretación. Transformación de los datos, representación de los mismos en forma de tablas, gráficos o ecuaciones que permitan su análisis cualitativo o cuantitativo. Se explican suposiciones subyacentes a una interpretación, se realizan comparaciones estadísticas de errores o probabilidades, se determinan correlaciones cualitativas o cuantitativas, se proponen sugerencias sobre errores, limitaciones o supuestos que afecten a los datos recogidos. Proposición de una generalización o modelo, etc.
- 4) Aplicación. Valoración de la posibilidad de aplicación a otras situaciones del principio bajo estudio, exponiendo tal predicción en términos de hipótesis verificables. Sugerencias acerca de las aplicaciones contemporáneas, etc..

Finalmente, habrá que poner especial cuidado en los aspectos referidos a la forma (vocabulario y sintaxis, representación gráfica, organización general, presentación, coherencia y comprensión general de la actividad).

APENDICE IV: ALGUNAS NOTAS SOBRE EL TOMATE (Lycopersicon
esculentum)

El tomate es una planta perteneciente a la familia de las Solanáceas que posee numerosos subgéneros y especies.

Su origen esta en el Oeste de América Central, entre el ecuador y 30°S, en lo que hoy son El Ecuador, Perú, Chile y las Islas Galápagos. Presumiblemente fueron domesticados en México desde donde posteriormente fueron diseminados por todo el mundo.

Los españoles introdujeron el tomate en Europa, el cual se diversificó por las mejoras de los cultivos y la obtención de numerosas variedades. En un principio, en Europa su cultivo era entretenimiento de curiosos como plantas ornamentales de sus jardines, siendo considerado como nocivo para el consumo alimenticio, conociéndosele como "manzana del Perú" o "manzana del amor". En España, ya a mediados del siglo XVIII se consumían en ensalada, especialmente en las zonas del Sur. Hoy en día su consumo se ha generalizado a todo el mundo, alcanzando unas cifras de producción mundial de 20 millones de toneladas/año.

El tomate se cultiva durante todo el año en países tropicales e invernaderos; en los países templados los semilleros se preparan en febrero-marzo, se trasplantan en Mayo y la cosecha comienza a finales de junio. Es una planta con numerosas enfermedades, destacando las fúngicas, víricas y las producidas por Nemátodos, que se combaten de múltiples formas, siendo la mejor solución la selección genética de una variedad resistente.

La dotación cromosómica del Lycopersicon esculentum es de $2n=24$, siendo de destacar que numerosas diferencias respecto a la herencia Mendeliana de los caracteres han sido descritas en esta especie.

**PROYECTO
DE
TRABAJO EXPERIMENTAL
EN MICROSCOPIA**

**DINOFLAGELADOS DEL
FITOPLANCTON MARINO**

BASTIDA DE LA CALLE, MARIA FELIX
RAMOS FERNANDEZ, FRANCISCO
SOTO LOPEZ, JULIO

SANTANDER - FEBRERO - 1.985

OBJETIVOS:

- Familiarizarse con la utilización del microscopio lumínico, enfocando correctamente tanto a pequeños como a grandes aumentos.
- Conseguir un correcto empleo del condensador.
- Familiarizarse con la utilización de tablas dicotómicas de clasificación, y con la necesidad de una observación rigurosa y sistemática.
- Determinar el tamaño real de especímenes microscópicos, familiarizándose con el empleo del micrómetro ocular.
- Recogida del material y su conservación.
- Montaje de preparaciones húmedas.
- Dibujo.

A modo de actividades complementarias:

- Calcular las frecuencias relativas de un cierto número de especies.
- Analizar las posibles fuentes de error.
- Analizar las fluctuaciones en la abundancia relativas de dichas especies (o grupos biológicos) en función de la estación (o de un determinado factor climático, como por ejemplo; riadas).
- Elaborar y representar gráficamente los datos obtenidos referentes a dichas fluctuaciones.

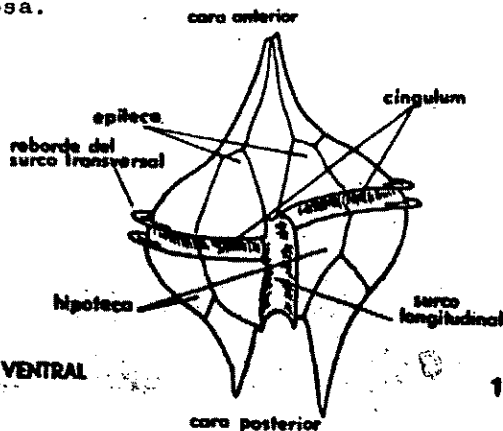
Los Dinoflagelados (también llamados Peridíneas) constituyen, junto con las Diatomeas, los dos grupos mayores del fitoplancton. Forman un grupo con numerosas especies que habitan distintos tipos de aguas, especialmente desarrollados en el mar, donde pueden constituir principalísima parte del plancton, sobre todo tropical.

