

EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PIGMENTOS VEGETALES

MANCILLA, C. G. E.; CASTREJÓN, C. R.; ROSAS, T. M; BLANCO, E. Z. y PÉREZ, S. L. J.

Q.F.B.; V Semestre: Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec
(Av. Constituyentes No. 151 Col. San Miguel Chapultepec. C.P. 11850 México, DF.)

Resumen.....	1
Introducción.....	2
<i>I.- Pigmentos fotosintéticos.....</i>	<i>3</i>
<i>II.-Fotosíntesis.....</i>	<i>4</i>
<i>III. Clorofilas.....</i>	<i>5</i>
<i>IV. Cromatografía.....</i>	<i>7</i>
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	10
Material.....	10
Metodología.....	10
Resultados.....	12
Discusión de Resultados.....	13
Conclusiones.....	14
Referencias.....	14

RESUMEN:

Los cloroplastos poseen una mezcla de pigmentos con diferentes colores: clorofila-a (verde intenso), clorofila-b (verde), carotenos (amarillo claro) y xantofilas (amarillo anaranjado) en diferentes proporciones.

Todas estas sustancias presentan un grado diferente de solubilidad en disolventes apolares, lo que permite su separación cuando una solución de las mismas desciende por a través de una columna de cromatografía verticalmente sobre una película de un disolvente orgánico, ya que las más solubles se desplazarán a mayor velocidad, pues acompañarán fácilmente al disolvente a medida que éste desciende. Las menos solubles avanzarán menos en la columna.

Aparecerán, por tanto, varias bandas de diferentes colores (hasta siete o más, dependiendo del material utilizado) que estarán más o menos alejados de la disolución alcohólica según la mayor o menor solubilidad de los pigmentos. Estas bandas poseerán diferente grosor, dependiendo de la abundancia del pigmento en la disolución.

En la práctica se extrajeron estas clorofilas al primero hervir en agua las espinacas para retirar el almidón, después se extrajeron con una mezcla de metanol y éter dietílico las clorofilas y por medio de una extracción líquido-líquido con éter de petróleo clorofilas y carotenos con ayuda de una solución sobresaturada de NaCl para evitar emulsiones y obtener las 2 fases. Una vez extraídos los pigmentos fotosintéticos, se procedió a realizar una cromatografía de adsorción para separar las distintas clorofilas que componen dichos pigmentos fotosintéticos que componen las coloraciones de las hojas de las plantas observándose que estas se iban corriendo por la columna dependiendo de la afinidad que tuvieran por el disolvente y se obtenían en diferentes cantidades de acuerdo al tipo de clorofila, ya que por ejemplo se obtuvo en mayor cantidad la clorofila alfa debido a que esta es la que compone casi el 75% de las clorofilas de la planta.

INTRODUCCIÓN

La clorofila es un pigmento de las plantas, que les proporciona su color verde y que absorbe la luz necesaria para la fotosíntesis. La clorofila absorbe principalmente luz violeta roja y azul y refleja luz verde.

La abundancia de clorofila en hojas y su ocasional presencia en otros tejidos vegetales es la causa de que esas partes de las plantas aparezcan verdes, pero en algunas hojas la clorofila es enmascarada por otros pigmentos. La extracción y reconocimiento de estos pigmentos es interesante para el estudio y conocimiento de sus propiedades.[1]

Los Pigmentos vegetales, que se encuentran en los cloroplastos, son moléculas químicas que reflejan o transmiten la luz visible, o hacen ambas cosas a la vez. El color de un pigmento depende de la absorción selectiva de ciertas longitudes de onda de la luz y de la reflexión de otras. Constituyen el sustrato fisicoquímico donde se asienta el proceso fotosintético.

Hay diversas clases de pigmentos:

Principales:

- Clorofilas (a, b, c, d y bacterioclorofilas) de coloración verde.

Accesorios:

- Carotenoides (carotenos y xantofilas) de coloración amarilla y roja.
- Ficobilinas de coloración azul y roja presentes en las algas verdeazuladas, que comprenden el filo de los Cianofitos. [2]

La Clorofila, es el pigmento que da el color verde a los vegetales y que se encarga de absorber la luz necesaria para realizar la fotosíntesis, proceso que posibilita la síntesis de sustancias orgánicas a partir de las inorgánicas (CO₂, H₂O y sales minerales), mediante la transformación de la energía luminosa en energía química. La clorofila absorbe sobre todo la luz roja, violeta y azul, y refleja la verde. Generalmente la abundancia de clorofila en las hojas y su presencia ocasional en otros tejidos vegetales, como los tallos, tiñen de verde estas partes de las plantas.

En ocasiones, la presencia de clorofila no es tan patente al descomponerse y ocupar su lugar otros pigmentos de origen isoprénico también presentes en los plastos como son los carotenos (alfa, beta y gamma) y las Xantofilas.

Las algas verdeazuladas contienen la misma clase de clorofila que las plantas superiores, pero la ausencia de cloroplastos hace que se distribuya por toda la célula.

Con frecuencia otros pigmentos como la ficobilina (presente también en los rodófitos) enmascaran la clorofila y confieren a estas a las células, un color azulado o rojizo. Su función es captar la luz y transferirla a la clorofila.

Las clorofilas presentan una estructura molecular de gran tamaño de tipo porfirínico, estando formada en su mayor parte por carbono e hidrógeno; constituyendo un anillo tetrapirrólico ocupado en el centro por un único átomo de magnesio, rodeado por un grupo de átomos que contienen nitrógeno. Del anillo parte una larga cadena de 20 átomos de carbono, denominada fitol que constituye el punto de anclaje de la molécula de clorofila a la membrana interna del cloroplasto, el orgánulo celular donde tiene lugar la fotosíntesis.

Cuando la molécula de clorofila absorbe un fotón, sus electrones se excitan elevándose a un nivel de energía superior. Esto es el punto de partida en el cloroplasto de una secuencia compleja de reacciones químicas que dan lugar al almacenamiento de energía en forma de enlaces químicos.

Los diversos tipos de clorofilas existentes, se diferencian en pequeños detalles de su estructura molecular y que absorben longitudes de onda luminosas algo distintas. [3]

Por cromatografía se pueden separar cuatro clorofilas distintas:

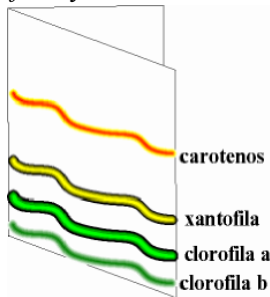
- La clorofila A constituye de manera aproximada el 75% de toda la clorofila de las plantas verdes, estando presente también en las algas verdeazuladas y en células fotosintéticas más complejas.
- La clorofila B es un pigmento accesorio presente en vegetales y otras células fotosintéticas complejas; absorbe luz de una longitud de onda diferente y transfiere la energía a la clorofila A, que se encarga de transformarla en energía química.
- Las clorofilas C y la D son propias de algas y bacterias.

