



Práctica 1

Espectro de absorción de la clorofila

Carlos Esteves Flores

carlos.stvs@ciencias.unam.mx

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

Fecha de entrega: 24 de febrero de 2023

Resumen

Esta práctica consistió en la obtención del espectro de absorción de la clorofila y la identificación del tipo de clorofila (A ó B) de la espinaca, a partir de la preparación de una muestra de extracto de espinaca con alcohol al 98 %, que fue introducida en una cubeta de vidrio para su análisis con ayuda de un espectrofotómetro. Se realizó un barrido de longitudes de onda con la perilla diseñada para ese fin en el aparato (de 380 a 710 nm), y se obtuvo una gráfica de Absorbancia vs Longitud de Onda, para el espectro de absorción de la muestra espinaca-alcohol, así como también para una muestra de alcohol; esto para realizar una resta de ambos espectros y obtener el espectro de absorción de la clorofila. Una vez obtenida la gráfica para la clorofila, se comparó con las de la teoría para determinar que la espinaca contiene la molécula de clorofila-A.

Palabras clave: clorofila, espectrofotómetro, absorción, emisión, fluorescencia, fosforescencia, Ley de Beer-Lambert.

1. Introducción

Objetivo:

- Obtener el espectro de absorción de la molécula de la clorofila, utilizando un espectrofotómetro e identificar el tipo de clorofila que contiene la hoja de espinaca (A ó B).

Comencemos revisando algunos conceptos para la realización de esta práctica, empezando por la molécula de clorofila, la cual está compuesta de dos partes:

- Un anillo de porfirina, el cual tiene en su centro un ión de magnesio (Mg^{2+}). Esta parte de la molécula es la que se encarga de absorber la luz.
- Una cadena hidrófoba de fitol, la cual mantiene a la clorofila integrada en la membrana fotosintética.

Para los fines que necesitamos, mencionaremos los dos tipos de clorofila revisados en esta práctica. Por un lado, se tiene a la *clorofila A*, la cual se encuentra

en todas las plantas y algas, y difiere de la *clorofila B* en que el radical de la posición 3 del grupo tetrapirrólico es metilo ($-CH_3$) en lugar de CHO . La *clorofila B*, por su parte, se encuentra en las algas verdes, plantas terrestres y algunas cianobacterias.[4]

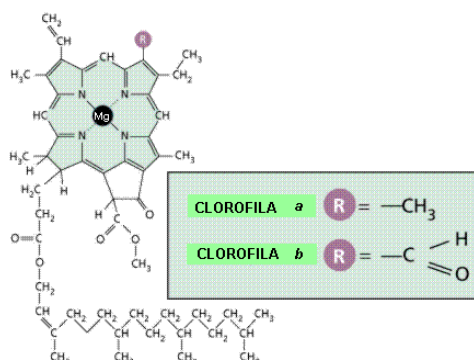


Figura 1. Molécula de la clorofila.

El enlace R se sustituye por alguno de los listados, dependiendo del tipo de clorofila.

El espectro de absorción, en pocas palabras, se refiere al muestreo de las fracciones de la radiación electromagnética (en este caso, luz) que un material, sustancia o molécula, absorbe dentro de un rango de longitudes de onda. Para los fines que se tienen en esta práctica, el espectro de absorción muestra el comportamiento de la luz incidente sobre las moléculas de la clorofila, la cual absorbe gran parte del espectro de la luz visible, y mayormente, suele reflejar la luz en las longitudes de onda del color verde. En la Figura 2, se pueden observar las diferentes gráficas que se tienen para cada tipo de clorofila y los carotenoides. Como se puede observar, para la clorofila A y B principalmente, las longitudes de onda de la luz que menor absorción tienen son las que se encuentran entre los 500 y 600 nm, donde están englobados los colores verde, amarillo y naranja. Usualmente, son estos colores los que se observan en las plantas, pues es la longitud de onda del espectro visible que más tienden a reflejar, o de forma más técnica, es la luz en esa longitud de onda que tienden más a *emitir*.

