

SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Presentación:

La energía que posibilita la vida de la mayoría de los seres vivos, procede directa o indirectamente del sol, a través del proceso fotosintético. En este proceso se distinguen dos etapas:

- **Etapa fotoquímica:** la energía luminosa es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, y transformada en energía química, bajo la forma de ATP y NADPH.

- **Etapa bioquímica ó termoquímica:** consiste en la fijación del CO₂ mediante el ciclo de Calvin. Este proceso requiere del NADPH y el ATP producido en la etapa anterior.

La energía radiante es absorbida por pigmentos que se encuentran embebidos en la membrana tilacoidal del cloroplasto (en el caso de células eucariotas), en la membrana plasmática (en el caso de bacterias fotosintéticas), o en láminas internas (cianobacterias). Se distinguen dos tipos de pigmentos fotosintéticos:

- a) Pigmento principal: se trata de la molécula de clorofila *a*; el único pigmento capaz de iniciar los procesos de óxido - reducción de la etapa fotoquímica.
- b) Pigmentos accesorios: son aquellos que absorben luz en regiones del espectro electromagnético, donde no absorbe la clorofila *a*. Es el caso de la clorofila *b*, los carotenoides y las ficobilinas.

Las clorofilas (Figura 1) son pigmentos verdes que constan de cuatro anillos pirrólicos que forman un macrociclo con diversos sustituyentes laterales. Los pirroles, a través de sus átomos de nitrógeno, forman en el centro del anillo un complejo con el catión Mg⁺² quedando una estructura casi plana. En el anillo IV se encuentra un residuo de ácido propanoico, esterificado con un alcohol de veinte átomos de carbono (fitol). La única diferencia en la estructura de las clorofilas *a* y *b*, es que la primera presenta en el anillo II un grupo metilo, y la segunda un formilo.

Los carotenoides son poliisoprenoides de 40 átomos de carbono. Pueden ser del tipo caroteno, en cuyo caso la molécula consta exclusivamente de carbono e hidrógeno, o del tipo xantofila que contiene oxígeno además de carbono e hidrógeno. Los principales carotenoides de cloroplastos de plantas superiores son: β-caroteno (Figura 2), luteína (Figura 3), violaxantina y neoxantina.

Las ficobilinas (por ejemplo la ficocianina y ficoeritrina) son tetrapirroles de cadena abierta. Están presentes en algas verdeazuladas y rojas, por lo que no las consideraremos en este práctico.

Diversas técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, en papel, en columna y recientemente HPLC) permiten separar los diferentes pigmentos.

La espectrofotometría por su parte, permite conocer las regiones del espectro electromagnético donde cada pigmento absorbe (espectro de absorción) constituyendo además una herramienta para su cuantificación.

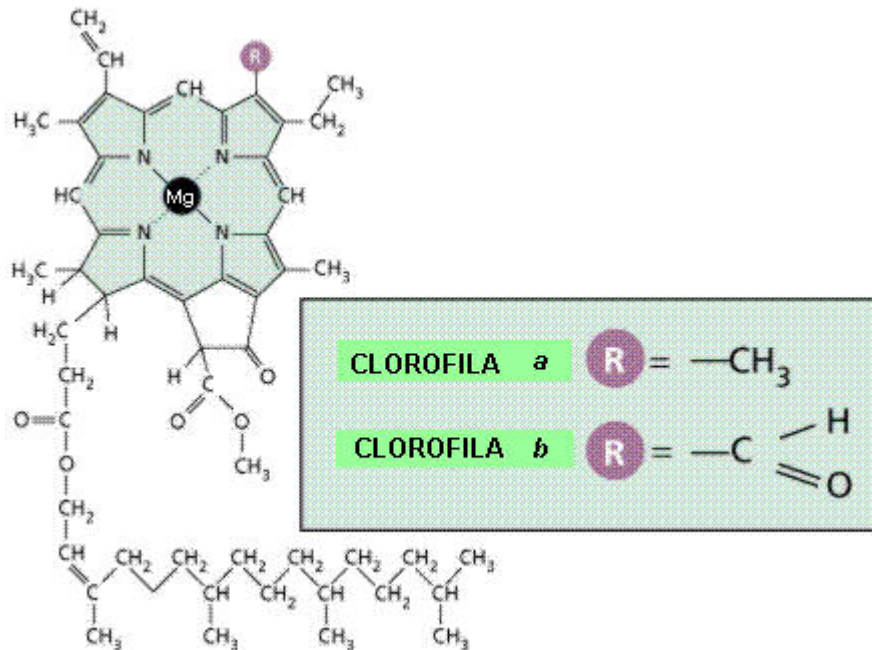


Figura 1: Estructura de las clorofilas *a* y *b*.

