

Trabajo Práctico N° 9
Respirometría

Introducción:

La vida terrestre presenta un conflicto continuo entre la necesidad de oxígeno y la necesidad de agua. Las condiciones que favorecen la entrada de oxígeno favorecen también la pérdida de agua. Los insectos (animales terrestres), que han demostrado un éxito muy considerable, tienen una cutícula fuerte que es altamente impermeable a los gases y una capa de cera que los recubre haciéndolos virtualmente impermeables también al agua. El intercambio de los gases tiene lugar a través de un sistema de tubos internos llenos de aire, las tráqueas, que conectan con el exterior a través de aberturas denominadas espiráculos.

La mayor parte de los animales satisfacen sus necesidades energéticas por oxidación de los materiales alimenticios, principalmente glúcidos y grasas, y proteínas como último recurso. Este fenómeno da lugar a la obtención de CO₂ y agua como productos finales y pequeñas cantidades de otros productos en el caso de las proteínas.

La captación de O₂ y liberación de CO₂ se denomina respiración, una palabra que se aplica tanto al organismo en su conjunto como al proceso que se da en las células. Según las células van utilizando el O₂, el CO₂ que se forma sale a través de los órganos respiratorios. El agua formada en los procesos de oxidación entra simplemente en el conjunto general de agua del cuerpo.

La Tasa Metabólica (TM) mide la conversión de energía química a calor. Las formas de medir la TM varían:

- Puede determinarse la diferencia entre el valor energético de los alimentos ingeridos y los productos de excreción.
- Por calorimetría directa, puede medirse el calor producido por el animal, midiendo la T° de una masa conocida de agua (trampa de calor).
- Por calorimetría indirecta, se puede determinar la cantidad de O₂ utilizado para oxidar el alimento, suponiendo que se sabe qué sustrato es oxidado.

Los requerimientos metabólicos y respiratorios se ponen de manifiesto en la TM expresada por unidad de masa: TM Específica (TME). La TM es una función exponencial de la masa corporal y la TME corresponde a la TM de una unidad de masa del tejido (Figura 1 y 2).

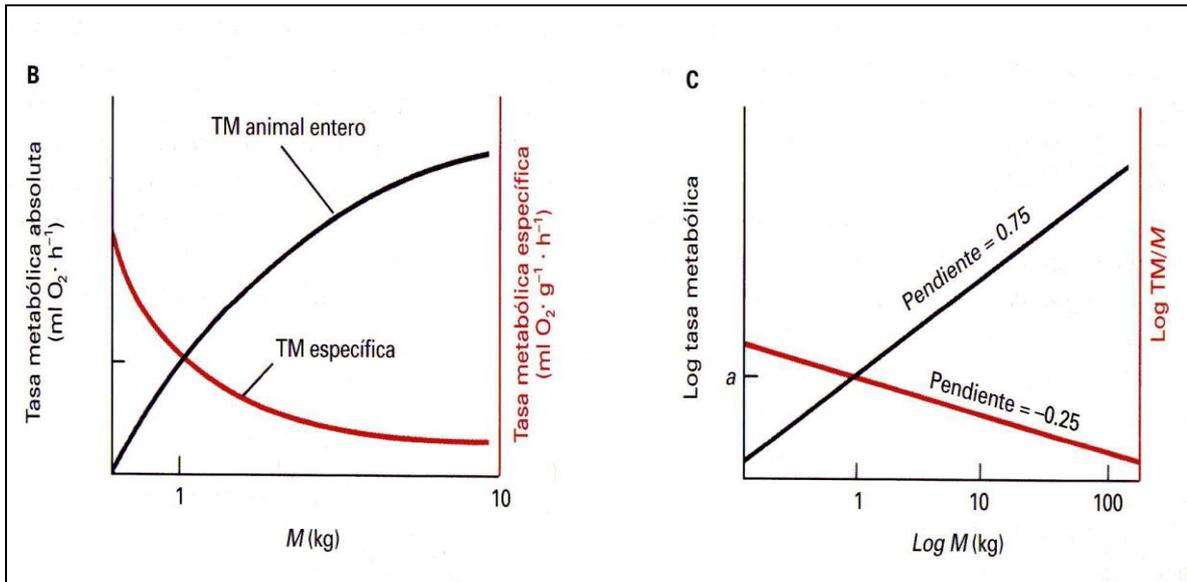


Figura 1: Tasa metabólica.

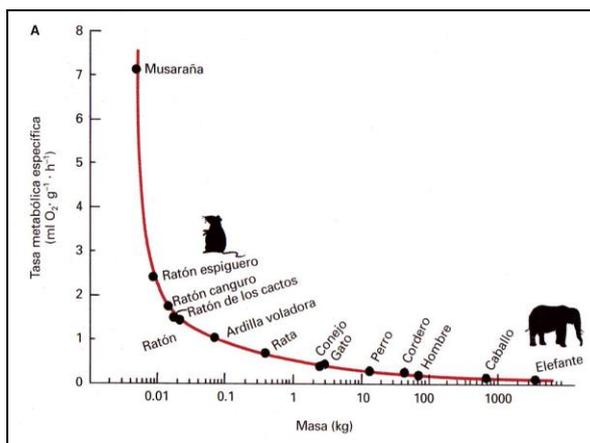


TABLA 16-2 Consumo de oxígeno en mamíferos de diferentes tallas corporales.

