

PRÁCTICAS DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS MEDIANTE DISOLVENTES QUÍMICOS

1. INTRODUCCIÓN

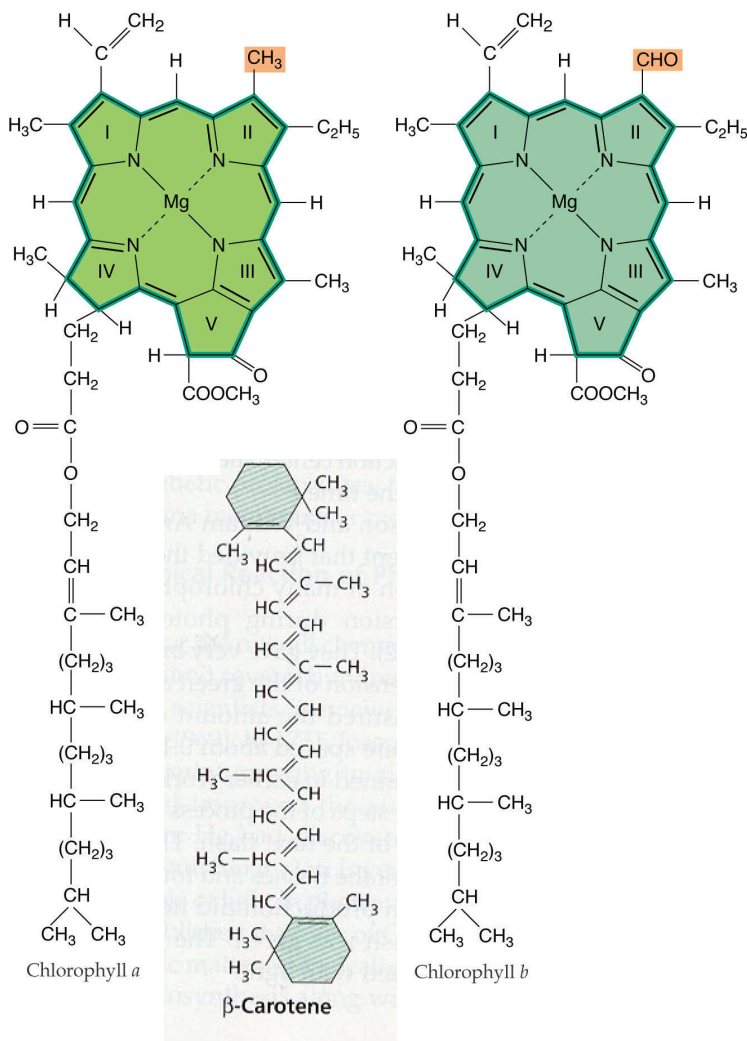
En las plantas superiores, la fotosíntesis es posible debido a la presencia en el cloroplasto, concretamente en las membranas tilacoidales, de una serie de pigmentos que tienen capacidad para captar la luz. Existen dos tipos básicos de pigmentos fotosintéticos:

Clorofilas. Compuestas por una porfirina que lleva incorporado un átomo de magnesio en el centro del núcleo tetrapirrólico. El ión Mg^{2+} 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 alcoholico 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 $-CH_3$ 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.



Imágenes tomadas de Buchanan, Gruissen & Jones. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. Rockville, Maryland. USA. 2000

2. OBJETIVO

Separar clorofilas a y b, carotenos y xantofilas basándose en sus diferencias de solubilidad, que a su vez, son una consecuencia de sus diferencias estructurales.

3. MATERIAL

Hojas frescas o secas de espinaca o de acelga
2 pipetas de 20 y 5 ml
Embudo, papel de filtro y centrífuga

Granatario
Mortero y mano
Probeta graduado de 100 ml
Ampolla de decantación de 250 ml
2 Erlenmeyer de 125 ml
Gradilla y dos tubos de ensayo gruesos
Acetona
Éter de petróleo de entre 60 y 80 °
Metanol acuoso del 92% v/v (atención es tóxico por inhalación y en contacto con la piel)
Éter etílico
Solución de KOH al 30% p/v en metanol
Carbonato cálcico

4. METODOLOGÍA

A 5 g de hojas frescas¹ desnervadas y troceadas, se les añaden 25 ml de acetona al 100% (preferiblemente con una pizca de carbonato cálcico para neutralizar los tejidos ácidos y prevenir una pérdida parcial de magnesio de las clorofilas) y se machaca la mezcla en el mortero.