Las clorofilas actúan como catalizadores, es decir, como sustancias que aceleran o facilitan las reacciones químicas, pero que no se agotan en las mismas. Entre los carotenoides hay también muchos catalizadores e intervienen como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, transfieren a la clorofila la energía de la luz que absorben para su conversión en energía química.[4]

PIGMENTOS VEGETALES

Los colores que presentan los vegetales son debidos a unos compuestos químicos llamados pigmentos. El color que presenta un determinado órgano vegetal depende generalmente del predominio de uno u otro pigmento o la combinación de ellos. Además, algunos de los pigmentos que condicionan el color están estrechamente ligados a las actividades fisiológicas del propio vegetal.

El color verde en los vegetales es debido a la presencia de dos pigmentos estrechamente emparentados llamados *clorofila a* y *clorofila b*. Se encuentran prácticamente en todas las plantas con semilla, helechos, musgos y algas. También aunque aparentemente falten en algunas hojas de color rojo o amarillo, cuando se extraen las otras sustancias colorantes de estas, puede comprobarse incluso allí la presencia de las clorofilas, que estaban enmascaradas por los demás pigmentos. Asociados con las clorofilas, existen también en los cloroplastos dos clases de pigmentos amarillos y amarillo-anaranjados que son los *xantofilas* y *carotenos*.



[5]

PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Entre todos los caracteres más externos de los vegetales, el más notable y característico es probablemente el color. El color no es únicamente un carácter llamativo de la vegetación, sino que, además, algunos de los pigmentos que lo condicionan están estrechamente ligados a las actividades fisiológicas del propio vegetal. Por consiguiente, el estudio de cómo las plantas viven y se desarrollan requieren el previo conocimiento de los pigmentos vegetales.

¿Qué son los pigmentos?

Si es posible encontrar en el reino vegetal todos los matices y combinaciones de colores del espectro, existe un predominio general de los colores primarios: verde, amarillo, rojo, azul. Estos colores son conferidos a los vegetales por determinados *compuestos químicos* definidos, llamados *pigmentos*. El color particular que presenta un determinado órgano vegetal depende generalmente del predominio de uno u otro o la combinación de ellos. Se debe tener claro que cuando

un vegetal presenta un color blanco, es debido a la falta de tales pigmentos. La luz solar que incide sobre ellas no es absorbida selectivamente como ocurre en las partes coloreadas, sino que es transmitida o reflejada prácticamente sin sufrir modificación.

Las Clorofilas. El color verde tan uniformemente presente en los vegetales es debido a la presencia de dos pigmentos estrechamente emparentados llamados *clorofila a* y *clorofila b*. Se encuentran prácticamente en todas las plantas con semilla, helechos, musgos y algas. Pueden formarse en las raíces, tallos, hojas y frutos a condición de que estos órganos estén situados por encima del suelo y queden expuestos a la luz. También aunque aparentemente falten en algunas hojas de color rojo o amarillo, cuando se extraen las otras sustancias colorantes de estas, puede comprobarse incluso allí la presencia de las clorofilas, que estaban enmascaradas por los demás pigmentos.

¿Dónde están los pigmentos?

Estos pigmentos se encuentran en el interior de la células vegetales específicamente en una organela llamada *cloroplasto*. Los cloroplastos son simplemente plástidos que contienen pigmentos clorofilicos. Los compuestos clorofilicos están ligados químicamente con las estructuras internas del cloroplasto (membrana tilacoides) y se hallan retenidos en estado coloidal. Asociados con las clorofilas, existen también en los cloroplastos dos clases de pigmentos amarillos y amarillo-anaranjados que son los *xantofilas* y *carotenoides*. [6]

¿Cómo se dividen los solventes?

Los pigmentos clorofilicos son *insolubles* en el solvente universal llamado agua. Pero sí son solubles (afinidad química) en *solventes orgánicos* como por ejemplo alcohol etílico y acetona. A los solventes que extraen simultáneamente todos los pigmentos de la hoja se los suele llamar *extractantes*. Existen otros solventes que presentan afinidad por algunos pigmentos y se los llama *separadores*, como por ejemplo el tetracloruro de carbono y el éter de petróleo.

En el método de extracción simple, como se desarrolla más adelante se utilizará como extractante el alcohol etílico y como separador el tetracloruro de carbono. Estos dos solventes orgánicos responden en forma diferente a los pigmentos clorofilicos, como así también a sus diferencias físicas que hacen que sean dos líquidos no misibles y con diferente peso específico.

En el segundo método por cromatografía se utilizará como extractante la acetona y como separador el éter de petróleo. Este método se trata de una separación más fina de los pigmentos, y se basa en la absorción y solubilidad diferenciales de varias sustancias entre las que se incluyen los pigmentos. Un soporte inerte como papel de filtro para la corrida y unos granos de carbonato de calcio para deshidratar la muestra, son los componentes necesarios para desarrollar la técnica. [7]

FOTOSÍNTESIS

El proceso biológico más importante de la Tierra es la fotosíntesis de las plantas verdes. A partir de ésta se produce prácticamente toda la materia orgánica de nuestro planeta y se garantiza toda la alimentación de los seres vivos.

De este proceso químico y biológico dependen tres aspectos de suma importancia:

- Por la fotosíntesis las plantas verdes producen alimentos y materia orgánica para sí mismas y para alimentar a los animales herbívoros, y éstos, a su vez, a los animales carnívoros.
- Se vuelve a utilizar el dióxido de carbono (CO_2), producido por los animales y por los procesos de putrefacción o descomposición. De otra manera el CO_2 saturaría el planeta.
- Se restituye el oxígeno al aire y se hace posible la respiración.[8]

Las plantas verdes poseen en su estructura celular orgánulos especiales denominados **cloroplastos**, que tienen la cualidad de llevar a cabo reacciones químicas conocidas como **fotosíntesis**, o sea, de realizar síntesis con ayuda de la luz solar.

La fotosíntesis consiste en los siguientes procesos:

- El dióxido de carbono (CO_2) es absorbido por los estomas de las hojas, y junto con el agua (H_2O), que es absorbida por las raíces, llegan a los cloroplastos, donde con ayuda de la energía de la luz se produce la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).
- Durante esta reacción se produce oxígeno (O_2), que es emitido al aire o al agua y es utilizado para la respiración de otros seres vivos. la fórmula sencilla de la reacción química es la siguiente:

$$6 \text{CO}_2 + 12 \text{H}_2\text{O} + \text{energía de la luz} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$$

Esto significa que se usan 6 moléculas de dióxido de carbono (CO_2) más 12 moléculas de agua (H_2O) más energía de la luz para producir una molécula de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) más 6 de oxígeno (O_2) y quedan 6 moléculas de agua (H_2O).

