



Espectro de clorofila *a* y *b* de espinaca

Alonso Torres Edgar Giovanni, Lugo Porras Fabiola Viridiana

Profesor, M. en C. Hernández Flores Ricardo Martín

Laboratorio de Física Contemporánea II, Facultad de Ciencias, 2019-I
Universidad Nacional Autónoma de México



(Fecha de entrega 03/09/2018)

Se presentan los resultados de la espectroscopía realizada sobre una solución con clorofila, extraída de la espinaca, y etanol al 80 % haciendo uso de un espectrofotómetro para conseguir los espectros de absorción de la clorofila. El experimento se repitió en tres días distintos con la misma muestra para ver la degradación de la clorofila al observar los espectros de absorción. Dichos espectros muestran máximos cerca de 440, 460, 620 y 670 nm.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las prácticas más importantes para comprender diversos sistemas en la ciencia es la espectroscopía, cuya característica es obtener una distribución de intensidades producto de la interacción radiación–materia que sirve para estudiar una muestra ya sea para conocer su estructura interna, su respuesta a la radiación, su composición, entre otras propiedades y características. Un ejemplo del uso de la espectroscopía es el presente reporte: se utiliza la radiación electromagnética VIS para conocer el espectro de absorción de la clorofila en la espinaca.

La clorofila es una molécula conocida como pigmento ubicada dentro de los cloroplastos, los cuales se encuentran presentes en las células de las plantas. Una de las funciones que se lleva a cabo dentro de los cloroplastos es la fotosíntesis, para ello utilizan la clorofila que absorbe parte de la luz que llega a las plantas, reflejando la que no es absorbida dando a las plantas su conocido color verde (de ahí que se llamen pigmentos).

500 nm y 630 – 680 nm, 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 [2].

La clorofila está compuesta por cuatro anillos pirrólicos (figura 2) que a su vez forman un anillo, denominado tetrapirrólico, que enlaza en el centro con un ión Mg^{2+} . Los anillos pirrólicos se forman gracias a los enlaces σ , mientras que en el enlace cíclico π se encuentran los electrones deslocalizados (pertenecen a todo el anillo y no a un solo orbital), que se denominan electrones π . El anillo tetrapirrólico está unido a una cadena hidrofóbica lípida que sirve para mantener a las clorofilas sujetas a la membrana fotosintética.

Los niveles de energía de los anillos pirrólicos son debido a los electrones π . Para ello es conveniente considerar a la molécula de clorofila como un pozo de potencial en el cual los niveles electrónicos de energía están determinados por el número de electrones π y la dimensión del pozo. De esta manera los niveles de energía individuales de los anillos desaparecen y en cambio se tienen bandas características de todo el sistema (la molécula de clorofila) [3].

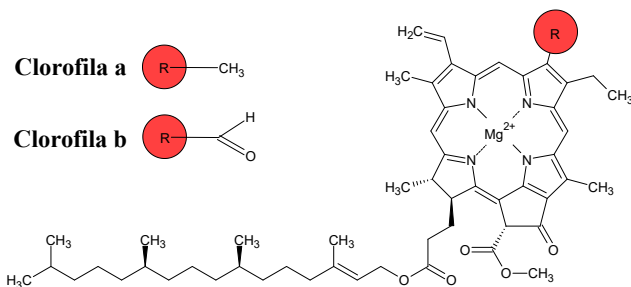


Fig. 1. Estructura de la molécula de clorofila.

Existen distintos tipos de clorofilas, la del tipo *a* (figura 1) es universal y está presente en todos los organismos fotosintetizadores, la clorofila *b* se encuentra en plantas y algas aunque en menor medida que la clorofila *a* (1:3) [1]. La clorofila *a* absorbe principalmente luz roja (entre 650 y 700 nm) y luz azul (de 400 a 450 nm), mientras que la clorofila *b* absorbe en 450-

