

Espectro de Absorción de la Clorofila

Anaya Galeana Jesús Eduardo, Esquivel Ramírez Eduardo*

Profesores: M. en C. Laura Helena González Trueba, Dr. Juan López Patiño, Dr. Rodolfo Ezequiel López Romero. Dr. Raúl Escamilla. Ayudante: Miguel Ángel Campos González

*Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México

22 de septiembre de 2018

Resumen

Se presentan los espectros de absorción de soluciones con clorofila, (extraída de la espinaca, nopal y cáscara de pepino) y etanol al 80 % haciendo uso de un espectrofotómetro. El espectro se obtuvo una semana (7 días) después de haber obtenido la clorofila para todos los casos. Se observó un cambio considerable en la amplitud máxima de la absorción relativa, sin embargo, también se encontró que los espectros tienen máximos en 472nm, 540nm, 620nm y 668nm para la espinaca, 468nm, 544nm, 616nm y 664nm para el pepino y 468nm, 544nm, 616nm y 668nm para el nopal.

1. Introducción

Las clorofilas son una familia de pigmentos de color característico verde que se encuentran en todos aquellos organismos que contienen cloroplastos, lo que incluye a las plantas y algas; y es una biomolécula crítica en la fotosíntesis.

Existen diferentes tipos de clorofila, *a*, *b*, *c*₁, *c*₂, *d* y *f*; los primeros dos se encuentran presentes en todas las plantas, mientras que los últimos son característicos de ciertos tipos de algas.

Las clorofilas *a* y *b* difieren sólo por un grupo radial en su "fórmula química", pero esto hace que sus propiedades fotoluminiscentes sean distintas

electrón (Apéndice A, Apéndice B) y el tiempo de duración una vez que la radiación electromagnética cesa

La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de que a la muestra se le suspende la radiación ($\approx 10^{-6}s$), mientras que la fosforescencia puede durar varios segundos o minutos.

El fenómeno de fotoluminiscencia ocurre cuando una especie química es excitada por medio de radiación electromagnética y como consecuencia parte de la energía adquirida por la molécula se reemite en forma de choques moleculares y parte en forma de energía luminosa (conversión interna Apéndice C).

1.2. Espectro de absorción de la Clorofila

Se sabe teóricamente que los diferentes tipos de clorofilas tienen un espectro de absorción distinto. La clorofila *a* absorbe principalmente luz roja (entre 650 y 700nm) y luz azul (de 400 a 450nm), mientras que la clorofila *b* absorbe en 450-500nm y 630-680nm, esta última sirve como complemento del tipo *a* para aumentar el rango del espectro que puede utilizar para la fotosíntesis, aunque no es su única función.

El proceso físico que describe lo que sucede después de la absorción es el siguiente, la absorción de luz azul excita a la clorofila a un mayor nivel de energía pues su energía es más grande, en este estado excitado la clorofila es extremadamente inestable y cede energía rápidamente por conversión externa (Apéndice C.1), lo que provoca que decaiga al menor estado excitado. En este estado tiene cuatro formas de deshacerse de la energía sobrante y regresar a su estado base: por fluorescencia al emitir un fotón de menor energía (mayor longitud de onda), conversión interna, conversión externa y en reacciones químicas

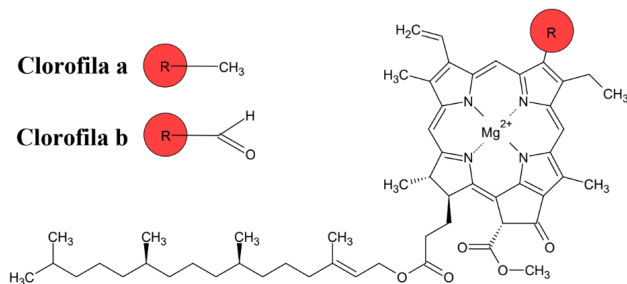


Figura 1: Estructura de las moléculas de clorofila *a* y *b*

1.1. Fluorescencia Molecular

La fluorescencia y la fosforescencia son dos manifestaciones diferentes del fenómeno fotoluminiscente. Se diferencian en que las transiciones electrónicas responsables de la fluorescencia no conllevan un cambio en el espín del

(como la fotosíntesis).

En la figura **Figura 2** puede apreciarse el espectro de absorción de la clorofila. Se puede observar que los picos de absorción se dan en las partes de azul y rojo del visible, que son las longitudes de onda para los cuales se llega al segundo y primer estado excitado respectivamente.