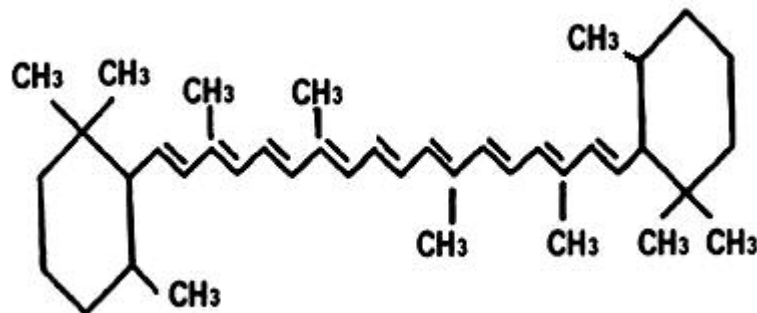


Figura 2: Estructura del β -caroteno.

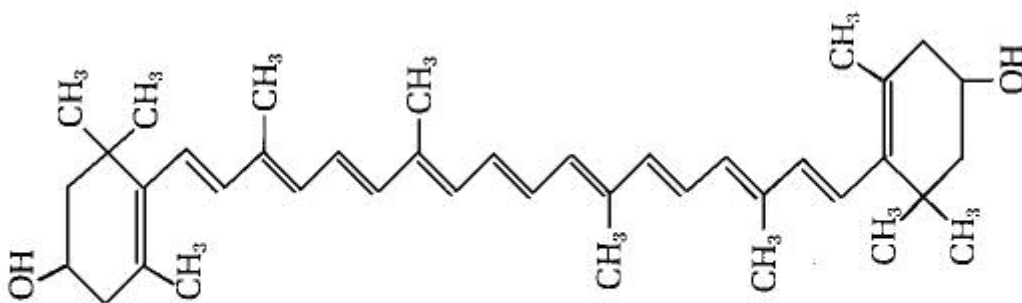


Figura 3: Estructura de la luteína (una xantofila).

Objetivos:

- Separar los pigmentos fotosintéticos por medio de cromatografía en papel.
- Realizar el espectro de absorción de dichos pigmentos.
- Cuantificar clorofilas en el material estudiado.

Aspectos teóricos necesarios:

Para una mejor comprensión de los aspectos químicos y biológicos abordados en este práctico, el alumno deberá realizar una revisión de los siguientes temas:

- Fundamentos de la cromatografía en papel.
- Características físicas de la luz, energía del fotón, espectros de absorción de pigmentos.
- Estructura de los pigmentos fotosintéticos, con énfasis en grupos polares y apolares dentro de las moléculas.
- Ubicación de los pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos: el complejo antena.

Actividades:

Cuantificación de clorofilas: coloque en un tubo de ensayo 0,05 g de hojas de álamo y 10 ml de etanol 80%. Marque el nivel del líquido, y colóquelo en baño de maría a una temperatura que permita la ebullición del alcohol. Hierva durante 10 minutos, y adicione etanol 80 % hasta completar el nivel original. Transfiera el extracto a un tubo limpio y lea absorbancias a 645 y 663 nm (A_{645} y A_{663} respectivamente) en espectrofotómetro, usando etanol 80 % como blanco. La concentración de pigmentos ($\mu\text{g ml}^{-1}$) puede calcularse mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b = 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}$$

Expresé la concentración de clorofilas como $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco.

Separación de pigmentos por cromatografía en papel coloque en un mortero 2 g de hojas álamo, sin nervaduras grandes, cortadas en trocitos. Adicione 7 ml de etanol 80% y homogenice el tejido. Filtre, y transfiera el extracto a un tubo de ensayo.