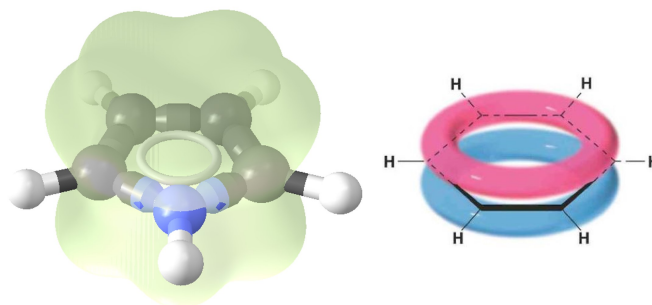
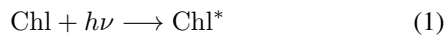


Fig. 2. Modelo 3D de un anillo pirrólico (izquierda). Los orbitales p de los átomos de C al enlazarse a los átomos de H y a otro átomo (C o N) crean orbitales hibridizados sp^2 que forman enlaces σ y enlaces π . En conjunto, el anillo forma un enlace π cíclico. Otro ejemplo de enlace π cíclico en benceno (derecha).

La absorción de luz se representa por la ecuación 1, en la cual la clorofila (Chl) en su estado base absorbe un fotón ($h\nu$) y realiza una transición a un estado excitado (Chl^*):



La absorción de luz azul excita a la clorofila a un mayor nivel de energía pues su energía es más grande (ver figura 3). En este estado excitado la clorofila es extremadamente inestable y cede rápidamente energía a sus alrededores en forma de calor, lo que provoca que acceda al menor estado excitado. En este estado tiene cuatro formas de deshacerse de la energía y regresar a su estado base: por fluorescencia al emitir un fotón de menor energía, disipando la energía en calor, transferirla a otra molécula y en reacciones químicas (como la fotosíntesis) [4, 5].

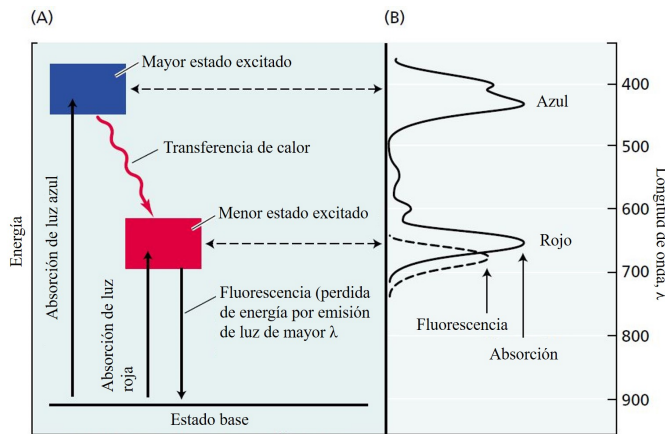


Fig. 3. Absorción y emisión de luz por la clorofila. (A) Diagrama de los niveles de energía de la molécula. (B) Espectro de absorción y fluorescencia.

Para el experimento, se necesita extraer la clorofila de las hojas de espinaca, 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 lípida se utiliza algún solvente no polar (etanol al 80 % en nuestro caso), 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) [6]. Esto disuelve en gran parte la membrana y deja al anillo tetrapirrólico sin la cadena lípida.

Para obtener el espectro de absorción de la clorofila se utiliza un espectrofotómetro (Spectronic 21 model DUV, Milton Roy), el cual tiene una lámpara de tungsteno que emite en el visible (debido a las vibraciones en su red atómica, radiación de cuerpo negro) y que pasa a través de un monocromador para seleccionar la longitud de onda incidente en la muestra con clorofila (figura 4).

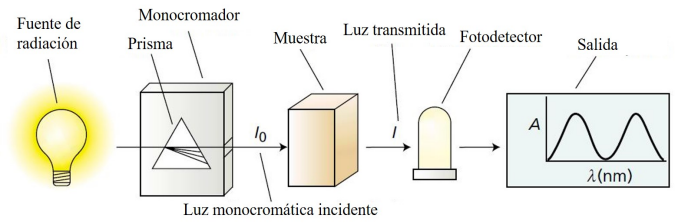


Fig. 4. Esquema del espectrofotómetro. El monocromador puede utilizar un prisma (por refracción) o una rejilla de difracción para seleccionar la longitud de onda deseada.