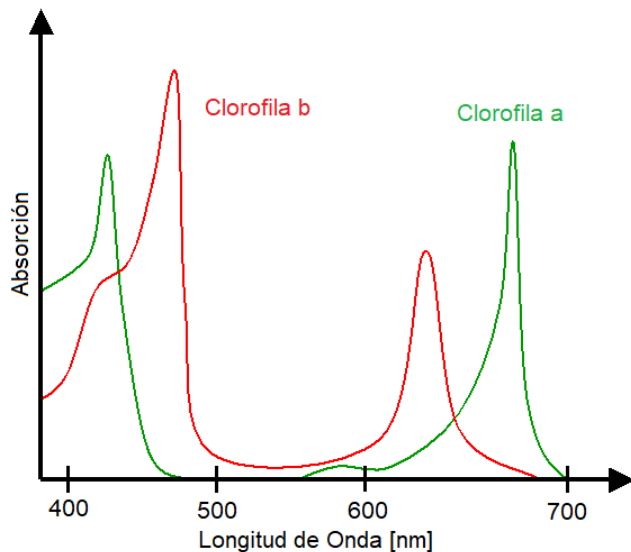


Figura 2: Espectro de absorción las clorofilas *a* y *b*

1.3. Instrumentación para obtener el espectro de Absorbancia

Usualmente se utilizan espectrofotómetros UV-VIS los cuales se basan en la ley de Beer-Lambert (**Ecuación 1**)

$$A = -\log_{10}(I/I_0) = \epsilon cl \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia, I es la intensidad medida por el fotodetector (figura 4), I_0 la intensidad incidente, c la concentración de la muestra, l la longitud recorrida por la luz desde la fuente hasta el fotodetector y ϵ la absorptividad de la muestra.

Los espectrofotómetros UV-VIS se componen de una fuente de luz (usualmente de tungsteno para el visible y de deuterio para el UV), un monocromador (que puede ser un prisma o una rejilla de difracción), un compartimiento para la muestra, y el detector.

Un esquema de las partes del espectrofotómetro UV-VIS se encuentra en la **Figura 3**

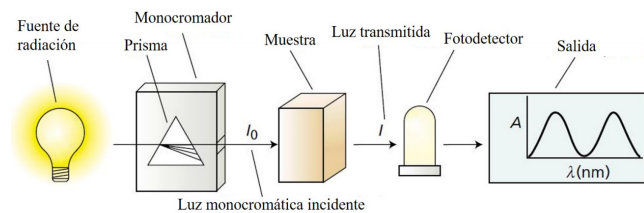


Figura 3: Esquema del espectrofotómetro. El monocromador puede utilizar un prisma (por refracción) o una rejilla de difracción para seleccionar la longitud de onda deseada.

Finalmente, para el experimento se necesita extraer la clorofila de las hojas de espinaca, de la cáscara de pepino y del nopal, y dado que se encuentra dentro de los cloroplastos, es necesario romper la membrana de éstos para extraerla. Ya que la membrana es una bicapa lipídica se utiliza algún solvente no polar (etanol al 80 % en este experimento) esta propiedad de solubilidad se debe a que los lípidos poseen largas regiones no polares en su molécula haciéndolos insolubles ante solventes polares (como el agua) y solubles con solventes no polares (o de baja polaridad) [3]. Esto disuelve en gran parte la membrana y deja al interior del cloroplasto sin la cadena lipídica.

2. Material

- Espectrofotómetro Spectronic 21D
- Parrilla eléctrica
- Soporte universal con nuez (2)
- Pinzas de 3 dedos (2)
- Termómetro
- Agua destilada
- Etanol (alcohol etílico)
- Báscula
- Tubos de ensayo (3)
- Vasos de precipitado (100mL, 150mL y 200mL)
- Pipetas (2)
- Espinaca, nopal, pepino. (Cualquier planta verde)
- Bata, guantes y cubreboca

3. Desarrollo Experimental

El desarrollo experimental consistió de dos etapas, la extracción de la clorofila, y la espectrofotometría de las muestras obtenidas.

3.1. Extracción de la clorofila

Se utilizaron pequeños trozos de hojas limpias de espinaca fresca (0.50 ± 0.05)g que se colocaron en un tubo de ensayo con (6.00 ± 0.05)ml de etanol al 80 % (preparado con (4.8 ± 0.05)ml de etanol y (1.2 ± 0.05)ml de agua destilada).