- A partir de la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) un azúcar muy común en las frutas, se producen la sacarosa, el

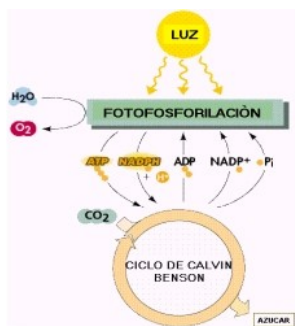
almidón, la celulosa, la lignina o madera y otros compuestos, que son la base de los alimentos para las plantas mismas y para los herbívoros.

Mediante el proceso de la fotosíntesis la energía solar es acumulada en forma de compuestos químicos, que al ser consumidos por los seres vivos liberan esa energía y sirven para mantener los procesos vitales en las células (calor, movimiento, etc.).[9]

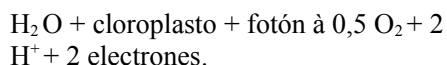
De la fotosíntesis depende la alimentación de todos los seres vivos sobre la Tierra, incluido el hombre, en forma directa (herbívoros) o indirecta (carnívoros, carroñeros, detritívoros, etc.). Sin plantas verdes no sería posible la existencia ni de los animales ni de los seres humanos. Es más, las fuentes de energía orgánica (carbón, petróleo, gas natural y leña) no son otra cosa que energía solar acumulada y liberada en los procesos de combustión, mediante la cual se mueve en gran parte la sociedad moderna (vehículos, cocinas, fábricas, etc.).

Es por esto que el proceso final de combustión de estas fuentes de energía orgánica produce agua y dióxido de carbono. Cuando la combustión es imperfecta o los combustibles orgánicos contienen impurezas la combustión, como la de los motores, produce elementos contaminantes, que pueden afectar al ambiente y a la salud de las personas.[10]

La fotosíntesis es un proceso que ocurre en dos fases. La primera fase es un proceso que depende de la luz (reacciones luminosas), requiere la energía directa de la luz que genera los transportadores que son utilizados en la segunda fase. La fase independiente de la luz (reacciones de oscuridad), se realiza cuando los productos de las reacciones de luz son utilizados para formar enlaces covalentes carbono-carbono (C-C), de los carbohidratos. Las reacciones oscuras pueden realizarse en la oscuridad, con la condición de que la fuente de energía (ATP) y el poder reductor (NADPH) formados en la luz se encuentren presentes. Investigaciones recientes sugieren que varias enzimas del ciclo de Calvin, son activadas por la luz mediante la formación de grupos -SH; de tal forma que el término reacción de oscuridad no es del todo correcto. Las reacciones de oscuridad se efectúan en el estroma; mientras que las de luz ocurren en los tilacoides. [14]



En los procesos que dependen de la luz (reacciones de luz), cuando un fotón es capturado por un pigmento fotosintético, se produce la excitación de un electrón, el cual es elevado desde su estado basal respecto al núcleo a niveles de energía superior, pasando a un estado excitado. Después de una serie de reacciones de oxido-reducción, la energía del electrón se convierte en ATP y NADPH. En el proceso ocurre la fotólisis del agua, la que se descompone según la ecuación:



En la reducción de un mol de CO₂ se utilizan 3ATP y 2 NADPH, que a través de una serie de reacciones enzimáticas producen los enlaces C-C de los carbohidratos, en un proceso que se efectúa en la oscuridad. En las reacciones de oscuridad, el CO₂ de la atmósfera (o del agua en organismos fotosintéticos acuáticos/marinos) se captura y reduce por la adición de hidrógeno (H⁺) para la formación de carbohidratos [(CH₂O)]. La incorporación del dióxido de carbono en compuestos orgánicos, se conoce como fijación o asimilación del carbono. La energía usada en el proceso proviene de la primera fase de la fotosíntesis. Los seres vivos no pueden utilizar directamente la energía luminosa, sin embargo a través de una serie de reacciones fotoquímicas, la pueden almacenar en la energía de los enlaces C-C de carbohidratos, que se libera luego mediante los procesos respiratorios u otros procesos metabólicos.

En la fotosíntesis cooperan dos grupos separados de pigmentos o fotosistemas, que se encuentran localizados en los tilacoides. Muchos organismos procariotes solamente tienen el fotosistema I (es el más primitivo desde el punto de vista evolutivo).

Los organismos eucariotes poseen los fotosistemas I y II. El fotosistema I está asociado a las formas de clorofila a, que absorbe a longitudes de onda de 700 nm (P700), mientras que el fotosistema II tiene un centro de reacción que absorbe a una longitud de onda

de 680 nm (P680). Cada uno de estos fotosistemas se encuentra asociado a polipeptidos en la membrana tilacoidal y absorben energía luminosa independientemente. En el fotosistema II, se produce la fotólisis del agua y la liberación de oxígeno; sin embargo ambos fotosistemas operan en serie, transportando electrones, a través de una cadena transportadora de electrones. En el fotosistema I se transfieren dos electrones a la molécula de NADP⁺ y se forma NADPH, en el lado de la membrana tilacoidal que mira hacia el estroma.[11]

CLOROFILAS

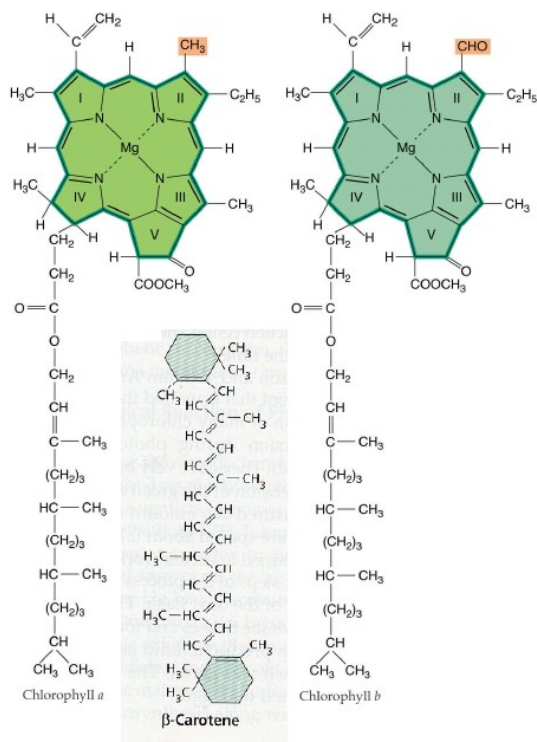
En las plantas superiores, la fotosíntesis es posible debido a la presencia en el cloroplasto, concretamente en las membranas tilacoidales, de una serie de pigmentos que tienen capacidad para captar la luz. Existen dos tipos básicos de pigmentos fotosintéticos:

Clorofilas. Compuestas por una porfirina que lleva incorporado un átomo de magnesio en el centro del núcleo tetrapirrólico . El ión Mg²⁺ está coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno centrales, lo que hace de la clorofila un complejo extraordinariamente estable. La "cabeza" que acabamos de describir, está unida a una "cola", el fitol, que es un alcohol de 20 átomos de carbono. Cabeza y cola se unen a través de un enlace éster en el que intervienen el grupo alcohólico del fitol y el grupo carboxilo de un ácido propiónico que está unido al anillo IV del núcleo tetrapirrólico. Existen varios tipos de clorofilas, las más importantes de las cuales son la "a", y la "b". La clorofila a tiene un grupo -CH₃ en el anillo II mientras que la clorofila b tiene un grupo -CHO en esa misma posición.