El espectrofotómetro da la absorbancia de la muestra con respecto a una referencia (por cada longitud de onda) utilizando la ley de Beer-Lambert:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \epsilon c l \quad (2)$$

donde A es la absorbancia, I es la intensidad transmitida 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.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

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 (80.0 ± 0.4 %) (preparado con (16.00 ± 0.05 ml) de etanol y (4.00 ± 0.05 ml) de agua inyectable estéril). Se fijó el tubo de ensayo a un soporte universal y se dejó en baño María aproximadamente durante 20 minutos a una temperatura de ($72 - 80$) °C (figura 5).

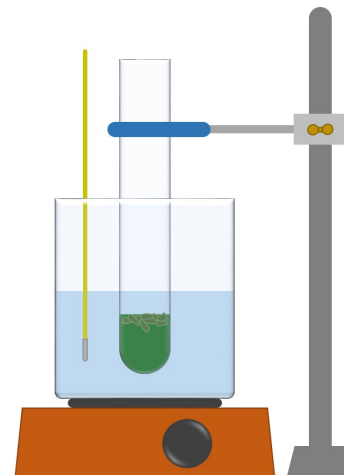


Fig. 5. Tubo de ensayo en el soporte universal con los trozos de espinaca en etanol al 80.0 % en baño María. La temperatura se midió con un termómetro y el agua se calentó con una parrilla eléctrica. La solución en el tubo se va poniendo de color verde debido al incremento de clorofila en ésta.

Posteriormente:

1. (0.50 ± 0.05) ml de la solución de clorofila en el tubo de ensayo se diluyó hasta (5.00 ± 0.08) ml con el etanol preparado a (80.0 ± 0.4) %.
2. Se depositó esta última solución en un recipiente (*cuvette*) del espectrofotómetro para obtener la absorbancia de la clorofila extraída, por lo que se puso en un segundo *cuvette* etanol preparado de referencia para tener la absorbancia relativa.

Se repitieron dos últimos pasos en tres días distintos: el *día 1* fue el mismo que se extrajo la clorofila de las espinacas frescas, los *día 2* y *día 3* fueron a los 5 y 7 días de la extracción, respectivamente. En el periodo de tiempo entre estos días el tubo de ensayo con la clorofila se mantuvo en refrigeración cubierto con papel aluminio y algodón cubriendo la boca.

El día 1 se tomaron los datos de absorbancia en el espectrofotómetro desde una longitud de onda de (450 ± 1) nm hasta (710 ± 1) nm cada 20 nm. Además se tomaron los datos para (680 ± 1) y (700 ± 1) nm. Para las longitudes de onda entre 400 y 440 nm el espectrofotómetro se saturó y no se registró en ese rango.

En los días 2 y 3 se tomaron datos entre (400 ± 1) nm y (710 ± 1) nm cada 10 nm.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Con los datos adquiridos se obtienen las gráficas de las figuras 6, 7 y 8 utilizando el software SciDAVis. A partir de las gráficas observamos que los máximos de absorción están alrededor de 440, 460, 620 y 670 nm, los cuales concuerdan con máximos de absorción en la espinaca reportados [4, 7].

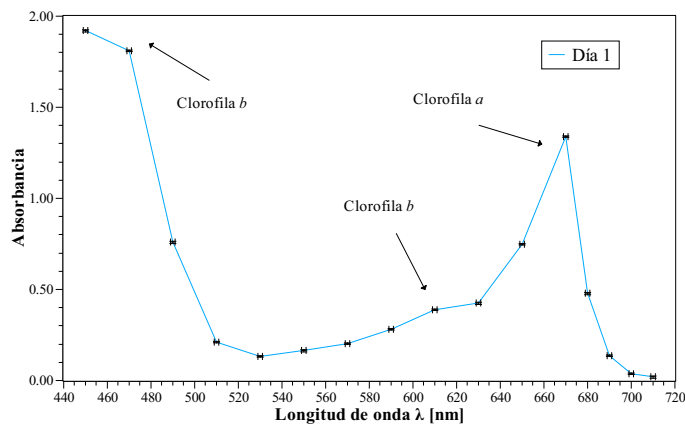


Fig. 6. Espectro de absorción de la clorofila de espinaca el día 1. El intervalo de longitudes de 400 a 450 nm se omite debido a que el espectrofotómetro no obtuvo una lectura.