Se fijó el tubo de ensayo a un soporte universal y se dejó en baño María aproximadamente durante 20 minutos a una temperatura de 72 a 76 grados centígrados, para evitar la ebullición del alcohol etílico. El montaje experimental se puede apreciar en la **Figura 4**.

Este proceso se repitió para el nopal y la cáscara de pepino.



Figura 4: Montaje experimental para la extracción de la clorofila. El tubo de ensayo contiene trozos de espinaca en etanol al 80 % en baño María. La temperatura se midió con un termómetro y el agua se calentó con una parrilla eléctrica. La solución en el tubo se va poniendo de color verde debido al incremento de clorofila en ésta.

3.2. Espectrofotometría de las muestras

Una vez obtenidas las muestras, se realizó una disolución de 4.5ml de alcohol etílico al 80 % con 0.5ml de la muestra obtenida anteriormente (en nuestro caso, de espinaca, nopal y cáscara de pepino). Con esta disolución se hizo la espectrofotometría.

Ahora, para utilizar el espectrofotómetro se deben de hacer algunas consideraciones. La primera, es utilizar el tipo de lámpara correcto, debido a que el espectrofotómetro permite hacer un barrido UV-VIS (≈ 200 a 300 nm para el UV y de ≈ 300 nm a 800 nm). Para este barrido en particular, nos interesan las longitudes de onda entre

los 400 nm y 700 nm por lo que se utilizó la lámpara para el espectro visible.

En segundo lugar, es necesario dejar que la lámpara se estabilice, y para esto es necesario dejar el equipo encendido 20 minutos al menos.

Por último para obtener el espectro de absorción de la clorofila, es necesario hacer una línea base (baseline) del solvente utilizado. Esta línea base es el cero de nuestra absorción relativa y debe ser calibrado para cada longitud de onda. Las mediciones obtenidas son absorciones relativas que son adimensionales.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores se hizo un barrido de 460 nm a 692 nm cada 4 nm con todas las muestras obtenidas.

4. Análisis de Datos

Con los datos adquiridos del espectrofotómetro como se describió anteriormente se obtuvieron las gráficas de los espectros de absorción de la clorofila usando el lenguaje de programación Julia, utilizando la paquetería para graficar GR en su versión 0.6.2. Éstas gráficas se encuentran en **Figura 5** los datos de las 174 mediciones realizadas se encuentran en el notebook de Julia en la computadora de Eduardo Esquivel.

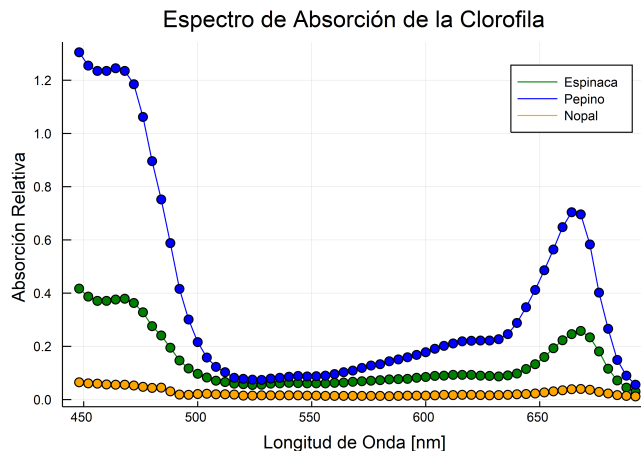


Figura 5: Espectro de absorción de la clorofila de la espinaca, nopal y cáscara de pepino. Se grafica absorbancia relativa vs longitud de onda.

Se hizo una normalización de cada espectro, dividiendo cada uno de los valores de la absorbancia relativa entre el valor máximo de ésta en cada gráfica. Esto se ve en la **Figura 6**. Esto con el objetivo de poder comparar bajo la misma escala las diferentes zonas de máximos y mínimos para cada muestra.