Animal	Masa corporal (g)	Consumo de O ₂ total (ml/h)	Consumo de O ₂ por gramo (ml/g · h)*
Musaraña	4.8	35.5	7.40
Ratón espiguero	9.0	22.5	1.50
Rata canguro	15.2	27.3	1.80
Ratón	25	41.0	1.65
Ardilla terrestre	96	98.8	1.03
Rata	290	250	0.87
Gato	2.500	1.700	0.68
Perro	11.700	3.870	0.33
Cordero	42.700	9.590	0.22
Humano	70.000	14.760	0.21
Caballo	650.000	71.100	0.11
Elefante	3.833.000	268.000	0.07

* Los valores de esta columna son proporcionales a la intensidad metabólica.
 Fuente: Schmidt-Nielsen, 1975

Figura 2: Tasa metabólica específica.

La TM varía en función del número e intensidad de las actividades que se realizan, crecimiento, regeneración de tejidos, locomoción, pérdidas por excretas, etc. Sobre ella influyen factores ambientales: T° ambiental, hora del día, época del año, edad, sexo, talla, estrés, tipo de alimento que metaboliza, preñez, etc.

Objetivos:

- Estimar el consumo de oxígeno en un organismo animal terrestre, según el grado de actividad del mismo.
- Identificar la liberación de CO₂ producido por nuestro metabolismo en distintas condiciones de actividad.
- Observar y cuantificar la relación entre la temperatura, el peso corporal y la frecuencia respiratoria en peces.

Experiencia 1:

Materiales:

- 3 tubos de ensayo de 4/5 cm de diámetro
- 3 tapones de goma perforados
- 3 trozos de goma espuma del diámetro del tubo
- Termómetro
- 1 jeringa con aguja
- Soporte universal con 3 nueces
- Vaselina sólida
- Granos de NaOH
- Varios ejemplares animales para someter a la experiencia aclimatados a las condiciones del laboratorio, pueden usarse coleópteros de arena u otros

Procedimiento:

- Armar la experiencia según el esquema al pie (figura 3). La pipeta o el termómetro se introducen o sacan fácilmente del tapón untándolas con una delgada capa de vaselina y rotándolas suavemente para que no se quiebren.
- Medir la temperatura en el interior de la cámara con un termómetro inserto en el tapón y controlarla con la temperatura ambiente. Se medirán las posibles variaciones dentro y fuera de la cámara con el termómetro adosado a ella (Temp. Cámara - Temp. ambiente).
- En el interior de uno de los tubos colocar uno de los coleópteros, a continuación un trozo de goma espuma que contenga en su interior las pastillas de NaOH y el tapón de goma perforado, con la pipeta que lo atraviesa.
- Realizar en el extremo de la pipeta una burbuja de agua con la jeringa y observar su desplazamiento en un determinado tiempo. Leer el volumen en ml que se desplazó la burbuja, que equivale al oxígeno consumido.

- Se puede usar, para comparar, otro ejemplar de la misma especie, que puede ser de igual o distinto tamaño, estadio de desarrollo, sexo, etc.
- Preparar un testigo siguiendo los mismos pasos pero sin colocar el animal.
- Repetir dos o tres veces la lectura. Alejar las fuentes de calor para evitar la expansión de los gases, lo cual podría modificar sustancialmente la lectura. Controlar permanentemente que la temperatura ambiente no varíe.

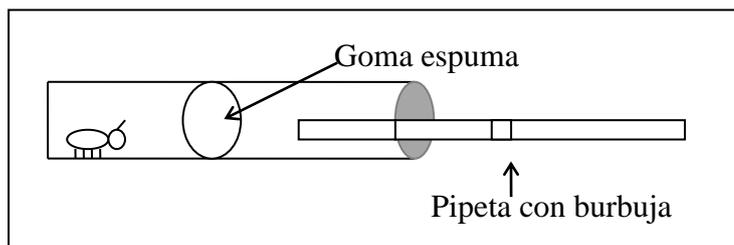


Figura 3: Esquema del dispositivo

Se procede ahora a estandarizar el volumen de oxígeno consumido del siguiente modo:

- a)** Se debe calcular el **factor de corrección** a condiciones standard de presión y temperatura con el ambiente seco (0% de HR) = STP

$$STP = \frac{P_{local} - P_{vapor}}{P_{normal}} \times \frac{T_{abs}}{T_{abs} + T_{amb}}$$

donde:

STP: Factor de corrección a condiciones standard

P_{local}: Presión atmosférica (en mm Hg) en el momento de la experiencia (leerla en el barómetro o consultarla del servicio meteorológico).