Aunque la diversidad de aspectos hace vano todo intento de reducirlos a un modelo morfológico, es interesante dar una idea general sobre la base de un tipo frecuente.

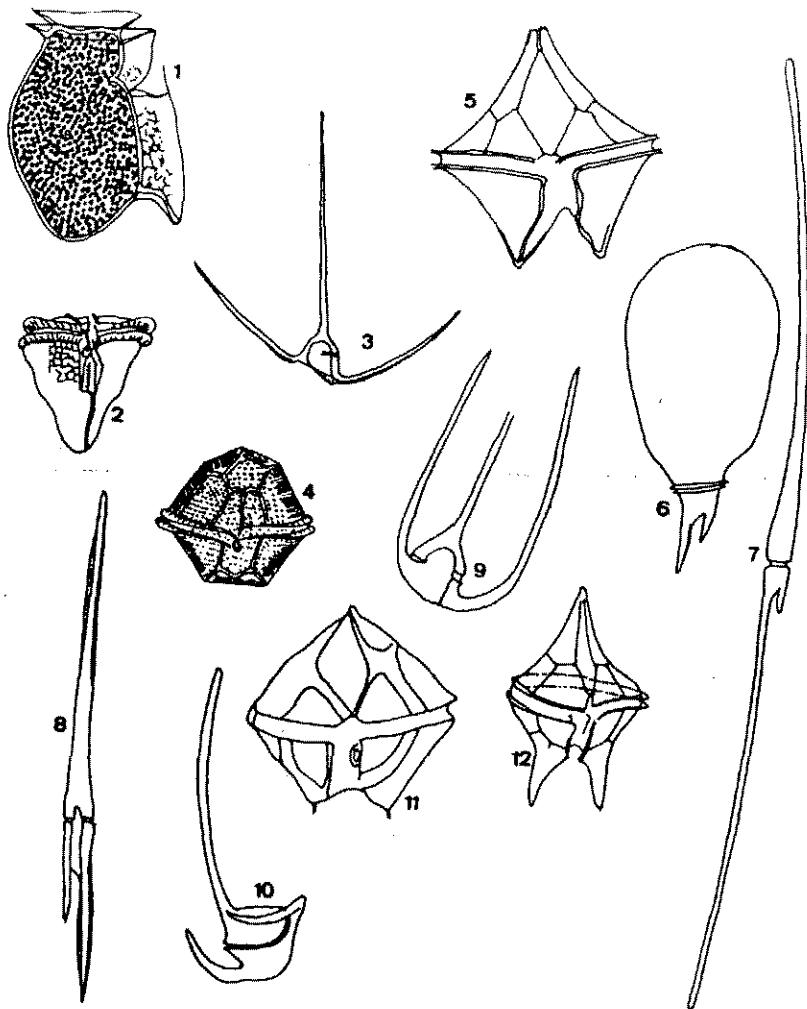
Son los Dinoflagelados organismos unicelulares con cromatóforos fotosintéticos y por tanto autótrofos. De forma ovoide o bicónica en la que destacan dos surcos. Uno es transversal ("cíngulum") y rodea por completo el cuerpo como una cintura más o menos ecuatorial. De la parte media del cíngulum sale un surco longitudinal ("sulcus") que sólo llega hasta el extremo posterior. La cara en que está el sulcus, y que con frecuencia se llama ventral, es de donde salen dos flagelos, si bien estos se pierden al fijar el material.

Frecuentemente los Dinoflagelados están revestidos de una membrana (valva o teca) de naturaleza celulósica (con algo de pectina). En este caso, la valva situada por encima del cíngulum se llama "epivalva", y la situada por debajo "hipovalva". Estas valvas, a veces, están formadas por placas de formas variadas y de gran interés taxonómico. Tanto el cíngulum como el sulcus pueden presentar membranas o rebordes limitantes que alcanzan a veces extraordinario desarrollo.

La clave que a continuación se presenta está reducida a unos pocos géneros y dentro de estos a las especies más frecuentes. El alumno deberá dibujar cuidadosamente todas las peridíneas que encuentre, consultando al profesor aquellos ejemplares que no se ajusten a la descripción de la clave. El valor de esta práctica no es tanto aprender a utilizar el microscopio, como acostumbrarse a la observación cuidadosa.



VISTA VENTRAL



1. Dinophysis Schroederi; 2. Phalacroma sp.;
 3. Ceratium horridum; 4. Goniodoma sp.;
 5. Peridinium leonis; 6. Ceratium obvatum
 7. Ceratium strictum; 8. Ceratium belone
 9. Ceratium coartatum; 10. Ceratium concilians;
 11. Peridinium Marielebourg; 12. Peridinium oceanicum.