Espectro de absorción de los pigmentos

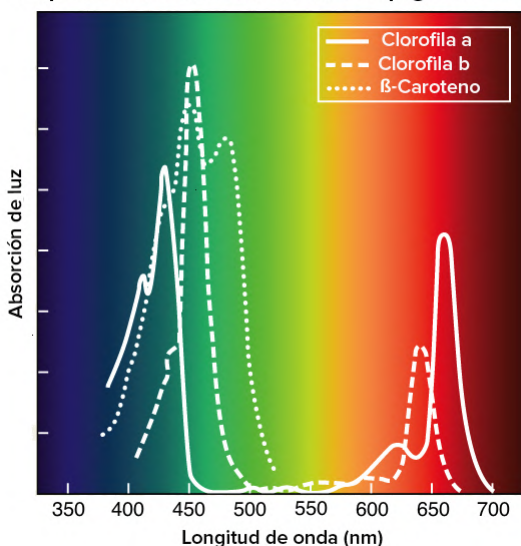


Figura 2. Espectro de absorción para clorofila A, clorofila B y los carotenoides. Extraída de [1].

Los picos del espectro de absorción de la clorofila A, se dan en los 430 nm y los 662 nm aproximadamente. Presenta un color verde-hierba. Los picos del espectro de absorción de la clorofila B, tienen lugar en los 453 nm y los 642 nm. Presenta un color verde-azulado. La *Ley de Beer-Lambert* es una forma de describir la relación entre la absorbancia y la transmitancia sobre

la materia. Primero mencionemos lo que nos dice la Ley de Lambert: "*La fracción de la luz absorbida por un medio transparente es independiente de la intensidad de la luz incidente, y cada capa sucesiva del medio, absorbe una fracción igual a la luz pasando a través de él.*". Enunciamos la siguiente ecuación:

$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = kl \quad (1)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, l es la longitud por donde pasa la luz en la celda del espectrofotómetro y k es la constante del medio. La Ley de Beer establece que "*la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas del cromóforo (sustancia con electrones capaces de absorber energía y excitarse) a través del cual pasa la luz*". Enunciamos la ecuación para esta ley:

$$k = \epsilon c \quad (2)$$

donde c es la concentración y ϵ es el coeficiente molar de absorción. De las ecuaciones 1 y 2, podemos obtener la relación

$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon cl \quad (3)$$

Si consideramos $\log(I_0/I)$ como la *absorbancia*, al inverso del cociente entre la luz incidente y la transmitida se le llama *transmitancia* ($T = I/I_0$), por lo que se obtiene la ecuación de Beer-Lambert [3]

$$A = \log \left(\frac{1}{T} \right) = \epsilon cl \quad (4)$$

lo que nos lleva a enunciar la *Ley de Beer-Lambert*, la cual nos dice que "*la absorbancia debe ser linealmente proporcional a la concentración del cromóforo*". Algunos materiales presentan dos fenómenos que están relacionados con la excitación de sus electrones a nivel subatómico. Estos fenómenos son conocidos como la *fluorescencia* y la *fosforescencia*.

La *fluorescencia* es la emisión de luz en los estados singlete, donde un electrón en un orbital excitado está apareado (espines opuestos) a un segundo electrón que se encuentra en un orbital en el estado base. En consecuencia, el regreso al estado base es "permitido" por el espín y ocurre rápidamente por emisión de un fotón, cuya vida media es cercana a los 10 ns. Por otro lado, la *fosforescencia* es la emisión de luz en los estados excitados triplete, donde un par de electrones, uno en el estado base y otro en un estado excitado, tienen sus espines desapareados, por lo que la transición al estado base es impedida y, en consecuencia, las velocidades de emisión son lentas, lo

que se traduce en que la vida media de la fosforescencia sea de milisegundos a segundos. En cuanto al aparato utilizado en la práctica, el cual es el *espectrofotómetro*, es un instrumento que apoya a la espectrofotometría para medir la cantidad de intensidad de luz absorbida después de pasar a través de una solución muestra. La forma de operarlo está descrita en el manual de la práctica [2] en la página 23.