Carotenoides. Actúan como pigmentos accesorios en el proceso de la fotosíntesis. Existen dos tipos de pigmentos carotenoides: carotenos y xantofilas.

Los *carotenos* son hidrocarburos isoprenoides que no contienen oxígeno y están formados por largas moléculas con un sistema de enlaces conjugados alternantes, dobles y sencillos, rematados en cada extremo por un anillo de ciclohexano insaturado-tienen color amarillo-anaranjado.

Las *xantofilas* tienen una estructura muy similar a la de los carotenos y su diferencia estriba en la incorporación de oxígeno en los extremos de la molécula. Según el grupo que se incorpore existen variedades dentro de las xantofilas. Son de color amarillo.[12]



[13]

Como se señalo anteriormente la energía lumínica pueda ser utilizada por los sistemas vivos, primero debe ser absorbida y quienes realizan esta función son los pigmentos fotosintéticos. Los pigmentos son sustancias que absorben luz; algunos absorben luz de todas las longitudes de onda y, por lo tanto, parecen negros. Otros, solamente absorben ciertas longitudes de onda, transmitiendo o reflejando las longitudes de onda que no absorben. La clorofila, el pigmento que hace que las hojas se vean verdes, absorbe luz en las longitudes de onda del violeta y del azul y también en el rojo. Dado que refleja la luz verde, parece verde.

Cuando un pigmento absorbe un fotón o cuanto de luz, un electrón de la molécula de pigmento es lanzado a un nivel energético más alto; se dice entonces que está excitado. Este estado de excitación puede mantenerse sólo por períodos muy cortos de tiempo, de aproximadamente una millonésima de segundo o aun menos; la energía de excitación, puede disiparse como calor; también, puede reemitirse inmediatamente como energía lumínica de mayor longitud de onda, o puede provocar una reacción química, como sucede en la fotosíntesis, lo cual depende no sólo de la estructura del pigmento dado, sino también de su relación con las moléculas vecinas.[14]

Las Clorofilas son compuestos del tipo tetrapirrol, al mismo grupo pertenecen las ficocianinas y las ficoeritrinas (pigmentos accesorios en algas azules y rojas). Constan de cuatro anillos de [pirrol](#) unidos por

medio de puentes de metilo ($--CH=$) lo que constituye una porfirina. El tetrapirrol es el cuerpo básico de las porfirinas, dentro de las cuales se incluyen además de las clorofilas, las hemoglobinas y los citocromos. La característica cromófora de la clorofila se debe justamente al sistema de dobles enlaces conjugados generados por la unión de los anillos de pirrol mediante los grupos metino. En el centro del sistema de anillos (representado como un punto negro en la gráfica) se halla un átomo metálico, para las clorofilas es el magnesio. El anillo de pirrol III tiene una estructura isocíclica adicional, el anillo de la ciclopentanona. El anillo IV esta esterificado con un alcohol, el fitol, que representa una cadena de 20 átomos de carbono con un doble enlace, esta "cola" de fitol le da a la clorofila pura una naturaleza cerosa que explica la insolubilidad del pigmento en agua y su buena solubilidad en solventes orgánicos. Al respecto, la clorofila presenta un comportamiento doble, ya que la cola de fitol es insoluble en agua, hidrófoba y el núcleo de la porfirina tiene un carácter hidrófilo, es decir es afín al agua.

Clorofila a y b

En las plantas, la clorofila a es el pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química, las células fotosintéticas casi siempre contienen un segundo tipo de clorofila, la clorofila b y otro grupo de pigmentos llamados carotenoides. Uno de los carotenoides que se encuentran en las plantas es el β -caroteno; los carotenoides son pigmentos rojos, anaranjados o amarillos, que en las hojas verdes están enmascarados por las clorofilas, que son más abundantes; sin embargo en algunos tejidos, como los del tomate maduro, predominan los colores reflejados por los carotenoides.

Las otras clorofilas y los carotenoides pueden absorber luz de longitudes de onda diferentes de las que absorbe la clorofila a. Estos pigmentos actúan como pantallas que transfieren la energía a la clorofila a, extendiendo así la gama de luz disponible para la fotosíntesis.

La clorofila puede convertir energía lumínica en energía química solamente cuando está asociada con ciertas proteínas e incluida en una membrana especializada, y sin embargo, sólo una fracción muy pequeña de la luz dentro del espectro visible que incide en las hojas de las plantas es finalmente transformada en energía química.

Otras Clorofilas

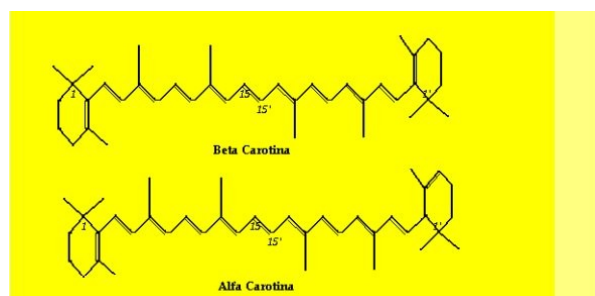
También existe una clorofila c, la cual se puede hallar en algas pardas pero es una clorofilina a la cual le falta

la cola de fitol y los átomos de hidrogeno en las posiciones 7 y 8 en el anillo IV.

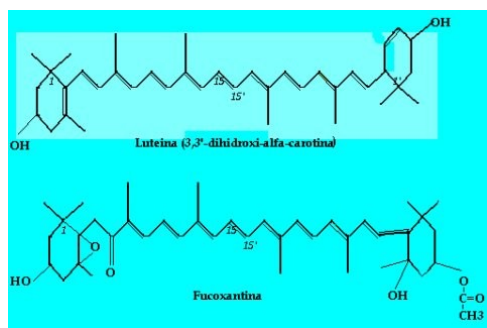
La clorofila d ha sido encontrada en las algas rojas mientras que la bacterioclorofila es el pigmento típico de los bacterios fototrópicos.