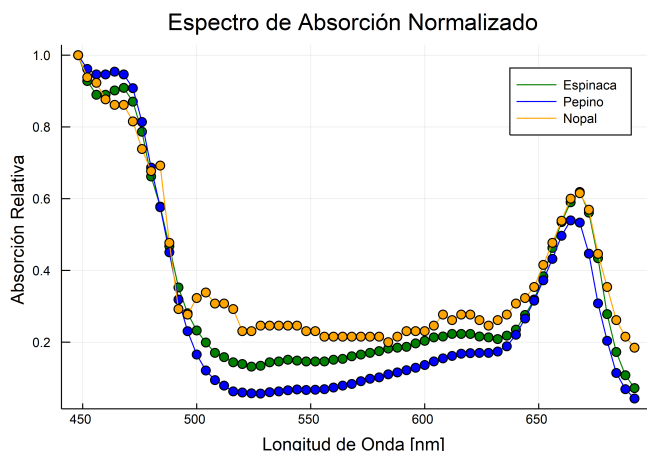


Figura 6: Espectro de absorción de la clorofila de la espinaca, nopal y cáscara de pepino. La normalización se llevó a cabo dividiendo cada uno de los valores de la absorbancia relativa entre el valor máximo de ésta en cada gráfica

5. Resultados y Discusión

Todas las longitudes de onda reportadas a continuación tienen una incertidumbre de ± 1 nm. Para la espinaca se encontró que los máximos de absorción están en 472 nm, 540 nm, 620 nm y 668 nm. Para la cáscara de pepino se encontraron en 468 nm, 544 nm, 616 nm y 664 nm. Finalmente para el nopal se encontraron en 468 nm, 544 nm, 616 nm y 668 nm.

Es importante señalar que aunque se observa un máximo común en todas las gráficas en 448 nm, no podemos asegurar que este sea un máximo de absorción, esto se debe a que nosotros conocemos de la teoría que la clorofila a tiene máximos de absorción entre 400 nm y 450 nm, pero por un descuido de los integrantes del equipo empezamos a medir cada vez en 448 nm, lo que no nos permite conocer en nuestras muestras con total seguridad en qué longitud de onda encontramos los máximos correspondientes a esas zonas características de la clorofila a.

A pesar de eso, encontramos una coincidencia común con rango de ± 4 nm en todas nuestras muestras para todos los picos máximos de absorción relativa, además, estos picos caen dentro de los rangos teóricos esperados de absorción, lo que nos indica que en efecto, bajo este procedimiento experimental sí podemos obtener tanto la clorofila a como la clorofila b, y que además estos dos tipos de clorofilas se encuentran en la espinaca, la cáscara de pepino y en el nopal. Es debido a esto que nuestras gráficas son una especie de suma de las gráficas de absorción tanto de la clorofila a como la clorofila b. Además encontramos que la concentración de las dos especies de clorofilas es mayor en la cáscara de pepino, seguida de la espinaca, mientras que en el nopal la concentración es muy baja en comparación a las dos anteriores.

Una mejora de este experimento se puede realizar obteniendo un barrido del espectro de absorción desde 400 nm hasta 710 nm, esto nos daría certidumbre sobre la zona de absorción de 400 nm a 450 nm, además de que se podrían realizar las mediciones cada 2 nm y no cada 4 nm, así se tendrían más puntos para reconstruir los espectros de absorción.

6. Conclusiones

Para la espinaca se encontró que los máximos de absorción están en 472 nm, 540 nm, 620 nm y 668 nm. Para la cáscara de pepino se encontraron en 468 nm, 544 nm, 616 nm y 664 nm. Finalmente para el nopal se encontraron en 468 nm, 544 nm, 616 nm y 668 nm. con incertidumbre de ± 1 nm para todas las mediciones. Estas mediciones son importantes porque de acuerdo con el espectro de absorción característico de las clorofila a y clorofila b podemos asegurar que en las muestras obtenidas en efecto hay una combinación de estas dos especies químicas presentes en las 3 muestras.

Todos los picos coinciden en las tres muestras con un rango de ± 4 nm. Sin embargo, todas las muestras presentaron concentraciones diferentes de las clorofilas siendo la cáscara de pepino la que tenía la mayor concentración y el nopal siendo la de menor concentración.