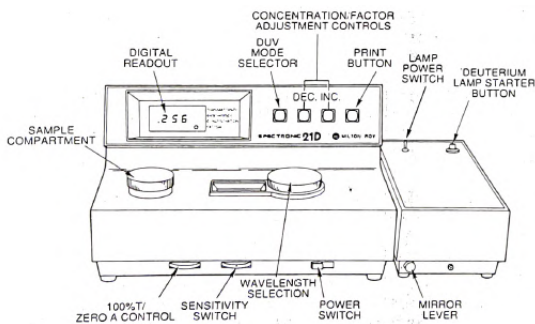


Figura 3. Espectrofotómetro utilizado en esta práctica. [2]

2. Metodología

2.1. Materiales

- báscula
- 1 tubo de ensayo
- 2 vasos de precipitado (600 y 100 mL)
- 2 pipetas de 5 mL
- etanol (se utilizó alcohol al 98 %)
- hojas de espinaca
- agua destilada
- parrilla
- termopar
- papel filtro
- 2 soportes universales
- 2 nueces
- 2 pinzas
- 1 embudo
- mortero
- espectrofotómetro
- 2 cubetas de vidrio (para el espectrofotómetro)

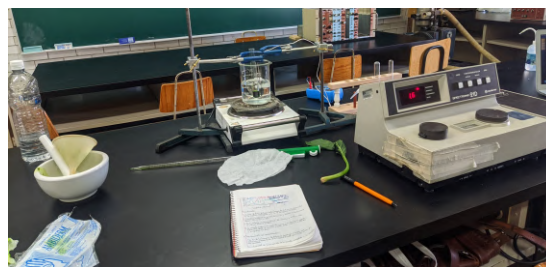


Figura 4. Material y montaje utilizado en el experimento.

2.2. Diseño experimental

En el montaje de la práctica, se utilizó la báscula de precisión del Laboratorio para pesar la cantidad requerida de hojas de espinaca. El mortero se utilizó para machacar las hojas de espinaca diluidas con cierta cantidad de alcohol. Para realizar el baño maría, se puso sobre la parrilla el vaso de precipitado con agua destilada y se calentó hasta alcanzar la temperatura adecuada. Se midió la temperatura del agua poniendo la punta del termopar en el agua, sosteniendo el cable con una pinza montada en un soporte universal con la nuez, sin tocar el fondo y tampoco las paredes. El tubo de ensayo donde se vertió la cantidad de muestra que se utilizó, estaba sostenido por la otra pinza con sus respectivos soporte y nuez.

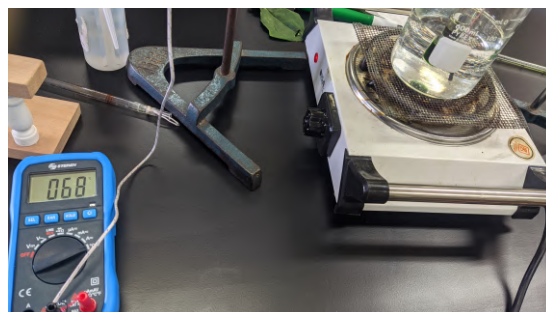


Figura 5. Montaje para calentar la disolución.

El espectrofotómetro, una vez conectado, se encendió y dejó inactivo durante los 30 minutos indicados en el manual. Una vez que se tuvo la muestra para hacer las mediciones, se configuró éste en sensibilidad alta con la perilla de sensibilidad, poniendo la absorbancia en 0 A con la perilla de control, en el modo de *absorbancia* para obtener directamente los valores que se requirieron. Se utilizó la perilla de longitud de onda para hacer el barrido necesario para las mediciones.

