



CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOQUÍMICA II

LABORATORIO

PRACTICA 2

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS CLOROFILAS

ALUMNO:

GRUPO

BC05

25 – JUN – 2002

INTRODUCCION

La vida en la tierra depende fundamentalmente de la energía solar, la cual es atrapada mediante el proceso fotosintético, que es responsable de la producción de toda la materia orgánica que conocemos. La materia orgánica comprende los alimentos que consumimos diariamente tanto nosotros como los animales, los combustibles fósiles (petróleo, gas, gasolina, carbón); así como la leña, madera, pulpa para papel, inclusive la materia prima para la fabricación de fibras sintéticas, plásticos, poliéster, etc.

Utilizando técnicas cromatográficas se han identificado un grupo de sustancias en las plantas verdes llamadas clorofilas, siendo las representantes la a y b. La clorofila a esta integrada por un núcleo de Mg, 4N, C y H. Para que se pueda formar la clorofila es indispensable la presencia del Fe. Las formulas de la clorofila son:

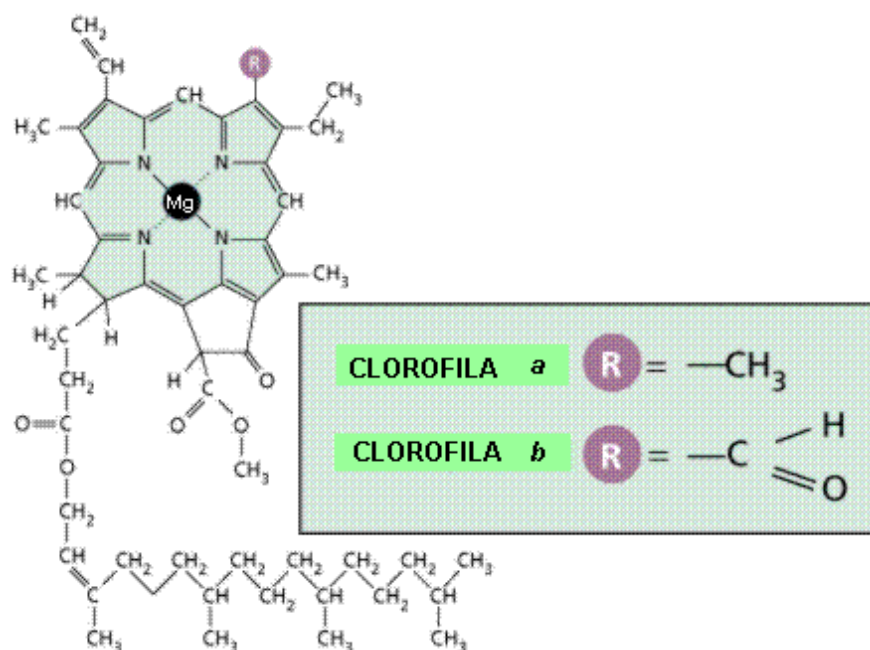
Clorofila a: $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$

Clorofila b: $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$

La clorofila tiene la capacidad de transformar la energía luminosa absorbida en energía química, canalizándola hacia reacciones celulares de biosíntesis.

El pigmento no entra en si en las reacciones químicas que se llevan a cabo, si no que ejerce solamente una acción catalítica que activa las reacciones sin intervenir en ellas. Esta acción catalítica es extraordinariamente rápida y trabaja en fracciones de segundo.

La clorofila, el pigmento verde común a todas las células fotosintéticas, absorbe todas las longitudes de onda del espectro visible, excepto las de la percepción global del verde, detectado por nuestros ojos.



Tal como se observa en la fórmula, la clorofila es una molécula compleja que posee un átomo de magnesio en el centro, mantenido por un anillo de porfirinas. Numerosas modificaciones de la clorofila se encuentran entre las plantas y otros organismos fotosintéticos (plantas, algunos protistas, proclorobacteria y cianobacterias).

Los pigmentos accesorios que incluyen a la clorofila b (también c, d, y e en algas y protistas) y los carotenoides, como el beta caroteno y las xantofilas (carotenoide de color amarillo), absorben la energía no absorbida por la clorofila.

La clorofila a ($R = -CHO$) absorbe sus energías de longitudes de onda correspondientes a los colores que van del violeta azulado al anaranjado-rojizo y rojo.

El organismo vegetal ha desarrollado un sistema para capturar un fotón de luz y utilizar la energía para elevar el nivel energético de un electrón determinado que posteriormente regresa su nivel basal; cuando esto sucede, el exceso de energía es liberada en diferentes formas. La evolución de la vida vegetal ha logrado, a través de mecanismos bioquímicos, desviar el retorno del electrón a su nivel primitivo y utilizar el exceso de energía para sintetizar carbohidratos.