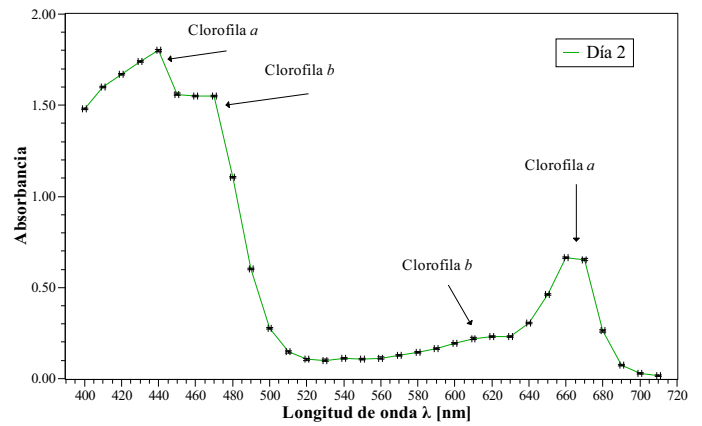


Fig. 7. Espectro de absorción de la clorofila de espinaca el día 2.

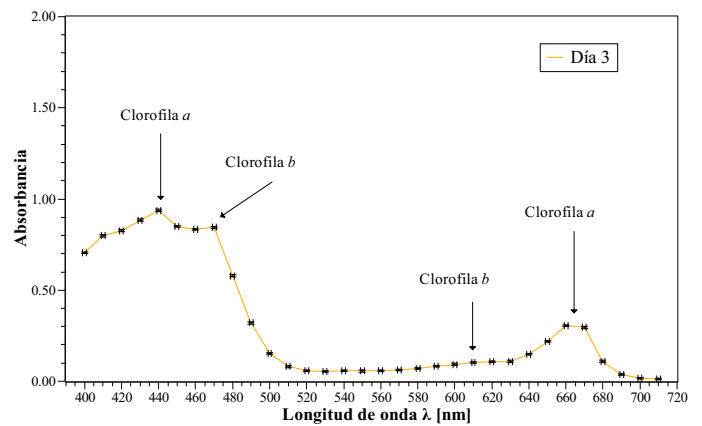


Fig. 8. Espectro de absorción de la clorofila de espinaca el día 3.

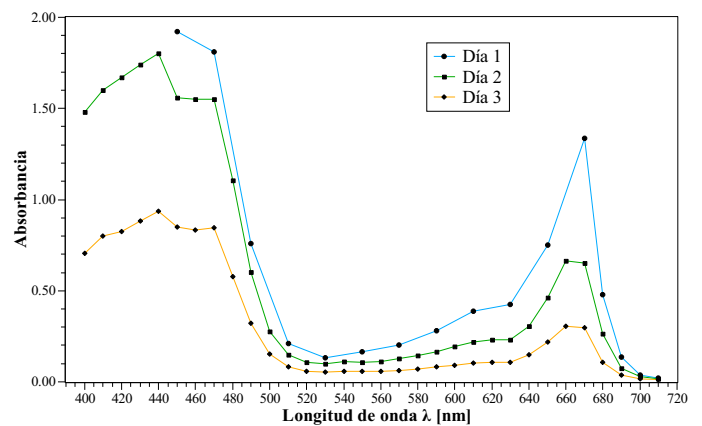


Fig. 9. Espectros resultantes de los tres días. Se observa la degradación de la clorofila presente en la solución utilizada.

Como se discutió antes, la clorofila *b* absorbe un poco más hacia el verde, así en las gráficas se etiquetan los máximos de absorción como se muestra.

Comparando estas gráficas (fig. 9) se observa que el comportamiento del espectro, cualitativamente, es el mismo durante los tres días, lo más notable es que la absorbancia de

la muestra se redujo con el tiempo. Puesto que los espectros resultantes son debidos a la presencia de clorofilas en la solución, se concluye, como es de esperarse, que las clorofilas en la muestra se degradan con el tiempo.