Prepare una cuba cromatográfica, agregando 2,5 ml de acetona, y 20 ml de éter de petróleo en un frasco, y tape herméticamente (Figura 4). En una tira de

papel cromatográfico Whatman nº 1 efectúe la siembra del extracto, con ayuda de una pipeta Pasteur. Seque cuidadosamente la siembra con un secador de cabello, y repita la operación unas doce veces. Suspenda la tira en el frasco, con ayuda de hilo, y deje el sistema en reposo hasta que el frente del solvente llegue al extremo del papel.

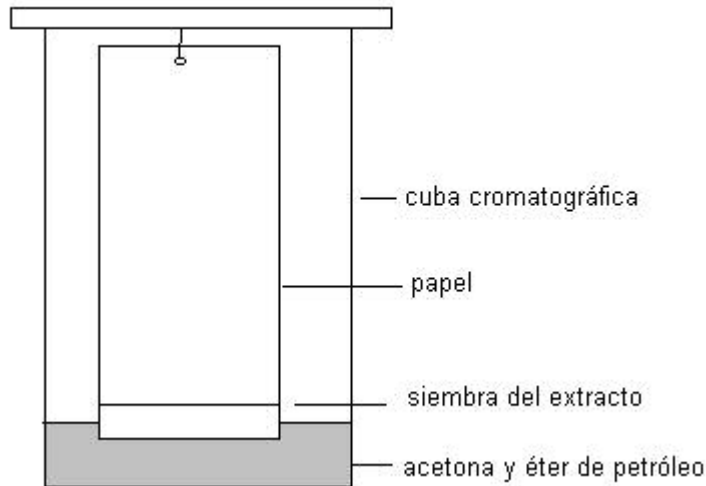


Figura 4: Esquema del sistema empleado en la cromatografía en papel

Corte las bandas y elúyalas separadamente, con 5 ml de etanol 80%. En cada una de las fracciones obtenidas, lea absorbancias entre 380 y 720 nm, con intervalos de 10 nm, usando etanol 80% como blanco.

Preparación del informe:

- 1) Calcule la concentración de clorofila *a* y *b* en el extracto bruto, y exprese en mg de pigmento . g⁻¹ de materia fresca.
- 2) Grafique el espectro de absorción de las diferentes fracciones separadas por cromatografía en papel.

Cuestionario:

1) En química analítica, para la cuantificación de carbohidratos, aminoácidos, proteínas, etc, mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas, se requiere del auxilio de una curva patrón. En el caso de las clorofilas *a* y *b*, esto no es necesario, puesto que se disponen de ecuaciones que permiten calcular su concentración. ¿Cómo se habrán generado estas ecuaciones?. Una pista: en textos de química analítica, consulte el tema: “Resolución de sistemas binarios mediante espectrofotometría”.

2) Observe la estructura de los pigmentos fotosintéticos. Todos ellos poseen una característica en común: la presencia de dobles enlaces conjugados. ¿Cuál será la importancia de los mismos en el proceso fotosintético?.

3) Observe detenidamente el espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos, y luego piense en una selva tropical, con diferentes estratos de vegetación. Las especies del estrato herbáceo, ¿recibirán luz de igual calidad (longitud de onda) que aquellas del estrato arbóreo?.

4) En este práctico hemos realizado un espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos. ¿Cómo procedería para realizar un espectro de acción de la fotosíntesis?.

Bibliografía recomendada:

Campbell, N. 2002. **Biology**, 6ta. Edición. Longman, Inc.
Curtis, H. 2000. **Biología**, 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana
Taiz, L y Zeiger, E. 1999. **Plant Physiology**. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc.

Recursos de INTERNET recomendados

En las siguiente direcciones tendrá acceso a un resumen del proceso fotosintético, con excelentes ilustraciones:

a) En inglés:

<http://gened.emc.maricopa.edu/bio181/BioBK/BioBookCELL2.html>

b) En portugués:

<http://www.ufv.br/internal.htm?lig=http://www.ufv.br/dbv/home.htm>