2.3. Procedimiento

Primero, se cortaron pedazos de hoja de espinaca y se fueron colocando en la báscula de precisión, hasta tener un peso cercano a los 0.5 gramos. Se utilizaron 0.5482 g de espinaca. Después, la espinaca se colocó en el mortero y, con ayuda de una pipeta, se vertieron 5 mL de alcohol al 98 % en el mortero. Con esto, se machacaron las hojas con el alcohol para obtener una disolución hasta que los restos de hojas cambiaron su tonalidad a marrón. Con ayuda del papel filtro y el embudo, se vertió la disolución del mortero al vaso de precipitado de 50 mL.



Figura 6. Disolución de alcohol-espinaca después de filtrarse.

A la par de lo anterior, se encendió el espectrofotómetro para que se calentara mientras se realizaba el resto del procedimiento (se requerían 30 minutos de encendido previo a las mediciones).



Figura 7. Mortero y embudo, para machacar y vertir la disolución de alcohol con espinaca.

De igual manera, se montó el sistema para el baño maría (Figura 5), y se encendió la parrilla para calentar el agua del vaso de precipitado de 100 mL a una temperatura de entre 80°C y 84°C, que se midió con el termopar. Una vez que se alcanzó la temperatura, se vertió la disolución en el tubo de ensayo y se dejó en el baño maría por 20 minutos. *NOTA: En la sesión realizada el 20 de febrero de 2023, el equipo decidió repetir el experimento, esta vez haciendo el triple de disolución dada la facilidad con la que se evaporaba durante el baño maría.* Luego, con la pipeta, se extrajo una cantidad de 0.5 mL de la disolución para diluirla con otros 5 mL de alcohol.



Figura 8. Disolución después del baño maría.

Hecho lo anterior, se vertió la muestra en una de las cubetas de vidrio hasta cubrir el orificio por el que incide la luz del espectrofotómetro completamente (Figura 9).



Figura 9. Muestra final en la cubeta de vidrio.

Después, se colocó la cubeta en el porta-muestras

del espectrofotómetro y se asentó en el compartimiento para muestras del mismo. Al estar ya en tiempo de operación, el aparato se configuró en el modo de *absorbancia* para medir directamente los valores de ésta haciendo un barrido con ayuda de la perilla de longitud de onda desde los 394 nm hasta los 690 nm en incrementos de 4 nm. Se registró en la bitácora y en Excel la longitud de onda seleccionada y la absorbancia mostrada en la pantalla del espectrofotómetro. Este procedimiento para tomar mediciones se repitió también con alcohol en la segunda cubeta de vidrio; esto para obtener más adelante el valor de la absorbancia para la clorofila "pura".

3. Resultados

Las tablas con los datos de las mediciones se encuentran en el apéndice. Al graficar los datos obtenidos para la absorbancia en función de la longitud de onda, en la sesión del 20 de febrero, con el espectrofotómetro, se obtuvieron las siguientes gráficas:

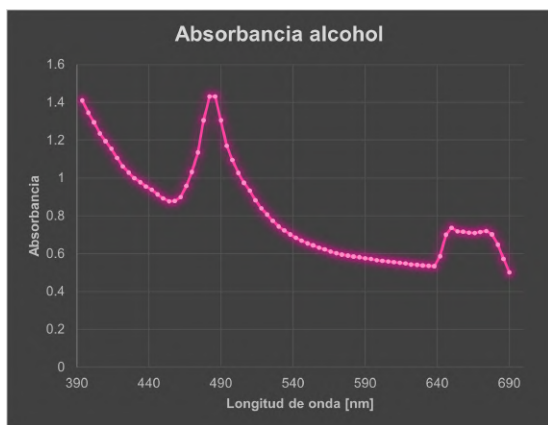


Figura 10. Absorbancia del alcohol vs Longitud de onda.

