

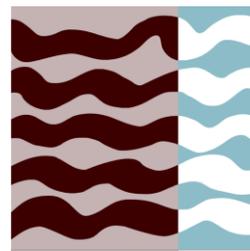
Prácticas de Fisiología Vegetal

Cromatografía de pigmentos fotosintéticos
y otros pigmentos

Ingeniería agrónoma grado en hortofruticultura y
jardinería



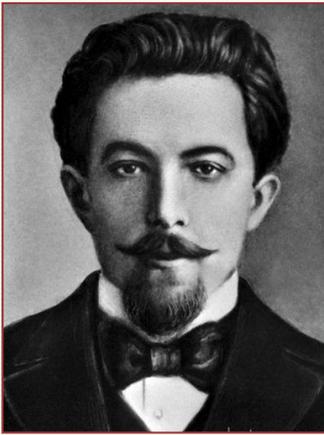
Universidad
Politécnica
de Cartagena



ETSIA
Cartagena

Jorge Cerezo Martínez

Fuensanta Sánchez Cánovas



Mijaíl Semiónovich Tsvet 1872 † 1919

En Ginebra recibe estudios superiores en el Departamento de Física y Matemática de la Universidad de Ginebra en 1893. Decide dedicarse a la botánica y recibe el doctorado años más tarde en 1896 por su tesis sobre la Fisiología de la Célula. En el mismo año se traslada a San Petersburgo reclamado por su padre, oficial ruso, para contribuir en el Servicio Exterior. En 1917 es nombrado Profesor titular de Botánica y director del Jardín Botánico de la Universidad de Tartu en Estonia. Al año siguiente tropas germanas ocupan la ciudad y la universidad es evacuada. Tsvet fallece meses más tarde a los 47 años por una inflamación crónica de garganta

Su trabajo

La cromatografía fue inventada por Tsvet en 1906 durante su investigación sobre los pigmentos de las plantas. Tsvet separó los pigmentos de las plantas (clorofilas) vertiendo extracto de hojas en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo en el interior de una probeta. El método fue descrito el 30 de diciembre de 1901 en el XI Congreso de Naturalistas y Médicos en San Petersburgo.

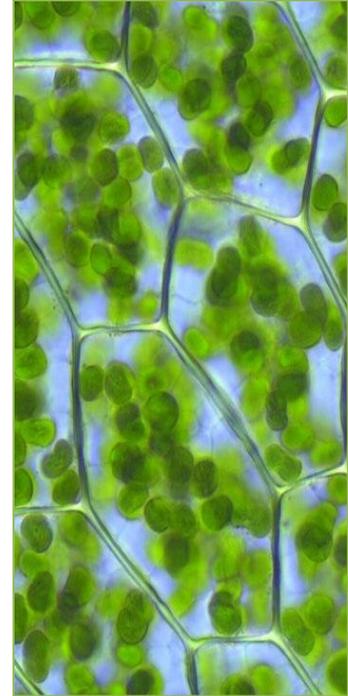
El trabajo de Tsvet fue ignorada durante varias décadas debido a diversas razones: los acontecimientos trágicos en Rusia a principio del siglo XX, el hecho de que Tsvet sólo publicara en Rusia haciendo inaccesible los resultados al resto de científicos occidentales y sobre todo un artículo en contra de las investigaciones de Tsvet realizada por Willstater Stoll. Ya por 1930 la idea de Mikhail se retomó gracias al científico alemán Edgar Lederer y al bioquímico austriaco Richard Kuhn.

Objetivos

Pretendemos facilitar el aprendizaje de la técnica de cromatografía en capa fina, también el conocimiento de conceptos cromatográficos como polaridad, fase móvil, fase estacionaria, factor de retención entre otros. Y la determinación de los distintos pigmentos contenidos tanto en frutas como en hojas.

Los cloroplastos deben su color verde a la clorofila. Sin embargo lo que realmente existe en los cloroplastos es una mezcla de pigmentos: Clorofila a, Clorofila b, carotenos y xantofilas.

Todas estas sustancias presentan un grado diferente de solubilidad, la cual permite su separación ascendiendo por capilaridad por una tira de papel de filtro. Las más solubles se desplazarán a mayor velocidad, pues acompañarán fácilmente al disolvente a medida que este va ascendiendo de forma análoga los que menos. De esta forma, al cabo de un tiempo, a lo largo del papel poroso se irán situando los distintos pigmentos.



Antecedentes

La cromatografía es una técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Esta técnica depende del principio de absorción selectiva. A medida que la solución va filtrándose por la columna, cada componente de la mezcla precipita a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Cada banda corresponde a un pigmento diferente.

