

## Ejercicio #5: Estructura y función de membranas. Capítulo 8: Campbell

Preparado por Prof. Heidi Reyes y Prof. David Forestier

### Introducción

La membrana celular es una estructura de **permeabilidad selectiva** presente en todo tipo de célula. En organismos eucarióticos y en eubacterias la estructura de la membrana sigue el modelo del **mosaico fluido**. Según este modelo, la membrana está formada por una **capa doble de fosfolípidos** asociados a **proteínas** (Fig. 8.6 , Pág. 142). En las membranas de células animales encontramos moléculas de colesterol. El colesterol ayuda a brindar fortaleza y fluidez a la membrana.

La capa doble de fosfolípidos actúa como una **barrera hidrofóbica** que no permite el paso de moléculas polares o iónicas. Sin embargo, a través de la bicapa pueden pasar libremente sustancias de naturaleza hidrofóbica o moléculas pequeñas sin carga eléctrica como el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O. Para entrar a la célula las sustancias polares o las iónicas requieren de proteínas de transporte asociadas a la membrana.

Hay dos tipos de proteínas asociadas a la membrana: 1) **proteínas integrales** y 2) **proteínas periferales**. Las proteínas integrales están fuertemente asociadas a la membrana y no se pueden separar de esta sin romperla. Estas pueden ser **proteínas transmembranales**. **Las que** funcionan en el transporte específico de una gran variedad de sustancias. Las proteínas asociadas a la membrana tendrán una variedad de funciones adicionales al transporte. Las proteínas periferales se encuentran asociadas de forma débil a la periferia de la membrana y también pueden tener diversas funciones.

Muchas de las proteínas presentes en la superficie de la célula han sido modificadas mediante la adición de azúcares, estas forman una cubierta de hidratos de carbono sobre la célula llamada **glucocalix**. Esta se relaciona con la comunicación entre la célula y su ambiente La membrana citoplásmica no es una estructura estática. Su estructura se mantiene por interacciones hidrofóbicas y es posible el movimiento aleatorio de los lípidos y las proteínas que la forman. Aunque estos componentes se pueden mover lateralmente, no pueden cambiar su posición relativa en la membrana. Cualquier factor que afecte la estructura de la membrana afectará también su función.

## Objetivos

Al finalizar este laboratorio los estudiantes serán capaces de:

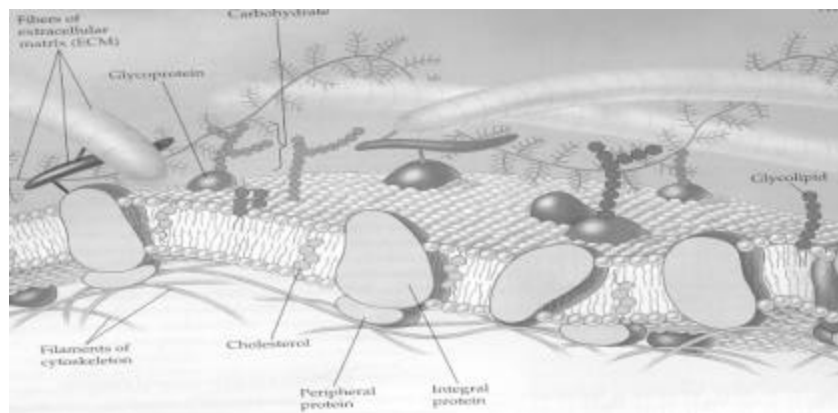
1. utilizar adecuadamente el equipo y materiales necesarios para identificar las condiciones óptimas de la membrana celular.
2. reconocer al equipo utilizado por nombre y función
3. explicar el daño sufrido por las membranas celulares ante los diferentes disolventes y cambios en temperatura y de pH.

## Materiales

- espectrofotómetro
- tubos de ensayo
- gradillas
- papel sin pelusa (Kimwipes)
- baño de María
- amortiguadores a pH 3, 5, 7, 9
- acetona al 50%
- agua destilada
- escalpelo
- palillos de madera o cristal
- detergente y cepillo para fregar
- remolacha
- cubetas
- removedores de corcho
- vasos de precipitado
- nevera y congelador
- regla
- metanol al 50%
- termómetro
- pinzas
- lápiz de cera
- papel secante

## Métodos

En el laboratorio de hoy estudiaremos el efecto de la temperatura, el pH y algunos disolventes hidrofóbicos sobre la membrana celular. Utilizaremos las raíces de la planta de **remolacha** como organismo experimental. Las células de raíz de la remolacha, poseen almacenada en la **vacuola central** una gran cantidad del pigmento rojo llamado **betacianina**. Cuando ocurre algún daño a la membrana citoplásmica, este pigmento puede escapar de la célula. Por lo tanto, ante la presencia de algún tensor físico o químico, el pigmento escapa de la célula. A mayor daño a la membrana, mayor cantidad de pigmento escapará de la célula.