7. Bibliografía

- [1]SKOOG, D.A.; Leary J.J.; Análisis Instrumental, 4ta ed.; Ed. McGraw-Hill (1994), págs. 201-219.
- [2]Facultad de Ciencias Químicas. Lectura número 8. ESPECTROMETRÍA DE FLOURESCENCIA MOLECULAR. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- [3]Nelson, R. C. (1968), ENERGY LEVELS IN CHLOROPHYLL AND ELECTRON TRANSFER PROCESSES*,y. Photochemistry and Photobiology, 8: 441-450. doi:10.1111/j.1751-1097.1968.tb05888.x

Appendices

A. Estados excitados

Todos los átomos o moléculas poseen un número discreto de niveles de energía. A temperatura ambiente la mayoría de las especies se encuentran en su nivel energético más bajo denominado estado fundamental. Cuando una onda electromagnética interacciona con un átomo o molécula, la energía de dicha onda puede resultar absorbida si coincide exactamente con la energía necesaria para llevar a la molécula en cuestión desde el estado fundamental hasta alguno de los niveles energéticos superiores. En este caso la energía de la onda se transfiere a la molécula promoviéndola a un estado excitado.

La excitación originada por radiaciones visibles o ultravioleta promueve transferencias de electrones que se hallan en niveles bajos de energía hasta orbitales de energía superior. La transición de un electrón entre diferentes niveles de energía se denomina transición electrónica y el proceso de absorción asociado es conocido como absorción electrónica.

Asociados a cada nivel electrónico se encuentran diferentes niveles vibracionales, que son consecuencia de los niveles de energía cuantizados asociados a los enlaces intramoleculares. Las transiciones vibracionales se producen cuando se produce absorción de energía de longitud de onda infrarroja.

En la (Figura 7) se bosqueja un diagrama parcial de los niveles de energía de una molécula para diferentes tipos de radiación (radiación infrarroja, visible y ultravioleta).

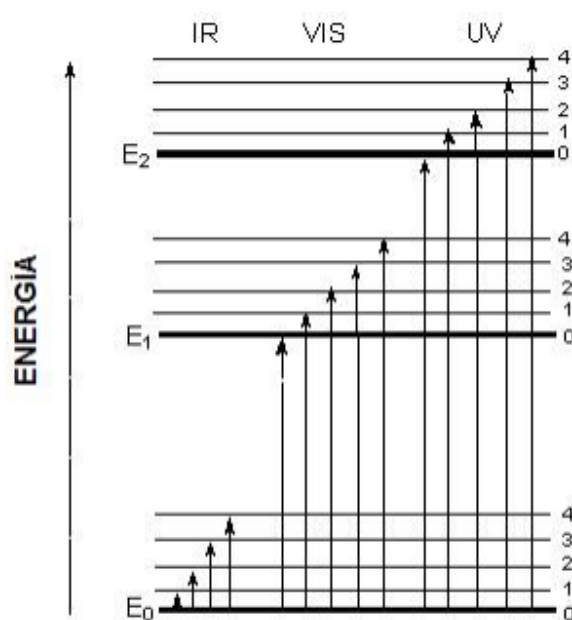


Figura 7: Diagrama de los niveles de energía de una molécula. Se muestran cambios debidos a absorción de radiación infrarroja (IR), visible (VIS) y ultravioleta (UV)

B. Spín del electrón

La mayoría de las moléculas poseen un número par de electrones. Estos dos electrones poseen diferente spin cuando están en el estado base. En esta situación se dice que los electrones están apareados y el momento magnético producido por el spin es cancelado, haciendo que la molécula sea diamagnética.

Cuando los pares electrónicos se encuentran apareados se le llama estado singlete. Se denota S_0 y S_1 al estado base y al primer estado excitado de un singlete.

Otra posibilidad es que durante el proceso de transferencia del electrón del estado base al estado excitado cambie su spin (haciendo que ambos electrones tengan el mismo spín). Este estado deja de ser singlete y se denomina triplete. Una ilustración heurística de estas configuraciones de spín se puede apreciar en la Figura 8

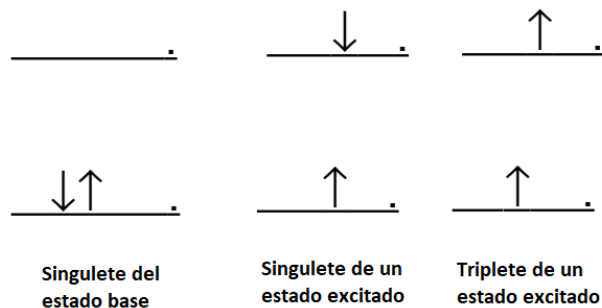


Figura 8: Configuraciones de spín para los estados base, singlete excitado y triplete excitado

Cabe resaltar, que para un triplete, la molécula es paramagnética, debido a que el momento magnético de los electrones (spín) no se cancela.