La cromatografía es probablemente la más versátil de las técnicas de separación: es aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. De hecho las técnicas de separación suelen dividirse en dos grandes grupos:

- Cromatográficas
- No cromatográficas

La elección de una técnica cromatográfica concreta dependerá de la naturaleza y cantidad de la muestra, del objetivo de la separación y de las limitaciones del tiempo y equipo asequible.

Podemos distinguir 3 tipos de cromatografía dependiendo si la fase estacionaria/fase móvil es sólido/líquido, líquido/líquido o líquido/gas:

- **Si es sólido/líquido, cabe distinguir entre:**

Cromatografía de adsorción: El sólido adsorbe al componente que inicialmente estaba en fase móvil (líquida o gaseosa (Fuerzas de Van der Waals)

Cromatografía de cambio iónico: el sólido es un cambiador de iones (fuerzas electrostáticas).

Cromatografía de exclusión (o geles): el sólido es un gel formado por polímeros no iónicos porosos que retienen a las moléculas de soluto según su tamaño.

Cromatografía de afinidad: Es un tipo especial de cromatografía de adsorción, utilizada especialmente en bioquímica, en la que un sólido tiene enlazado un

llamado ligando de afinidad que puede ser por ejemplo, un indicador enzimático o un anticuerpo.

■ **Si es líquido/líquido, cabe distinguir:**

Cromatografía de partición: el soluto se reparte entre la fase móvil (líquido o gas) y en la fase estacionaria.

■ **Si es líquido/gas, cabe distinguir entre:**

Cromatografía gas-líquido (CGL), que es cromatografía de partición.

Cromatografía gas-sólido (CGS), que es cromatografía de adsorción.

Si es un fluido supercrítico, se trata de la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), que puede ser de partición o de adsorción.

Las técnicas cromatográficas, según el dispositivo utilizado para conseguir la separación entre la fase móvil y la estacionaria, pueden ser: en columna y plana.

Cromatografía en columna: Se utiliza en un tubo cilíndrico, en cuyo interior se coloca la fase estacionaria y a su través se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil (líquido o gas) a través de la estacionaria se consigue:

- 1) Por presión
- 2) Por capilaridad
- 3) Por gravedad

Cromatografía plana: La fase estacionaria está colocada en una superficie plana que en realidad es tridimensional, aunque una de sus dimensiones es muy reducida, por lo que puede considerarse bidimensional. Se divide en dos tipos generales:

■ Cromatografía en papel: En la que el papel absorbente actúa como soporte de la fase estacionaria (cromatografía de partición). Una muestra líquida fluye por una tira vertical de papel absorbente, sobre la cual se van depositando los componentes en lugares específicos.

■ Cromatografía en capa fina: En la que un sólido actúa como fase estacionaria (cromatografía de partición), se extiende en una capa delgada sobre una placa, generalmente de vidrio.

El uso de la cromatografía está ampliamente extendido en el análisis de alimentos, medicinas, sangre, productos petrolíferos y fisión radiactiva.

Materiales y métodos

Los materiales para desarrollar la práctica fueron los siguientes:

- Hojas de Acelga (Beta vulgaris var. cicla)
- Mortero
- Pipetas Pasteur
- Probeta
- Pinzas
- Bisturí
- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Tubos capilares
- Vaso de precipitado
- Tubos tipo Eppendorf de 1 mL
- Tiras cromatográficas (TLC)
- Acetona
- Hexano
- Benceno
- NaSO₄ anhidro

El procedimiento desarrollado fue el siguiente:

A) Obtención del extracto de pigmentos

Trocear una hoja verde con unas tijeras (eliminando la nervadura) en el mortero para triturarla, añadir acetona hasta un máximo de 10 mL, para los frutos se utilizará un disolvente orgánico (metanol clorhídrico). Conseguir una trituración completa y dejar reposar unos minutos para que el disolvente extraiga los pigmentos. Mezclar la preparación con una cucharada de NaSO₄ anhidro. Remover y extraer con cuidado sumo la parte decantada de la preparación, obtener de ésta 1 mL y depositarlo en dos tubos de microcentrifuga. Introducir en la centrifugadora unos minutos hasta que precipite la parte sólida al fondo y quede el preparado purificado en su superficie. Extraer estas purificaciones e introducirlo en otro Eppendorf ya separado con el que posteriormente trabajaremos.