## I. Efecto de la temperatura sobre la membrana

Las membranas son sensitivas a cambios en temperatura. Debido a la naturaleza lípida de la membrana, los cambios en temperatura afectarán su fluidez. Si ocurre un **aumento** brusco en la temperatura, aumenta la fluidez por el aumento en el movimiento de las moléculas que las componen. Esto puede resultar en daño físico a la membrana como resultado de las colisiones entre sus moléculas. A baja temperatura disminuye la fluidez, **pero si se congelan las membranas la formación de cristales de agua puede dañarlas.**

### Procedimiento

1. Utilizando un cortador de corcho, obtenga **4** cilindros de remolacha de **15mm** de longitud
2. Coloque los pedazos en un vaso de precipitado y enjuague en agua del grifo durante **2 minutos** y descarte el agua. Repita el enjuague hasta que el agua de enjuague salga clara.
3. Obtenga 4 tubos de ensayo limpios y rotúlelos del 1 al 4 con un lápiz de cera. Utilizando una pinzas, coloque un cilindro en cada tubo de ensayo. Tenga mucho cuidado para evitar que se rompan mecánicamente células y se libere betacianina.
4. Se colocarán los tubos a **cuatro** temperaturas diferentes. Los los tubos del 1 al 3 por 20 minutos y el cuarto tubo por 5 minutos.
  - a. El primero, se colocará a **-5° C** aproximadamente (congelador).
  - b. El segundo, se colocará a **5° C** aproximadamente (refrigerador).
  - c. El tercero, permanecerá a **temperatura ambiente** (mida y anote).
  - d. El cuarto, se colocará en **baño de María a 70 ° C**.
5. Luego de los tratamientos añada 10ml de agua destilada a cada tubo y permita que repose durante 20 minutos. Utilizando una pinza extraiga y descarte los cilindros de remolacha con mucho cuidado para evitar que se libere más betacianina.
6. Transfiera cada sobrenadante a una cubeta de espectrofotómetro. Sujete la cubeta por la parte superior para que esta se mantenga limpia y libre de grasa.
7. **Calibre el espectrofotómetro a 460nm utilizando agua destilada como solución blanco (de referencia).**
8. Mida la **absorbancia** de las cuatro soluciones según indique el profesor. Anote los resultados en la Tabla 5.1.

9. Discuta los resultados con su grupo de trabajo.

Tabla 5.1 Absorbancia de las soluciones con betacianina a diferentes temperaturas.

Tubo	Tratamiento	Absorbancia a 460nm
1	- 5° C	
2	5° C	
3	Ambiente ____ °C	
4	70° C	

¿Qué temperatura causó mayor daño a la membrana? ¿Por que? \_\_\_\_\_

---

---

---

## II. Efecto de algunos solventes no polares.

Los solventes no polares pueden disolver el componente lípido de la membrana causando daño irreversible a su estructura. Estudiaremos el efecto de dos solventes orgánicos comunes: **alcohol** y **acetona** sobre la estructura de la membrana.

### Procedimiento

1. Utilizando un cortador de corcho, obtenga **3** cilindros de remolacha de **15mm** de longitud.
2. Coloque los pedazos en un vaso de precipitado y **enjuague** en agua del grifo durante **2 minutos** y descarte el agua. Repita el enjuague hasta que el agua de enjuague salga clara.
3. Obtenga **3** tubos de ensayo limpios y rotúelos del 1 al 3. Con una pinza, maneje los cilindros con mucho cuidado para evitar que se libere más betacianina. Coloque un cilindro en cada tubo de ensayo.
4. Añada a cada tubo **10ml** de la soluciones indicadas en la Tabla 5.2.
5. Mantenga la remolacha en los disolventes y el control durante 20 minutos. **Ocasionalmente agite los tubos, de igual forma e intensidad y por la misma cantidad de tiempo.** Remueva cuidadosamente los pedazos de remolacha y descártelos.
6. Mida la absorbancia para cada tratamiento y anote los resultados.

Tabla 5.2 Absorbancia de las soluciones con betacianina en diferentes disolventes.