Además de las clorofilas a y b, en el cloroplasto de plantas superiores, hay otro grupo de pigmentos que son los carotenoides y las xantofilas. Existen otros pigmentos, como son las antocianinas, que se encuentran en células de vegetales superiores y que determinan, en especial, el color de las flores y algunos matices en hojas y otras estructuras de la planta.

OBJETIVO

Se determinará la cantidad de clorofila extraída de una muestra de espinaca. También se conocerán las diferencias entre clorofila, antocianinas y caroteno.

MATERIAL

1 mortero

1 embudo Buchner

1 matraz de filtración

1 matraz aforado de 50 ml

1 probeta de 100 ml

1 vaso de precipitado de 200 ml

4 tubos de ensayo

1 pipeta de 5 ml

1 embudo

1 pipeta Pasteur, mechero, tripie y rejilla, espectrofotómetro y celdas, gradilla

2 discos de papel filtro

1 g de hojas frescas de espinaca

3 g de pétalos de flores azules

Arena

Reactivos:

Acetona al 80% (v/v)

H₂SO₄ 0.1N

NaOH 0.1N

Papel pH 0–14

METODOLOGIA

• DETERMINACION DE CLOROFILAS

Colocaremos 1 g de hojas frescas de espinaca, cortada en trozas pequeños y agregar arena y 1 ml de acetona, después moler. En caso de que se evapore la acetona se agregaran 5 ml más. Filtrar al vacío.

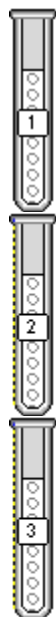
Se agregaran a la pulpa otros 10 ml de acetona y volver a moler, después se filtra. En seguida se aforara a 25 ml acetona. Después leer la absorbancia a 645, 652 y 663 nm.

• OTROS PIGMENTOS NO FOTOSINTETICOS: LAS ANTOCIANINAS

Utilizaremos 3 g de flores azules; estas se lavaran y se ponen a hervir con agua destilada por unos minutos. Enseguida, se dejara enfriar y filtrar.

En 3 tubos se colocan 5 ml de extracto. Al tubo 1 lo utilizaremos como control; al tubo 2 le agregaremos gota a gota la solución de H₂SO₄ 0.1N y observar los cambios de color y medir el pH del tubo; al tubo 3, añadiremos NaOH 0.1N gota por gota y medir el pH.

Agregar 5 ml de extracto a los tubos



Control H₂SO₄ NaOH

pH pH pH

Color color color

RESULTADOS

- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CLOROFILA
- Se calculara la cantidad de clorofila presente en el extracto, expresándola como mg de clorofila por gramo de tejido extraído, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Densidad óptica (nm)	Absorbancia
645	0.336
652	0.516
663	0.850

$$\text{Clorofila } a = 12.7(0.850 \text{ nm}) - 2.29(0.336 \text{ nm}) \frac{25 \text{ ml}}{1000 \cdot 0.25 \text{ g}} = 0.989$$

$$\text{Clorofila } b = 22.9(0.336 \text{ nm}) - 4.68(0.850 \text{ nm}) \frac{25 \text{ ml}}{1000 \cdot 0.25 \text{ g}} = 0.371$$

$$\text{Clorofila total} = 20.2(0.336 \text{ nm}) + 8.02(0.850 \text{ nm}) \frac{25 \text{ ml}}{1000 \cdot 0.25 \text{ g}} = 1.495$$

B. OTROS PIGMENTOS NO FOTOSINTETICOS: ANTOCIANINAS

En la siguiente tabla se expresan los resultados obtenidos por tubo, al agregarles H₂SO₄, NaOH.

Tratamiento	Color	pH
Extracto original	<i>rosa</i>	<i>7</i>
Extracto + H ₂ SO ₄	<i>violeta</i>	<i>1</i>
Extracto + NaOH	<i>azul</i>	<i>11</i>

DISCUSIÓN

A pesar de que se tuvo los cuidados necesarios durante la extracción se puede esperar algunas impurezas que afectarían los resultados. Como era de esperarse el pH del extracto control fue de 7 ya que al tratarse de ácidos o bases casi no se disocian de forma completa. En cuanto a cambio del color se realizó en un rango de pH 1 al agregar ácido y 11 para base, dado que la información se realizó de forma cualitativa se cubrieron las expectativas en general.

CONCLUSIÓN

Las clorofilas son el pigmento que le da color a las hojas de espinaca (y vegetales verdes) y se encarga de absorber la luz necesaria para realizar la fotosíntesis, así se transforma la energía luminosa a química.