Por último preparar la cubeta cromatográfica añadiéndole 10mL de hexano:acetona:benceno (85:10:5) y unos gramos de sulfato sódico anhidro en el fondo.

b) Separación cromatográfica

Una vez obtenemos nuestra preparación depositamos gotitas del extracto con los capilares en la tira cromatográfica, ha de repetirse el proceso unas 8-9 veces hasta que la tira cromatográfica concentre suficiente extracto. Ha de esperarse el tiempo que sea preciso entre deposición y deposición del extracto sobre la tira cromatográfica.

Una vez concluido, introducir el cromatograma en la cubeta hasta que la punta del papel se sumerja en el disolvente, evitando que el disolvente moje la muestra. Con el papel totalmente vertical, sin que toque las paredes, sujetar la parte superior con un gancho al tapón y cerrar herméticamente.

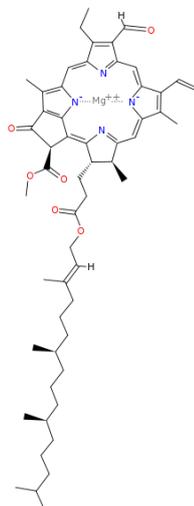
A los 15-20 minutos sacar el cromatograma desarrollado y marcar: 1º la altura alcanzada por el disolvente y luego cada una de las bandas obtenidas. Medir las distintas recorridas por cada mancha desde el origen y hallar sus Rf (cociente entre las distancias de cada mancha debido por la distancia del disolvente). Anotar los colores visibles

Los Rf de cada sustancias son constantes siempre que se mantengan las condiciones de la separación (soporte cromatográfico, disolvente, número y concentración de las sustancias a separar y temperatura).

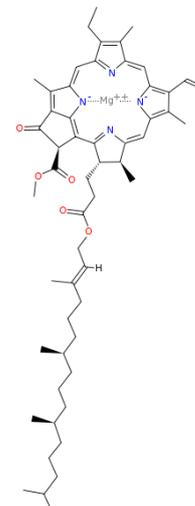
Con el método descrito anteriormente y utilizando hojas verdes se suelen obtener 5 bandas: F1 de color anaranjado formada por caroteno, F2 de color amarillo y F3 amarillo más débil que son xantofilas, F4 de color azul-verdoso la clorofila a y F5 de color verde-amarillento que es clorofila b. El caroteno es un hidrocarburo y es hidrofóbico por lo que asciende más que las xantofilas y las clorofilas que son hidrofílicas y su velocidad es menor.

Conclusiones

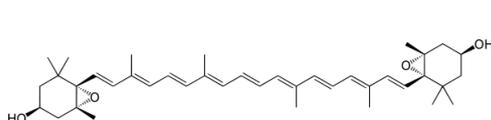
Antes de comenzar la experiencia hemos de saber la naturaleza de cada uno de los pigmentos que vamos a encontrar en las preparaciones



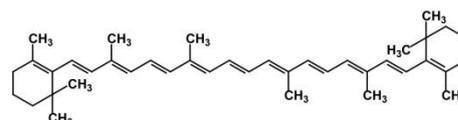
Clorofila b



Clorofila a



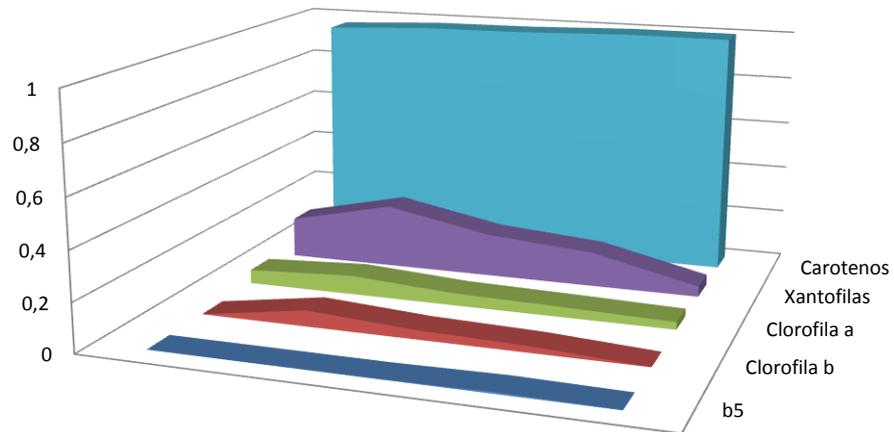
Violaxanteno (Xantofilas)



β - caroteno (Carotenos)