Carotenoides

En estos colorantes amarillos y rojos, el sistema de dobles enlaces conjugados esta formado exclusivamente por átomos de carbono, en general consisten de una cadena larga de hidrocarburo, por esto son compuestos insolubles en agua, pero sí en solventes grasos. Se dividen en Carotenos que son hidrocarburos insaturados y en Xantofilas que son derivados oxigenados de los anteriores.



El cuerpo básico de los carotenos esta conformado por 40 átomos de carbono, consiste en 8 unidades de una agrupación llamada isopreno. Estas unidades están configuradas generando una estructura central en forma de cadena con 14 átomos de carbono y 7 enlaces dobles conjugados además de 4 grupos metilo en forma de cadenas laterales, la cadena central lleva en uno o en los dos extremos un agrupamiento en forma de anillo.



Los carotenoides que participan en la fotosíntesis se designan como carotenoides primarios, diferentes de los secundarios que aparecen en flores y frutos como componentes de los cromoplastos y en organismos heterótrofos como bacterias, levaduras y hongos, también se pueden originar en organismos fotosintéticamente activos como consecuencia de una nutrición mineral deficiente.

Ficocianinas y ficoeritrinas

Estos pigmentos de color azul-verdoso y rojo-morado están limitados a las cianofíceas (algas verde-azules) y

rodofíceas (algas rojas), al lado de la clorofila a y algunos carotenoides. Son compuestos emparentados con las clorofilas por ser compuestos del tipo tetrapirrol, difieren de estas en sus propiedades físicas y químicas.

Consisten de un grupo protéico de elevado peso molecular y de un grupo responsable de la coloración, un grupo cromóforo, que se denomina por su similitud a los pigmentos biliares ficocianobilina y ficoeritrobilina.

El cuerpo básico consiste en cuatro anillos de pirrol unidos entre si por puentes de metino, pero en este caso no forman un anillo cerrado, por lo tanto no hay un átomo metálico en posición central.

El cuerpo básico consiste en cuatro anillos de pirrol unidos entre si por puentes de metino, pero en este caso no forman un anillo cerrado, por lo tanto no hay un átomo metálico en posición central. Los anillos de pirrol llevan en los carbonos 1 y 8 una función de oxígeno, en 4 y 5 un resto propionico a través de sus grupos carboxilos estén unidos el grupo cromóforo a la proteína por medio de enlaces peptídico. [15]

CROMATOGRAFÍA

Las técnicas cromatográficas para el análisis y purificación de los productos de reacción son ampliamente utilizadas en el laboratorio orgánico.

La técnica cromatográfica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos mediante la exposición de dicha mezcla a un sistema bifásico equilibrado.

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Las combinaciones de estos componentes dan lugar a los distintos tipos de técnicas cromatográficas que aparecen en la siguiente tabla:

Fase móvil	Fase estacionaria	Técnica cromatográfica
vapor	sólida	cromatografía de gases
vapor	líquida	cromatografía de gases (CGL)
líquida	sólida	cromatografía de adsorción (CLS)
líquida	líquida	cromatografía líquido-líquido (CLL)

Cromatografía de adsorción.

Dentro de esta técnica pueden diferenciarse dos tipos de cromatografías de adsorción denominadas cromatografía de columna y de capa fina (abreviada TLC, del inglés Thin Layer Chromatography).

Para la técnica de cromatografía de adsorción en columna se emplean columnas verticales de vidrio cerrada en su parte inferior con una llave que permita la regulación del flujo de la fase móvil. Las columnas se rellenan con un adsorbente, como alúmina o gel de sílice (fase estacionaria), mojado con el disolvente que se vaya a emplear en el proceso cromatográfico. En la parte superior de la columna se pone la disolución de la mezcla a separar y a continuación un depósito que contenga el eluyente (fase móvil) que se va a utilizar en la separación. Se abre la llave inferior de manera que el eluyente comience a bajar por la columna. En este proceso, los componentes de la mezcla son adsorbidos por la fase estacionaria con diferente intensidad, de manera que el proceso de adsorción-desorción hace que unos componentes avancen más rápidamente que otros. El líquido que sale por la parte inferior de la columna se recoge de manera fraccionada. Si los componentes de la mezcla avanzan a muy diferente velocidad se podrán obtener fracciones cromatográficas constituidas por un solo componente.[16]

En toda cromatografía hablaremos de los siguientes términos :

- *matriz de la columna.* Sustancia que está empapada de solvente y que se empaqueta en la columna. También se denomina el lecho de la columna.
- *longitud de la columna.* Longitud del dispositivo en el que se empaqueta la columna. Es importante en algunos tipos de cromatografía como la de filtración en gel y poco importante en otras como la cromatografía de afinidad.
- *volumen de la columna.* Volumen total de gel que se empaqueta en una columna cromatográfica.
- *volumen muerto de la columna.* Cantidad de solvente que tiene que atravesar la columna para asegurar que se ha reemplazado completamente. Coincide con el volumen de solvente que sale de la columna desde que se aplica la muestra hasta que empieza a salir la primera proteína. En general, y dependiendo del tipo de cromatografía puede ser de 1 a varias veces el volumen de la columna.
- *'Run Throught'.* Es, en columnas de intercambio iónico o de afinidad, el volumen de solvente más proteínas que atraviesa la columna sin quedar retenido en ella. Correspondería en el caso de la

cromatografía de afinidad al volumen de solvente que contiene las proteínas no afines al ligando.[17]

En la cromatografía de columna las moléculas de una mezcla son separadas en base a la afinidad de las moléculas por la fase estacionaria o por la fase móvil. Si una molécula A tiene más afinidad por la fase estacionaria que la B, B bajará más rápido que A. Existen muchos tipos de cromatografía de columna. En el laboratorio se usan tres tipos de ellas.

A. Filtración en gel: En esta las moléculas son separadas por su tamaño. El gel consiste de una cama de esferas con poros de un tamaño dado. El gel se conoce como sefadex, el cual viene con poros de distintos tamaños. Las moléculas de igual o menor tamaño que el poro entran a las esferas mientras que las moléculas más grandes pasan rápidamente por la columna. Las moléculas de tamaño intermedio pueden entrar las esferas pero pasan menos tiempo en ellas. Las moléculas salen en orden de tamaño por el eluido. Aunque para efectos de este laboratorio las muestras que usaremos están coloreadas, al hacer esta cromatografía en la vida real hay que usar otras pruebas para determinar qué fracciones contienen las muestras de interés, las cuales suelen ser proteínas. El material que se escoja para la fase estacionaria dependerá del tipo de muestra que estemos corriendo. Cada tipo de gel presenta poros de distinto tamaño.