En relación a las antocianinas podemos decir que según la literatura citada y los resultados obtenidos en la práctica: las antocianinas son rojizas en soluciones ácidas pero se tornan purpuras y azules cuando se aumenta el pH.

Debido a estas propiedades y a la presencia común de más de una antocianina, existe una amplia variedad en los matices de las flores.

CUESTIONARIO

• QUE SON LAS CLOROFILAS?

Son un grupo de sustancias en las plantas. Se encuentran en los pigmentos verdes de las hojas en los cloroplastos unidos a los pigmentos amarillos, carotenoides y xantofila.

La clorofila tiene la capacidad de transformar la energía luminosa absorbida en energía química, canalizándola hacia reacciones celulares de biosíntesis.

La capacidad de capturar el fotón y convertir la energía luminosa en energía química es propiedad de las plantas verdes. La sustancia que absorbe energía radiante que incide en la planta, es la clorofila, esta molécula de pigmento se encuentra en la unidad estructural fotosintética llamada cuantosoma, que corresponde a una parte del tilacoide.

Se conocen dos tipos de clorofila: La A y B. Presentan propiedades y composición parecida en su estructura.

• DESCRIBA LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS PIGMENTOS VEGETALES Y DIGA ¿CUAL ES SU IMPORTANCIA?

Inicialmente se reconoció el pigmento de las plantas como la sustancia responsable de la absorción luminica en la fotosíntesis, capaz de absorber la luz roja y azul, no la verde.

Pero hace mucho tiempo se sabe que existen otros pigmentos diferentes en las plantas, de diversos colores y que incluso la clorofila no es una sustancia simple, sino un grupo de pigmentos (del complejo de las clorofilas) interrelacionados.

Todos estos pigmentos absorben fotones para aumentar el nivel energético del electrón y así poder sintetizar carbohidratos.

Los demás pigmentos como las carotenoides, xantofilas y antocianinas determinan el color de las flores en las células superficiales de los pétalos.

• DESCRIBA LAS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA CLOROFILA Y EL CAROTENO.

El nombre de caroteno se debe a Wachen Roden, quien le dio este nombre por el pigmento amarillo que se obtenía de la zanahoria que en inglés es carrot, pues el δ -caroteno es amarillo.

Es considerado como Pro-vitamina A y existe en un sin número de compuestos unidos a la clorofila de las plantas que se clasifican según su función química: hidrocarburos, alcoholes, ácidos y acetonas.

El δ -caroteno pertenece al grupo de los hidrocarburos junto al δ -caroteno y el γ -caroteno, correspondiéndoles la fórmula $C_{40}H_{56}$.

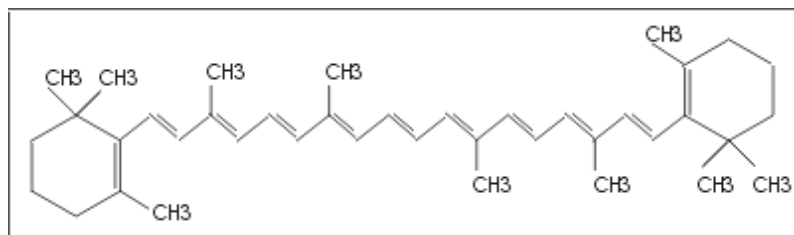
La diferencia esencial de su naturaleza química es que el δ -caroteno da dos moléculas de provitamina A y el γ -caroteno, produce una sola al igual que el δ -caroteno.

Los tres tienen un mismo peso molecular y pueden actuar como provitamina A.