Una vez obtenido el extracto, se filtra a través de papel o bien se centrifuga durante 3 minutos a 7000 rpm con objeto de eliminar los restos celulares. La solución resultante contiene clorofilas a y b, carotenoides y moléculas incoloras solubles en acetona.

El siguiente paso consiste en cambiar el disolvente, la acetona, por éter de petróleo. Para ello, se toman 30 ml de éter de petróleo y se llevan a una ampolla de decantación **¡asegúrate de que está cerrada la salida!**. Se añaden 20 ml del extracto. A continuación, y con objeto de eliminar la acetona, se añaden 35 ml de agua destilada a la mezcla, lentamente y dejándola resbalar por las paredes. Se agita suavemente y se espera hasta que se separen dos capas, en la superior estarán los pigmentos que se pretenden separar y en la inferior la mezcla de acetona y agua. Se abre la llave de la ampolla, se recoge esta última capa y se tira. Se repite el lavado con agua dos veces más, y en la última, y para asegurarse que se haya eliminado toda la acetona, se deja escapar un pequeño volumen de la capa que contiene los pigmentos.

A continuación, se añaden 25 ml de metanol acuoso del 92% y se mezcla enérgicamente, teniendo la precaución de destapar de vez en cuando para dejar escapar los gases acumulados. La solución de metanol es más polar y densa que el éter de petróleo y ambos son inmiscibles, por lo que se formarán dos capas:

La superior, de éter de petróleo, lleva disueltos los pigmentos más apolares, clorofila a y carotenos

La inferior, de metanol, lleva disueltos los más polares, clorofila b y xantofilas. Separa ambas capas.

Separa ambas capas en dos recipientes distintos e identifica claramente cada uno de ellos.

El siguiente paso es una nueva operación de cambio de disolvente, en este caso metanol por éter etílico. Coloca 25 ml de la solución de metanol que contiene la clorofila b y las xantofilas, en la ampolla de decantación y mézclalos con 25 ml de éter etílico. Añade 15 ml de agua destilada de 5 5n 5 ml, lentamente y dejando resbalar por las paredes. Agita cuidadosamente en cada fracción de 5 ml de agua. Elimina la capa acuosa inferior en la que hay metanol y agua pero no lleva ningún pigmento ya que es demasiado polar. Al final de este proceso, todos los pigmentos que estaban disueltos en el metanol pasarán a estar en éter etílico.

¹ La práctica se puede hacer también con hojas secas. En este caso, se pesan 3 g de hoja y se les añade 40 ml de acetona del 80% (con carbonato cálcico). Se agita la mezcla hasta que se obtenga una solución de color verde intenso.

Llegados a este punto, hay dos disoluciones diferentes

Solución de éter etílico	Solución de éter de petróleo
Clorofila b	Clorofila a
Xantofilas	Carotenos

El siguiente paso consiste en separar cada una de las clorofilas de su pigmento acompañante. Esto se consigue rompiendo, mediante hidrólisis con KOH, el enlace éster que une la cola de fitol (hidrofóbica) con la cabeza porfirínica (hidrófila). De este modo, las clorofilas pasan a estar en forma de clorofilidas.

Para la hidrólisis, se toman 15 ml de cada una de las dos soluciones y se disponen en sendos erlenmeyer. A cada una de ellas se añaden 7.5 ml de KOH del 30% en metanol y se agita durante 10 minutos.

Posteriormente se añaden 15 ml de agua destilada a cada erlenmeyer y de nuevo se agita durante 1 minuto.

Vierte cada una de las soluciones en sendos tubos de ensayo anchos y permite que se separen las fases. Cada solución de carotenoides formará una capa por encima de la de las clorofilidas en cada uno de los tubos

5. RESULTADOS

Toma nota del color de cada uno de los pigmentos y del disolvente en el que se encuentran

Pigmento	Color	Disolvente
Clorofilida a		
Clorofilida b		
Xantofilas		
Carotenos		