B. Intercambio iónico: Se usa para purificar proteínas. Separa moléculas en base a su carga iónica. La fase estacionaria presenta una matriz con carga. Al eluir una muestra, las moléculas de igual carga salen con el amortiguador. Las moléculas de carga opuesta se adhieren al material de empaque con distintos grados de afinidad. Para desprender las proteínas adheridas se usa una solución alta en cloruro de potasio o de sodio. Esto puede hacerse usando soluciones con incrementos moderados de salinidad, o de un solo paso, echando la solución de mayor concentración de sal primero. Al subir la concentración poco a poco podemos recolectar las muestras desde las que menos afinidad por la columna tiene hasta las de mayor afinidad. Durante la elución, la sal va compitiendo con la proteína por las cargas de la matriz de la columna, hasta que la desprende.

La columna puede ser de matriz negativa (intercambio catiónico) o positiva (intercambio aniónico). El tipo de empaque dependerá de qué queremos aislar. En este tipo de columna el pH es importante porque puede alterar la carga de la columna.

C. Fase inversa: Esta es una cromatografía de interacción en la que la fase estacionaria, con

moléculas hidrofóbicas, interactúa con moléculas hidrofóbicas en la muestra. La matriz consiste de fibras de silicato con cadenas de hidrocarburos. Estas atraerán a las moléculas hidrofóbicas de la muestra mientras que las hidrofílicas salen con el amortiguador. Las moléculas son eluidas de la columna lavando con soluciones de distinta concentración de alcohol o cualquier otro solvente no polar.[18]

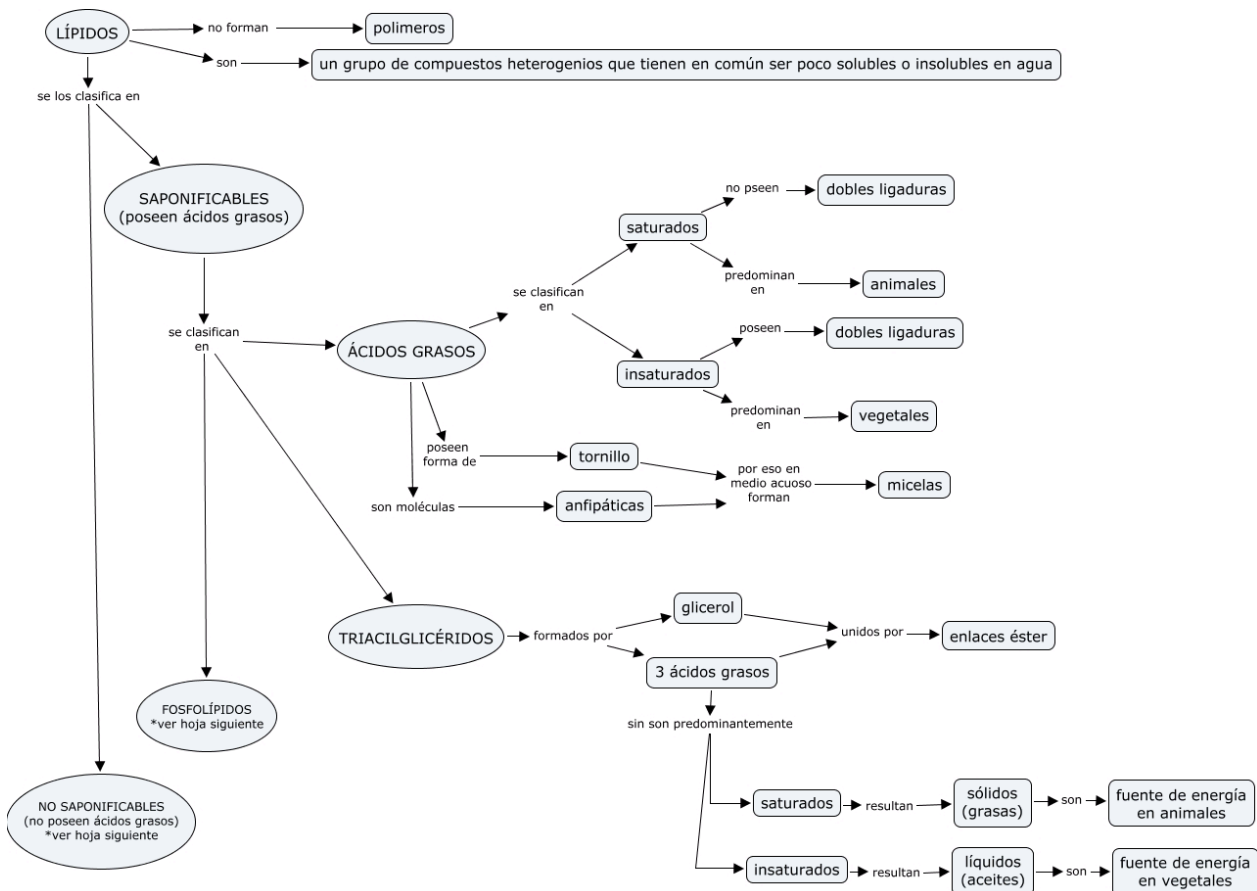
Se utilizan columnas de vidrio rellenas de Alúmina (Al_2O_3), Sílica u Oxido de Magnesio. La fase estacionaria esta constituida por un sólido poroso, el cual queda soportado en el interior de una columna generalmente fabricada en plástico o vidrio. La fase móvil se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La solución que sale al final de la columna se reemplaza constantemente por nueva solución que se suministra desde un contenedor por la parte superior de la columna.

La migración de las sustancias de la mezcla a través de la columna se encuentra retardada en diferente grado

por las interacciones diferenciales que cada una de ellas pueda ejercer con la fase estacionaria. Las sustancias se separan gradualmente formando bandas dentro de la banda total, la separación, y por tanto la resolución, aumenta con la longitud de la columna. La banda individual de cada sustancia puede ensancharse con el tiempo debido a procesos difusionales, disminuyendo por tanto la resolución.[19]

LÍPIDOS SAPONIFICABLES

Una forma de clasificar los lípidos es la que se basa en su comportamiento frente a la reacción de hidrólisis en medio alcalino (SAPONIFICACIÓN). Los lípidos saponificables son los que se hidrolizan en medio alcalino y por lo tanto tienen ácidos grasos en su estructura (ceras, TAG, FG, y EFL), y los no saponificables son los que no experimentan esta reacción (Terpenos, esteroides, prostaglandinas, en este grupo también estarían incluidos los ácidos grasos).[20]



[21]

OBJETIVOS:

- General: Extraer y separar diferentes pigmentos vegetales
- Específicos:
 - ✓ Escoger el material adecuado para extraer clorofilas
 - ✓ Aplicar experimentalmente la extracción por solventes
 - ✓ Empacar y desarrollar una columna de fraccionamiento
 - ✓ Indicar los diferentes pigmentos fotosintéticos en la columna de acuerdo a su polaridad

HIPÓTESIS

Si realizamos una extracción de las clorofilas de la espinaca que es una planta verde, con disolventes orgánicos como el éter de petróleo en el cuál las clorofilas son solubles y además realizamos una cromatografía de adsorción por columna, utilizando disolventes apropiados como N-propanol en éter de petróleo los cuáles presentan afinidad por estos pigmentos, entonces podremos separar y obtener las distintas clorofilas que componen los pigmentos fotosintéticos de las espinacas.