4. CONCLUSIONES

Se concluye que los pigmentos presentes más abundantes en las hojas de espinacas son las clorofila *a* y *b* pues el espectro de absorción obtenido se comporta como el de dichos pigmentos y los máximos de absorción de absorción son congruentes con los reportados en otros lados de la literatura, siendo los obtenidos alrededor de 440, 460, 620 y 670 nm. También se concluye sobre la degradación de la clorofila con el tiempo, aún cuando la solución se mantuvo en refrigeración y cubierta para disminuir la cantidad de luz incidente.

5. ANEXOS

$\lambda \pm 1$ [nm]	$A \pm 0.005$	$\lambda \pm 1$ [nm]	$A \pm 0.005$
450	1.920	610	0.389
470	1.810	630	0.424
490	0.759	650	0.749
510	0.211	670	1.338
530	0.132	680	0.478
550	0.164	690	0.136
570	0.203	700	0.038
590	0.280	710	0.019

Tabla I. Datos del espectrofotómetro en el día 1.

$\lambda \pm 1$ [nm]	$A \pm 0.005$	$\lambda \pm 1$ [nm]	$A \pm 0.005$
400	1.480	560	0.113
410	1.600	570	0.127
420	1.670	580	0.145
430	1.740	590	0.165
440	1.800	600	0.193
450	1.560	610	0.220
460	1.550	620	0.232
470	1.550	630	0.231
480	1.105	640	0.304
490	0.603	650	0.462
500	0.276	660	0.665
510	0.147	670	0.653
520	0.106	680	0.262
530	0.101	690	0.075
540	0.111	700	0.029
550	0.108	710	0.017

Tabla II. Datos del espectrofotómetro en el día 2.

$\lambda \pm 1$ [nm]	$A \pm 0.005$	$\lambda \pm 1$ [nm]	$A \pm 0.005$
400	0.706	560	0.057
410	0.798	570	0.063
420	0.826	580	0.070
430	0.884	590	0.082
440	0.938	600	0.092
450	0.850	610	0.104
460	0.832	620	0.107
470	0.844	630	0.109
480	0.579	640	0.148
490	0.320	650	0.218
500	0.153	660	0.306
510	0.081	670	0.295
520	0.058	680	0.109
530	0.054	690	0.038
540	0.058	700	0.017
550	0.056	710	0.013

Tabla III. Datos del espectrofotómetro en el día 3.

6. REFERENCIAS

- [1] Scheer, H. (2017) *Structure and occurrence of chlorophylls*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/33028516_Structure_and_occurrence_of_chlorophylls.
- [2] Eggink, L. L., Park, H., & Hooper, J. K. (2001). *The role of chlorophyll b in photosynthesis: Hypothesis*. *BMC Plant Biology*, 1, 2. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-1-2>
- [3] Nelson, R. C. (1968), ENERGY LEVELS IN CHLOROPHYLL AND ELECTRON TRANSFER PROCESSES*,*Photochemistry and Photobiology*, 8: 441-450. doi:10.1111/j.1751-1097.1968.tb05888.x
- [4] Taiz, L. & Zeiger, E. *Plant Physiology*. 3rd Ed. Sinauer Associates (2002) pp. 113-115.
- [5] Nolan, Diane. *Los Pigmentos Vegetales y la Fotosíntesis*. Recuperado de <https://passel.unl.edu/communities/index.php?informationmodule=1011797732&topicorder=3&maxto=10&mint=1&idcollectionmodule=1130274228>, consultado: 15/08/2018.
- [6] *Know Your Inner FATTY: All about Lipids*. Recuperado de http://www.chem.ucla.edu/~harding/ec_tutorials/tutorial87.pdf, consultado: 01/09/2018.
- [7] Magdalena Makarska-Bialokoz & Agnieszka A. Kaczor (2014) *Computational Analysis of Chlorophyll Structure and UV-Vis Spectra: A Student Research Project on the Spectroscopy of Natural Complexes*, *Spectroscopy Letters*, **47:2**, 147-152, DOI: 10.1080/00387010.2013.781038