C. Procesos de desactivación o pérdida de energía

C.1. Conversión Externa

Es un proceso en el que el exceso de energía que tiene la especie excitada se pierde por choques moleculares entre la especie excitada y el solvente, el resultado neto es una transferencia de energía de la especie excitada a las moléculas vecinas y un incremento mínimo en la temperatura del solvente.

C.2. Conversión Interna

Es un proceso en el que se da un relajamiento no radiante (no hay emisión de radiación) entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Se ilustra por las flechas onduladas largas.

C.3. Relajación Vibracional

Tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente.

La ganancia de energía vibracional del disolvente se refleja en un ligero incremento de la temperatura del medio. La relajación vibracional es un proceso tan eficiente que el tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de 10^{-15} s.

Suele ser denotado por flechas onduladas cortas entre los niveles de energía vibracionales.

C.4. Cruce entre sistema

Proceso en el que el espín de un electrón excitado se invierte. La transición directa de un singlete a un triplete es altamente improbable.

La presencia de especies paramagnéticas como el oxígeno molecular (O_2) en la disolución también favorece el cruzamiento entre sistemas y consecuentemente disminuye la fluorescencia.

C.4.1. Fosforescencia

Después del cruce entre sistemas a un estado triplete excitado, la desactivación posterior puede tener lugar por conversión interna o externa o por fosforescencia.

Las conversiones externas e internas compiten con tanto éxito con la fosforescencia que este tipo de emisión se observa normalmente sólo a bajas temperaturas, en medios altamente viscosos o por moléculas que están absorbidas sobre superficies sólidas.

El proceso completo de excitación/desactivación se puede apreciar en la [Figura 9](#)

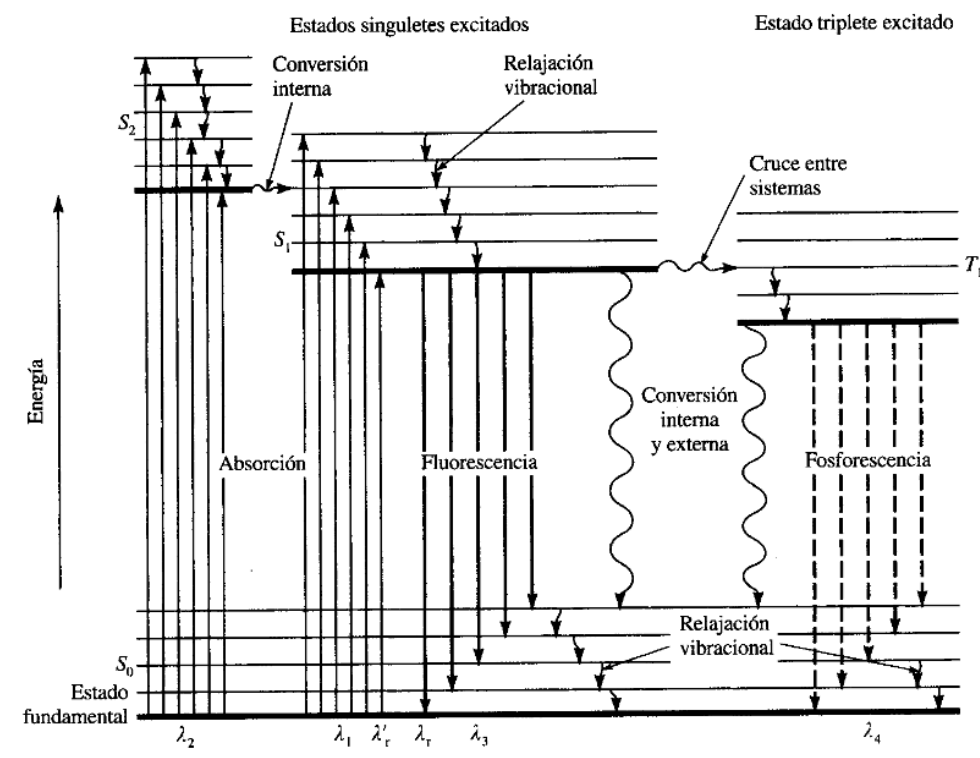


Figura 9: Proceso de excitación y desactivación de una molécula, los procesos de desactivación más probables son los de la izquierda, mientras que los menos probables se encuentran a la derecha