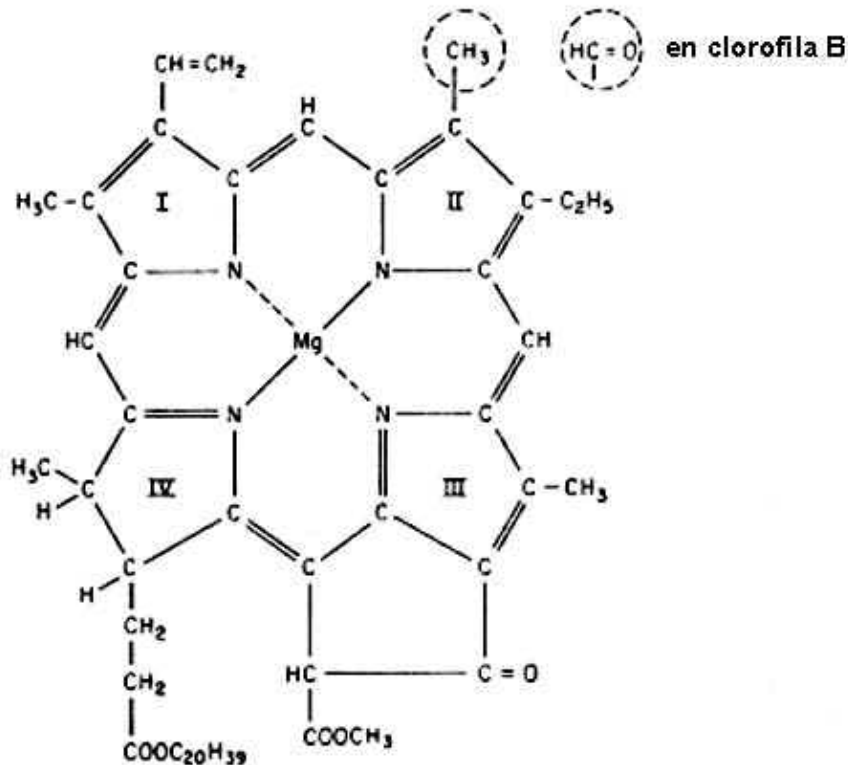
Están distribuidos en la naturaleza en diferentes vegetales como espinaca, berro, lechuga, alfalfa, banano y otros.

La solubilidad es parecida en los tres. A este grupo también pertenece la lacriptoxantina que se encuentra en la yema de huevo.

δ -caroteno



Entre la clorofila a y b, el anillo tetrapirrol de la parte superior da el color verde y se compone de cuatro anillos pirrol, mientras que la cola fitol $C_{20}H_{39}$ (hidrofoba), común en ambas clorofilas, probablemente penetra la membrana. La clorofila a es verde-azul; la clorofila b, verde-amarilla.



• QUE SON LAS ANTOCIANINAS?

Las antocianinas (griego *antos*, flor y *ciano*, azul oscuro) son pigmentos coloreados que por lo común se encuentran en flores rojas, azules y púrpuras. También se presentan en muchas otras partes de la planta, como en ciertos frutos, tallos, hojas e incluso raíces. Con frecuencia, los flavonoides se encuentran confinados a células epidérmicas. La mayoría de los frutos y muchas flores deben sus colores a las antocianinas, aunque algunos, como varias flores amarillas y los frutos del tomate, son coloreados por carotenoides. Los colores brillantes de las en otoño se deben en gran parte a la acumulación de antocianinas en días fríos y brillantes. Al parecer las antocianinas suelen estar ausentes de hepáticas, algas y otras plantas inferiores, aunque en musgos se presentan algunas antocianinas y otros flavonoides. Solo en raras ocasiones se ha podido demostrar su existencia en gimnospermas, si bien estas contienen otros tipos de flavonoides. En plantas superiores existen varios tipos de antocianinas y con frecuencia hay más de uno en una flor. Se presentan como glicósidos, por lo común con una o dos unidades de glucosa o galactosa unidas al grupo hidroxilo del anillo central o al grupo hidroxilo localizado en la posición 5 del anillo A.

• QUE DIFERENCIA HAY ENTRE LAS CLOROFILAS Y LAS ANTOCIANINAS?

Las clorofilas son pigmentos verdes con estructuras policíclicas planas que se parecen a la protoporfirina de la hemoglobina excepto que la posición central está ocupada por Mg²⁺ en lugar de Fe²⁺.

Los flavonoides son compuestos de 15 carbonos que se encuentran en todo el reino vegetal. La estructura básica de los flavonoides, comúnmente se ve modificada de tal forma que se presentan aún más enlaces dobles, lo que hace que los compuestos absorban luz visible, dándoles color. Los dos anillos de carbono en los extremos izquierdo y derecho de la molécula se designan A y B, respectivamente. El anillo A y el oxígeno del anillo central se derivan por completo de unidades acetato proporcionadas por el acetil CoA. En los flavonoides casi siempre se presentan grupos hidroxilo, sobre todo unidos al anillo B en las posiciones 3' y 4' o en las posiciones 5 y 7 del anillo A, o en la posición 3 del anillo central.

Anillo básico de antocianina

BIBLIOGRAFIA

SALISBURY, B. FRANK

Fisiología Vegetal, Ed. Iberoamericana, 1994.

MATHEWS, C. K. Y VAN HOLDE, K. E.

Bioquímica, McGraw Hill Interamericana, 2^a. Ed., España, 1998.

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E., HILL, R., LEHMAN, R.

Principios de Bioquímica, McGraw Hill, 1989.

CS CHEMDRAW ULTRA 7 (estructuras)

CambridgeSoft, 2001