MATERIAL

- Tijeras
- 2 vasos de precipitado de 250 ml
- 1 vaso de precipitado de 150mL
- 1 probeta de 100ml
- 2 botes
- 1 embudo de separación
- 1 matraz de fondo redondo
- 1 pipeta de 1ml, 5ml y 10ml
- 1 pipeta pasteur
- Papel filtro
- 1 mechero
- 1 tripie con tela de asbesto
- 1 columna cromatografica (2X20cm)
- 1 lana de vidrio
- 1 embudo de filtración
- 1 hielo

MATERIAL BIOLÓGICO

- Hojas de espinaca frescas 2g

REACTIVOS

1. metanol 90%, éter di etílico 10%
2. metanol 70%, éter di etílico 30%
3. éter di etílico
4. éter de petróleo
5. NaCl solución acuosa saturada
6. KOH en metanol al 30%
7. NaCl al 10%
8. azúcar glass (como absorbente)
9. N-propanol en éter de petróleo al 0.5%

EQUIPO

- Parrilla eléctrica
- Balanza analítica

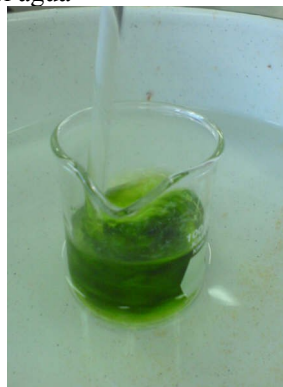
METODOLOGÍA:

A.- EXTRACCIÓN

- Tomar dos hojas verdes y tiernas de espinacas
1. Separar los pecíolos y venas grandes de las hojas y picarlas
 2. Colocarlas en un vaso de precipitado de 250ml con 50ml de agua hirviendo por dos minutos



3. Pasar el vaso a un baño helado y enfriar, descartar el agua



4. Extraer los pigmentos de las hojas con 50ml de una mezcla de metanol 90% y éter di etílico 10%. Calentar un poco en baño maria (5 min)
5. Repetir la extracción con 50ml de metanol al 70% y éter di etílico 30%. Calentar durante 5 min. (Las hojas quedan incoloras)
6. Cambiar los extractos obtenidos de los pasos 5 y 6 en un embudo de separación



7. Añadir 50ml de éter de petróleo



8. Añadir 50ml de solución acuosa saturada de NaCl y agitar



9. Dejar separar las capas



10. Descartar la capa inferior



11. Lavar la capa superior con dos porciones de 50ml de agua destilada



12. Verter la capa verde por la parte superior del embudo, a un matraz de base redonda
13. Evaporar a sequedad a menos de 40°C bajo vacío (ENCASO de detener aquí el experimento almacenar el extracto evaporado en la oscuridad).





B.- PREPARACIÓN DE LA COLUMNA:

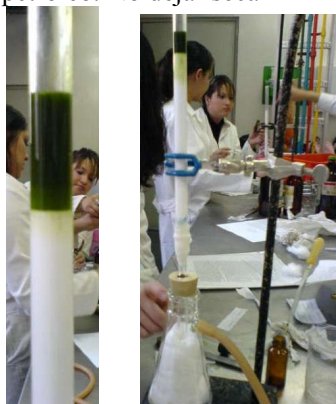
1. Colocar un tapón de lana de vidrio o algodón en el extremo de la columna
2. Empacar cuidadosamente el azúcar glass, añadiendo esta con un embudo, cuidando de no forzar el empaque. La columna debe quedar de 20cm aproximadamente.

C.- CORRIMIENTO DE LA MUESTRA:

1. La muestra se suspende con 0.5 ml de éter de petróleo
2. Usando la solución suave. Introducir cuidadosamente la solución de la muestra en la columna con una pipeta, y permitir que se forme una estrecha zona inicial



3. La muestra que se adhiere a la parte superior e inferior del tubo, se puede lavar con un poco de éter de petróleo. No dejar secar



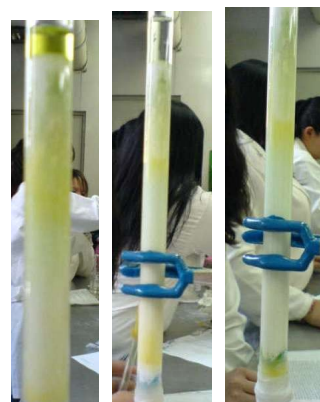
4. Desarrollar con N-propanol al 0.5% en éter de petróleo
5. Se puede acelerar el desarrollo aplicando una succión de 0.5 atm. Un flujo de 1 ml/ min, da buena separación.

RESULTADOS

El corrimiento de la muestra para la separación de los pigmentos de las clorofilas se desarrolló con N-propanol al 0.5% en éter de petróleo.

Poco a poco se iban separando los pigmentos y esto se observaba en la alúmina.

Se iban separando los pigmentos en sus distintas tonalidades: abajo amarillo, verde, verde azulado y arriba quedaba de nuevo el amarillo



Se obtuvieron los 4 tipos de clorofilas existentes en gran cantidad: 4 tubos de xantofilas, 2 tubos de clorofila α , 3 tubos de clorofila β y 1 tubo completo de carotenos.



Las primeras clorofilas formadas fueron de xantofilas:

- La primer capa formada fue de color amarillo transparente, después la siguiente capa fue de color amarillo verdoso, seguida de un verde militar y por último un color verde olivo.

Las segundas clorofilas extraídas fueron las clorofilas α

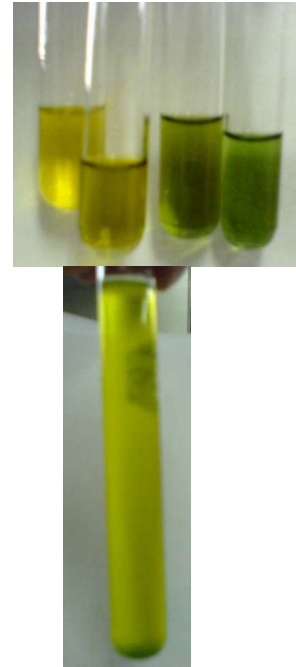
- El primer y segundo tubo se observaron de un color verde agua; esta fue la clorofila que se presentó en mayor cantidad y en la misma tonalidad.



Las terceras clorofilas extraídas fueron las clorofilas β de las que se obtuvieron 3 tubos: el primero verde claro, el segundo verde amarillento y el último verde amarilloso.