Tubo	Tratamiento	Absorbancia a 460nm
1	Acetona al 50%	
2	Metanol al 50%	
3	Agua destilada	

7. Discuta los resultados con su grupo de trabajo. ¿Qué disolvente causó mayor daño a la membrana? ¿Por que? \_\_\_\_\_

---

---

---

### III. Efecto del pH sobre la membrana

Las membranas también son sensitivas a cambios en el pH. Debido a la naturaleza proteica de la membrana, los cambios en pH afectarán su integridad. Si ocurre un cambio brusco en el pH, la **conformación nativa** de las proteínas que las componen puede perderse. Como consecuencia, la **desnaturalización** de las proteínas puede resultar en un daño químico y físico a la membrana. Sin embargo, a un pH óptimo se preservaran las membranas y no se liberará mucha betacianina.

#### Procedimiento

1. Utilizando un cortador de corcho, obtenga **4** cilindros de remolacha de **15mm** de longitud.
2. Coloque los pedazos en un vaso de precipitado y enjuague en agua del grifo durante **2** minutos y descarte el agua. Repita el enjuague hasta que el agua de enjuague salga clara.
3. Obtenga **4** tubos de ensayo limpios y rotúlelos del 1 al 4. Utilizando una pinza, maneje los cilindros con mucho cuidado para evitar que se libere más betacianina. Coloque un cilindro en cada tubo de ensayo.
4. Añada a cada tubo **10ml** del amortiguador indicado y espere por **20 minutos**.
  - a. Al primero, 10ml amortiguador de **pH = 3**.
  - b. Al segundo, 10ml amortiguador de **pH = 5**.
  - c. Al tercero, 10ml amortiguador de **pH = 7**.
  - d. Al cuarto, 10ml amortiguador de **pH = 9**.
5. Luego de los 20 minutos, descarte los cilindros de remolacha con mucho cuidado para evitar que se libere más betacianina.
6. Transfiera cada sobrenadante a una cubeta de espectrofotómetro.

7. **Calibre el espectrofotómetro a 460nm utilizando el amortiguador del mismo pH como solución blanco (Ej. pH = 3 para a).** Mida la absorbancia de las cuatro soluciones según indique el profesor. Anote los resultados en la Tabla 5.3.
8. Discuta los resultados con su grupo de trabajo.

Tabla 5.3 Absorbancia de las soluciones con betacianina a diferentes pH.

Tubo	Tratamiento	Absorbancia a 460nm
1	pH 3	
2	pH 5	
3	pH 7	
4	pH 9	

¿Cuál **pH** causó mayor daño a la membrana? ¿Por que?

---

---

---

### Pensamiento crítico

Luego de reconocer la sensibilidad de la membrana celular, discuta que procesos usted conoce que se utilizan para preservar alimentos en el pasado y ahora.

---

---

---

---

---

Preguntas de pensamiento crítico (opcional).

1. Un estudiante prepa de UPRP colocó los tomates en el congelador de su hospedaje para mantenerlos frescos. Al descongelarlos recibió una sorpresa. La textura de estos había cambiado de una fresca y crujiente, a una completamente plana. ¡Explique este fenómeno con los conocimientos aprendidos hoy!

2. ¿Qué problemas enfrentarán las células de las personas que han sido sometidas a procesos criogénicos?

3. ¿Qué deberíamos hacer para extraer clorofila de las células de las plantas?

4. ¿Qué consecuencia podría tener en un paciente al utilizar un suero con un pH incorrecto. ¿Cuál es el pH de la Sangre?

### Vocabulario

1. permeabilidad selectiva -
2. mosaico fluido -
3. capa doble de fosfolípidos -
4. barrera hidrofóbica -
5. proteínas integrales -
6. proteínas periferales -
7. proteínas transmembranales -
8. glucocalix -
9. vacuola -
10. betacianina -

**Bibliografía** Dolphin, Warren D. 1997. *Biology Laboratory Manual*. 4<sup>th</sup> Ed.  
Mader, Sylvia S. 2000. *Inquiry into life, Laboratory Manual* 9<sup>th</sup> Ed.

Vodopich & Moore. 2002. *Biology Laboratory Manual*. 6<sup>th</sup> Ed.

### Referencias en Internet

www.salohogar.com

#### The Cell Membrane

University of Texas Medical Branch  
(Ver el Menú de Membrana)

<http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane.htm>

#### Cell Membranes Tutorial

The Biology Project  
University of Arizona

[http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/problem\\_sets/membranes/](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/problem_sets/membranes/)

#### Cell-ebraction

Como funcionan las células!  
Tutoriales de organelos

<http://www.usd.edu/~bgoodman/Cell-ebractionframes.htm>

Esta separata fue revisada y editada en septiembre del 2004 por JGRR.  
Preguntas de pensamiento crítico, vocabulario & referencias de internet.

Esta separata fue revisada y editada en febrero 2004 por el Prof. David Forestier.