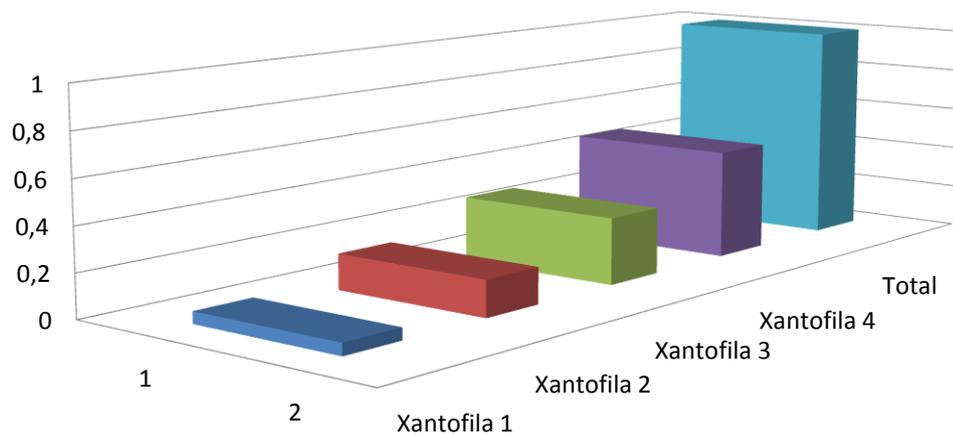
Cuestiones sobre la experiencia y resultados

Relación recorrida



	1	2	3	4	5
■ b5				0,007	
■ Clorofila b		0,066	0,038	0,026	
■ Clorofila a	0,057	0,079	0,051	0,042	0,031
■ Xantofilas	0,168	0,265	0,18	0,145	0,0438
■ Carotenos	0,963	0,983	0,987	1	1

Relación recorrida

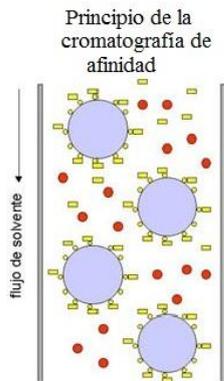


	1	2
■ Xantofila 1	0,055	0,055
■ Xantofila 2	0,166	0,166
■ Xantofila 3	0,305	0,305
■ Xantofila 4	0,5	0,5
■ Total	1	1

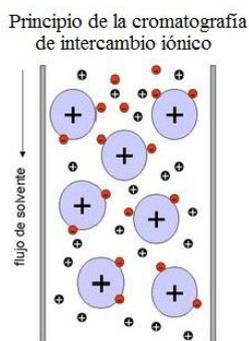
Cuestiones

¿Qué pigmento tiene mayor R_f y por qué?

Los carotenos son los menos polares y los que menos afinidad presentan en la tira cromatográfica



Las bolas de gel están recubiertas de un ligando por el que tiene afinidad alguna de las proteínas a aislar. Al pasar la mezcla compleja a través de la columna ésta proteína es retenida en la superficie de las bolas eluyéndose de las demás. Para eluir la proteína retenida por afinidad suele aumentar la fuerza iónica de la solución del solvente o incluir en éste el ligando soluble a alta concentración de forma que compita con el que está unido a las bolas de gel por la unión a la proteína.



Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente, y son retenidas.

Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidas.

La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoeléctrico hasta invertir su carga neta.

-Los carotenos y las xantofilas determinan el color brillante de las hojas en Otoño, ¿Por qué el color de estos pigmentos no se manifiesta hasta su llegada?

El cambio de color a rojo o amarillo cuando se acerca el otoño no es el resultado de la muerte de las hojas, sino de una serie de procesos, que difieren para el caso del rojo y el del amarillo, en las hojas otoñales.

Cuando la clorofila verde de las hojas disminuye, los pigmentos amarillos que ya existen en ellas se vuelven predominantes y dan esa tonalidad a las hojas.

Las hojas otoñales rojas son el resultado de un proceso diferente: Conforme disminuye la clorofila, se va produciendo un pigmento rojo que antes no estaba presente, la antocianina, y que tiene una finalidad protectora para el vegetal.

¿Cuál de los pigmentos es retenido con mayor intensidad por la tira cromatográfica y por qué?

La clorofila b, es la más polar y la que mayor afinidad tiene en la tira cromatográfica

Referencias

- <http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm>
- <http://es.scribd.com/doc/16675209/6-EXTRACCION-Y-SEPARACION-DE-PIGMENTOS-VEGETALES>
- http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/BiologiaCCAA/Guiones/Practica2.htm
- <http://www.paginasprodigy.com.mx/tmx4448420824/biologia1/cromatografia.jpg>
- <http://www.sciencephoto.com/media/10711/enlarge>
- <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---C/Chlorophyll.htm>