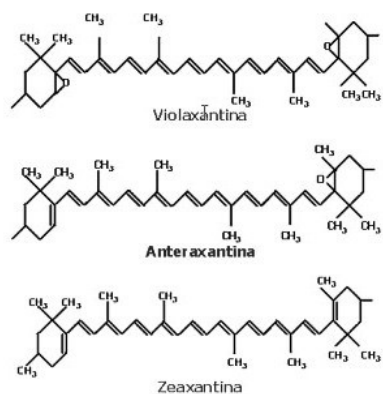
Por último se obtuvo un tubo completamente lleno de carotenos en color amarillo.



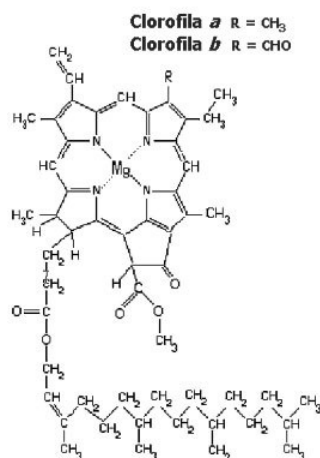
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- ✓ Se hirvieron las hojas de la espinaca en agua para quitar el almidón de las hojas; la extracción de las clorofilas se realizó con una mezcla de metanol y éter dietílico en baño maría hasta quedar las hojas de la planta incoloras, después se realizó una extracción líquido-líquido en un embudo de separación en solución saturada de NaCl (para evitar que se formaran emulsiones) y éter dietílico el cuál extrae pigmentos, clorofilas y betacarotenos, por lo cuál en este disolvente fue en el que se obtuvieron los pigmentos para la cromatografía posterior.
- ✓ Al realizar la cromatografía de adsorción en el que este medio fue la alúmina (fase estacionaria) y el eluyente la mezcla de N-propanol en éter dietílico, de manera que el eluyente comenzó a bajar por la columna y los componentes de la mezcla fueron adsorbidos por la fase estacionaria con diferente intensidad, de manera que el proceso de adsorción-desorción hizo que unos componentes avanzaran más rápidamente que otros.
- ✓ Aparecieron varias bandas de diferentes colores que estuvieron más o menos alejados de la disolución de N-propanol en éter de petróleo según la mayor o menor solubilidad de los pigmentos en dicha disolución. Estas bandas tenían diferente grosor, dependiendo de la abundancia del pigmento en la disolución. Las que tenían más afinidad por el disolvente bajaban más rápido que los otros pigmentos.

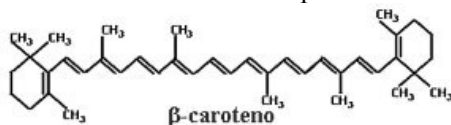
- ✓ Las primeras clorofilas que se extrajeron fueron las xantofilas, las cuáles son de color amarillo y olivo. Estas se obtuvieron en pequeña cantidad cada uno de sus coloraciones diferentes.



- ✓ Después se obtuvo la clorofila α , la cuál se obtuvo en mayor cantidad ya que esta es la que constituye aproximadamente el 75% de toda la clorofila en las plantas verdes y es de color verde azulado. Seguida por la clorofila beta que fue la que se obtuvo en segundo lugar en cantidad en color verde amarillento.



- ✓ Por ultimo se obtuvieron los carotenos que fueron de color amarillo más intenso que las xantofilas y estos se obtuvieron al final debido a que eran menos afines al disolvente empleado.



CONCLUSIONES

Se obtuvieron los pigmentos fotosintéticos de la clorofila, que son los que le dan color a las hojas de las plantas ya que la fotosíntesis es un proceso que permite a los vegetales obtener la materia y la energía que necesitan para desarrollar sus funciones vitales, se lleva

a cabo gracias a la presencia en las hojas y en los tallos jóvenes de pigmentos, capaces de captar la energía lumínica.

Gracias a esta práctica, se logró observar como cambian las tonalidades de estos pigmentos fotosintéticos que componen a las plantas y se encuentran en los cloroplastos de la célula vegetal y les dan color al reflejar o transmitir la luz visible, además de que son los que constituyen el sustrato fisicoquímico de la fotosíntesis.

REFERENCIAS

- [1] Blanco Prieto F. Manual del Laboratorio de Química. Gráficas Cervantes. Salamanca, 1983
- [2] García JL. Experiencias básicas en la enseñanza de las ciencias de la naturaleza II. Instituto de la educación. Universidad de Santander. Santander, 1980
- [3] Gutiérrez R. et al. Enseñanza de las ciencias en la educación intermedia. Ed. Rialp. Madrid, 1990
- [4] Villarreal F. et al. Experimentos de Química. Ed. Trillas. Mexico, 1981
- [5] <http://blafar.blogia.com/2007/040901-los-pigmentos-vegetales.php>
- [6] <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Trabprac/Tp6/Pigmentos.htm>
- [7] J. Azcón-Bieto, M. Talón (eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana, Edicions Universitat de Barcelona, 2000
- [8] B.B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. Biochemistry and Molecular Biology of plants. Rockville (USA): American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [9] D. T. Dennis and D.H. Turpin (eds). Plant metabolism. Plant physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. Orlando, USA: Academic Press, 1998.
- [10] H.W. Heldt. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford (U.K.): Oxford University Press, 2004.
- [11] Frank B. Salisbury, Cleon W. Ross. Fisiología Vegetal. México: Grupo Editorial Iberoamericana, 1994. (traducción de la 4ª edición original en inglés: Plant Physiology. Wadsworth, 1992).
- [12] L. Taiz, E. Zeiger. Plant Physiology. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates Inc., 2002.
- [13] Imágenes tomadas de Buchanan, Gruissem & Jones. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. Rockville, Maryland. USA. 2000
- [14] Mathews, C. K; Van Holde, K. E. Bioquímica 2ªED. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana, 1998. 657-665

- [15]http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/02_04.htm
- [16] http://es.geocities.com/qo_11_sepypur/
- [17]<http://www.ub.es/biociel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>
- [18] Ruben Dario Cortez. Técnicas de separación, cromatografía. [En línea] Sección de La Red Latinoamericana de Química. Barquisimeto Lara 301. Última versión 21 de enero de 1.998.
- [19] Valcarcel, M. 1988. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté. España. pp 335-336, 597-613.
- Lawrence, A., Kaplan, y Pesce, J. 1986. Química clínica: Técnicas de laboratorio, fisiopatología, métodos de análisis. Teoría, análisis y correlación. Editorial Medica Panamericana. Junin, Buenos Aires. 1739 p.
- [20] C.K. Mathews, K.E. van Holde, K.G. Arhen. Prentice Hall, Pearson. Bioquímica. (3º Ed.). Educacion, Madrid. (2002).
- [21]http://cmapspublic3.ihmc.us/servlet/SBReadResourceServlet?rid=1189907031953_65535060_462&partName=htmltext