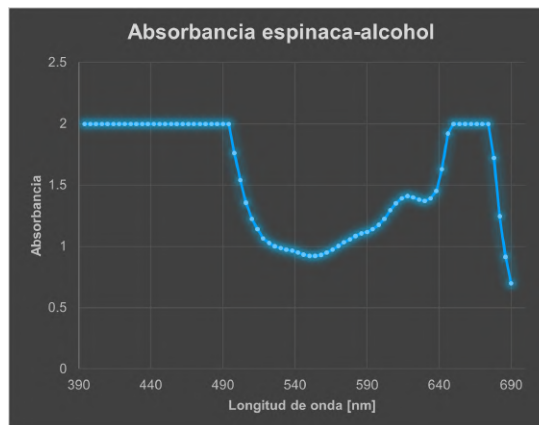


Figura 11. Absorbancia de la muestra vs Longitud de onda.

4. Discusión

En la sesión del 15 de febrero, se midió la transmitancia con el espectrofotómetro, sin embargo, se decidió descartar las mediciones de esta sesión dado que el espectrofotómetro nos daba la facilidad de medir directamente la absorbancia, por lo cual podíamos evitar perder información y arrastrar incertidumbre en los cálculos con la ecuación 4, además de que el barrido de longitud de onda se realizó desde los 430 nm hasta los 750 nm con incrementos de 10 nm. Así, fue que los datos proporcionados en este reporte, corresponden a la sesión del 20 de febrero de 2023.

Con los datos obtenidos para la absorbancia de la muestra y la absorbancia del alcohol, con el barrido de longitud de onda desde los 394 nm hasta los 690 nm con incrementos de 4 nm, se notó que para obtener el espectro de absorción buscado había que restar los datos del alcohol a los datos de la muestra. De igual forma, los resultados de esta resta están en la tabla del apéndice. La gráfica resultante para el espectro de absorción de la clorofila fue la siguiente:

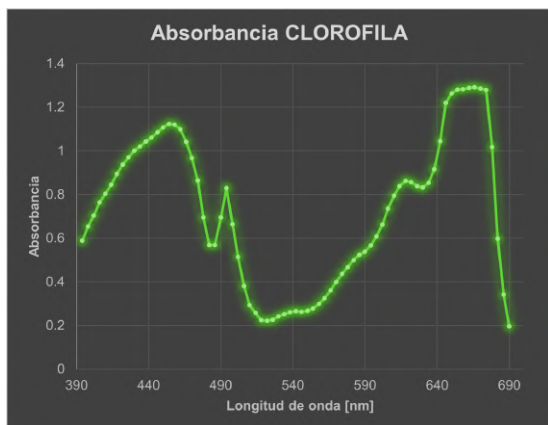


Figura 12. Absorbancia de la Clorofila vs Longitud de onda.

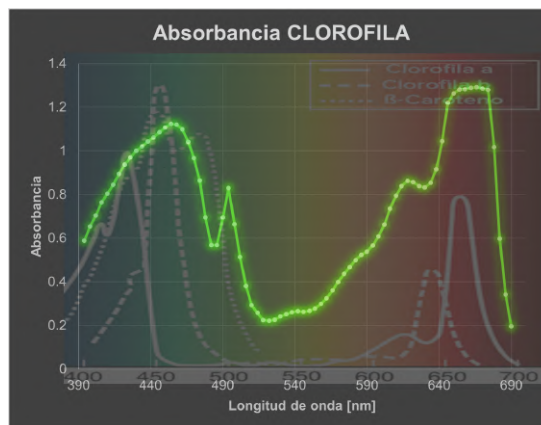


Figura 13. Comparación del espectro experimental con los teóricos.