P_{vapor}: Presión parcial de vapor de agua en la atmósfera a la temperatura de la experiencia (dato tabulado). Esta corrección debe hacerse cuando no se utiliza aire seco.

P_{normal}: 760 mmHg: 1013 milibares o hectopascales.

T_{amb.}: Temperatura registrada por el termómetro en °C

T_{abs.}: Temperatura absoluta (273°C).

- b)** Vol. estandarizado (a T ambiente) = Vol. medido (ml/min.) x STP.

También puede calcularse la pérdida de agua por evaporación (a través de los espiráculos o superficies blandas) en el animal sometido a la experiencia, utilizando la siguiente fórmula:

$$P_i - P_f = \text{Variación de peso} = \text{Pérdida de agua (Vapor de agua)}$$

donde:

P_i = peso inicial (antes de la experiencia)

P_f = peso final (al finalizar la experiencia)

Esta lectura de peso debe hacerse en una balanza de precisión, pues si se trabaja con tenebriónidos (adaptados a ambientes secos) la variación puede ser muy pequeña o no registrable si el tiempo de la experiencia fuese menor de 30 min.

Resultados y conclusiones

- Realice un gráfico con los resultados obtenidos.
- Compare y discuta los resultados obtenidos.

Experiencia 2

Materiales:

- 1 probeta de 250 ml
- 1 frasco o botella grande
- 1 sorbete o tubo de vidrio
- 1 bureta
- Solución de NaOH 0,04%
- Solución de fenolftaleína

Procedimiento:

- Medir 100 ml de agua de la canilla y colocar en el frasco grande. Agregar 3 a 5 gotas de solución de fenolftaleína. ¿Hay cambio de color? Agregue gota a gota solución de NaOH hasta obtener un color rosado que indicará su pH. ¿Qué es, alcalino o ácido?.
- Usando una pajilla, burbujear en la solución anterior todo el aire espirado hasta que la solución se vuelva incolora. Tenga cuidado al soplar de no salpicar agua fuera del recipiente.
- ¿Qué cambios se observan en el color de la solución?
- ¿Qué indica esto con respecto a su pH?
- ¿Qué compuesto se forma cuando se burbujea CO₂ en el agua?
- ¿Cuántos segundos tomó para que cambiara de color la solución?
- Con la bureta agregue lentamente gota a gota la solución de NaOH 0,04% a la solución contenida en el frasco, agitando constantemente. Continúese agregando hasta que se obtenga

un color rosa que dure por lo menos un minuto y anote el número de ml de solución de NaOH empleados.

- Si multiplicamos por 10 el número de ml de NaOH necesarios para volver rosa la solución del frasco, se obtendrá el número de micromoles de CO₂ espirados. Estimar el número de micromoles espirados por minuto.
- ¿Todos los miembros de la clase espiraron la misma cantidad de CO₂/min?
- ¿Cuál fue el promedio de los datos de CO₂ exhalados/min?
- ¿Cuál es el significado de las variaciones en los diferentes individuos?
- Tomando como base que el CO₂ es un producto del metabolismo celular, ¿qué indica la cantidad de este gas exhalado por minuto acerca del metabolismo del individuo?

Experiencia 3

Materiales:

- 2 peces (carpas de distinto tamaño)
- 2 recipientes de vidrio de 100 ml.
- 2 recipientes de telgopor para introducir los recipientes de vidrio
- Mechero y trípode con amianto
- Vasos de precipitados de 500 ml.
- Termómetro
- Hielo
- Balanza

Procedimiento

Se estudiará el efecto en la respiración por incubación de los animales a dos temperaturas: T1 menor y T2 ambiente.

1. Colocar agua con hielo en un recipiente de telgopor (T1) y en el otro agua a t° ambiente (T2). Registrar ambas temperaturas. Ajustar la temperatura de cada recipiente si fuera necesario.
2. En cada recipiente de vidrio de 100 ml colocar un pez y luego colocar cada uno en uno de los recipientes de telgopor ya preparados.
3. Luego de 10 minutos de estabilización del sistema se procederá a contar el batido opercular (número de veces que los opérculos se abren) durante 3 minutos. Repetir la operación 3 veces. Determinar la frecuencia media para cada carpa.

4. Durante los conteos se deberá tomar la temperatura cada 2 minutos para luego determinar la media.
5. Al finalizar los ensayos, procederá al pesado de cada uno de los animales. Para esto, primeramente se pesará un recipiente conteniendo agua (tara), luego se transferirá el pez a dicho recipiente volviéndose a pesar (tara +pez).
6. Volcar los resultados en una tabla
7. Expresar la frecuencia respiratoria para cada animal:
 - a. en número de batidos operculares/minuto.
 - b. en número de batidos operculares/minuto/gramo de pez.

Bibliografía:

- ✓ Schmidt-Nielsen, 1984K. Fisiología Animal.. Ed. Omega.
- ✓ Gutierrez Vazquez, Villalobos Pietrini, Gómez Pompa. 1972. Investigaciones de Laboratorio y de Campo Cia. Editorial Continental S.A. México.