Las especies de los dibujos no se corresponden con las especies de la Clave.

CLAVE SISTEMATICA

1. -Surco transversal situado cerca del extremo anterior de la célula, limitado por rebordes ampliamente desarrollados. (fig.1).....2
-Sin los caracteres anteriores.....3
2. -Células muy comprimidas dorso-ventralmente. La epivalva no sobresale del ala que rodea el borde superior del surco transversal, quedando hundida en la cavidad formada por dicho reborde. (fig.1)...(DINOPHYSIS).....5
-Células poco comprimidas dorso-ventralmente. La epivalva sobresale del ala que rodea el borde superior del surco transversal. (fig.2)...(PHALACROMA)..... Phalacroma rapa
3. -Células con cuernos largos, es decir con prolongaciones rellenas de plasma, de longitud superior a la parte globosa de la célula. (fig.3) (CERATIUM).....6
-Sin los caracteres anteriores.....4
4. -Células globosas o poliédricas. (fig.4)...(GONIODOMA).....Goniodoma polyedricum
-Células en forma de peonza con dos cuernos cónicos llenos de plasma en su base. (fig.5)...(PERIDINIUM).....15
5. -Célula terminada en una prolongación cónica..... Dinophysis caudata
-Célula terminada en dos prolongaciones cónicas..... Dinophysis tripos
6. -Epivalva sin cuerno apical diferenciado, sino transformada en una masa ancha y aplanada..(fig.6)..... Ceratium gravidum
-Epivalva con cuerno apical diferenciado. (fig.3).....7

7. -Uno solo de los cuernos antiapicales esta bien desarrollado y la célula en su conjunto tiene aspecto fusiforme. (fig.7). Muy abundante..... Ceratium fusus
 (El C. falcatum, menos frecuente, es más grande y tiene el cuerno antiapical encorvado en forma de sable)
- Dos cuernos antiapicales bien desarrollados y la célula no es fusiforme. (fig.3).....8
8. -Los dos cuernos antiapicales son rectos y dirigidos hacia atrás, paralelos o poco divergentes. (fig.8).....9
- Los dos cuernos antiapicales están curvados y terminan dirigiéndose hacia adelante. (fig.3).....10
9. -El cuerpo o parte central de la célula es más ancho que alto y poco comprimido..... Ceratium candelabrum
- El cuerpo de la célula es más alto que ancho y muy comprimido. La epivalva se prolonga sin inflexión en el cuerno apical. Muy frecuente..... Ceratium furca
 (Ocasionalmente podrá encontrar algún ejemplar de C. belone, mucho más largo, del orden de tres veces la del C. furca).
- 10.-Cuernos antiapicales cortos y en continuidad con el borde posterior de la célula, de manera que la forma de esta recuerda un áncora.(fig.9).....11
- Cuernos antiapicales largos y claramente diferenciados desde su base, no formando continuación del borde posterior de la célula.(fig.3).....12
- 11.-Cuernos antiapicales aproximadamente simétricos..... Ceratium tripos
- Cuernos antiapicales no simétricos y uno de ellos se retuerce dirigiéndose hacia el cuerno apical.(fig.10)..Ceratium gibberum

- 12.-Cuernos antiapicales en el mismo plano.....13
- Cuernos antiapicales retorcidos, por lo que no se encuentran en el mismo plano. Suturas poligonales visibles, especialmente en los ejemplares vacios..... Ceratium hexacanthum
- 13.-Los cuernos antiapicales se dirigen primero hacia la parte posterior y luego se recurvan hacia la anterior llegando aproximadamente hasta la mitad del cuerno apical..... Ceratium macroceros
- Uno de...
 -Los dos cuernos antiapicales se dirigen lateralmente desde practicamente la base y luego se recurvan hacia la parte anterior llegando casi hasta el extremo del cuerno apical.....14
- 14.-El cuerno antiapical izquierdo presenta una clara inflexión en el punto de unión con respecto al borde posterior de la célula..... Ceratium massiliense
- Borde posterior de la célula con pequeñas crestas claramente visibles..... Ceratium Pavillardi
- 15.-Epivalva sencillamente cónica. (fig.11)..... Peridinium subinerme
- Epivalva estirada hacia arriba formando una especie de cuerno apical. (fig.12)..... Peridinium depressum

Ceratium belone

Ceratium candelabrum

Ceratium fusus

Ceratium gibberum

Ceratium macroceros

Ceratium massiliense

Dinophysis caudata

Dinophysis tripos

Peridinium subinerme

Phalacroma rapa

.....

.....