Se puede notar en la Figura 12 una gráfica similar a la esperada entre las que están en la Figura 2. Se puede ver que hay un pico de absorción justo después del primero (en 494 nm), que no se presenta en las esperadas. Esto puede deberse a factores como lo fueron el filtrado de la disolución después de machacar en el mortero, dado que en la última sesión, no se contó con papel filtro y se utilizó papel higiénico del Laboratorio, que aunque tenía cierto grosor, no fue la forma más óptima de realizar el filtraje. Por otro lado, el espectrofotómetro fue difícil de manipular en el sentido de que en el manual de operación del mismo, se señalaba que debía configurarse la transmitancia o la absorbancia en 100 % o 0 A, respectivamente; sin embargo, esto no era posible a pesar de que se giraba la perilla 'Increase/Decrease' del mismo, ya que en cada sensibilidad (baja, media o alta) con la que éste contaba, había un cota inferior y superior, que no se acercaba lo suficiente a lo sugerido por el manual.

En consecuencia de la gráfica de la Figura 12, para hacer una mejor comparación, se presenta a continuación una superposición de la Figura 2 con la gráfica del espectro de absorción de la clorofila.

5. Conclusión

Tomando en cuenta la comparación hecha con la Figura 13, se pudo concluir que **el tipo de clorofila que contienen las hojas de espinaca corresponde a la de la clorofila A**. Fuera del Laboratorio, el equipo notó que había faltado observar el fenómeno de la fluorescencia o fosforescencia de la clorofila, por lo cual, en casa se preparó una muestra licuando alcohol y espinaca, y se hizo incidir luz UV con una lámpara usual para detectar billetes falsos. Con esto hecho, la conclusión es que **la clorofila presenta el fenómeno de la fluorescencia**. Como un extra, se comparó con una pelota fosforescente para hacer más clara la diferencia entre estos dos fenómenos, donde, como se observa en la Figura 15, en el pequeño recuadro en la misma imagen, se apagó la luz y la pelota siguió emitiendo fotones, mientras que la clorofila no. Así, se concluye satisfactoriamente esta práctica.



Figura 14. Fosforescencia de la clorofila.

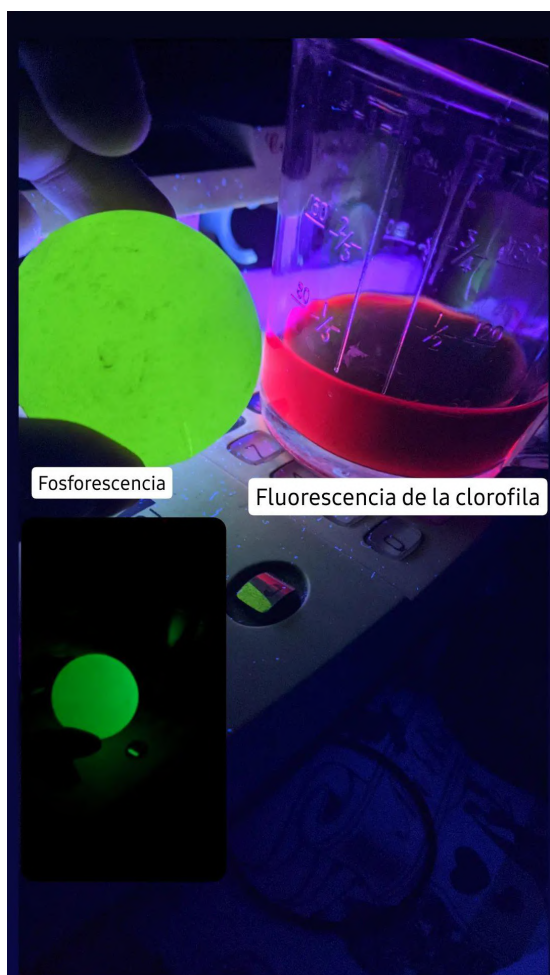


Figura 15. Comparación de la fluorescencia con la fosforescencia.

Apéndice A. Tablas de datos para la absorbancia

Se presentan las mediciones en dos tablas, dado que no es posible acomodarlas en una sola, y en una página.

Tabla 1. Mediciones para la absorbancia

λ ($\pm 1nm$)	Alcohol-espinaca (± 0.0005)	Alcohol (± 0.0005)	Clorofila (± 0.001)
394	1.999	1.410	0.589
398	1.999	1.345	0.654
402	1.999	1.295	0.704
406	1.999	1.235	0.764
410	1.999	1.195	0.804
414	1.999	1.155	0.844
418	1.999	1.105	0.894
422	1.999	1.062	0.937
426	1.999	1.028	0.971
430	1.999	0.998	1.001
434	1.999	0.978	1.021
438	1.999	0.956	1.043
442	1.999	0.938	1.061
446	1.999	0.914	1.085
450	1.999	0.892	1.107
454	1.999	0.876	1.123
458	1.999	0.878	1.121
462	1.999	0.900	1.099
466	1.999	0.958	1.041
470	1.999	1.032	0.967
474	1.999	1.135	0.864
478	1.999	1.305	0.694
482	1.999	1.430	0.569
486	1.999	1.430	0.569
490	1.999	1.305	0.694
494	1.999	1.170	0.829
498	1.760	1.095	0.665
502	1.540	1.026	0.514
506	1.355	0.974	0.381
510	1.225	0.932	0.293
514	1.140	0.882	0.258
518	1.065	0.840	0.225
522	1.028	0.806	0.222
526	1.000	0.774	0.226
530	0.986	0.744	0.242
534	0.974	0.722	0.252
538	0.964	0.702	0.262
542	0.950	0.684	0.266

Tabla 2. Mediciones para la absorbancia (continuación).

λ ($\pm 1nm$)	Alcohol-espinaca (± 0.0005)	Alcohol (± 0.0005)	Clorofila (± 0.001)
546	0.932	0.669	0.263
550	0.922	0.655	0.267
554	0.922	0.644	0.278
558	0.930	0.631	0.299
562	0.948	0.623	0.325
566	0.972	0.611	0.361
570	1.002	0.602	0.400
574	1.032	0.595	0.437
578	1.056	0.589	0.467
582	1.085	0.585	0.500
586	1.105	0.581	0.524
590	1.115	0.576	0.539
594	1.140	0.572	0.568
598	1.175	0.566	0.609
602	1.225	0.562	0.663
606	1.295	0.559	0.736
610	1.350	0.555	0.795
614	1.390	0.551	0.839
618	1.410	0.547	0.863
622	1.400	0.543	0.857
626	1.380	0.541	0.839
630	1.370	0.537	0.833
634	1.390	0.536	0.854
638	1.450	0.534	0.916
642	1.630	0.586	1.044
646	1.920	0.700	1.220
650	1.999	0.736	1.263
654	1.999	0.718	1.281
658	1.999	0.716	1.283
662	1.999	0.710	1.289
666	1.999	0.708	1.291
670	1.999	0.714	1.285
674	1.999	0.720	1.279
678	1.720	0.702	1.018
682	1.245	0.647	0.598
686	0.914	0.572	0.342
690	0.698	0.501	0.197

Referencias

- [1] Khan Academy. *Luz y pigmentos fotosintéticos*. 22 de feb. de 2023. URL: <https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis/a/light-and-photosynthetic-pigments>.
- [2] Facultad de Ciencias UNAM. *Manual de práctica 'Espectro de absorción de la Clorofila'*. 1.^a ed. Laboratorio de Física Contemporánea.
- [3] T. Tanaka. *Experimental Methods in Polymer Science*. 1.^a ed. Academic Press, 2000. ISBN: 978-0-12-683265-5.



- [4] Georgia State University. *Los Pigmentos en la fotosíntesis*. 22 de feb. de 2023. URL: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/Biology/pigpho.html#c2>.