



## XXIX OLIMPÍADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA - 2020



XXIX OLIMPÍADA  
ARGENTINA DE BIOLOGÍA

**El siguiente Trabajo Práctico forma parte de las actividades programadas desde Olimpiada Argentina de Biología en el marco del aislamiento social, preventivo y obligatorio.**

# Extracción y separación de pigmentos vegetales

**Dra. María Verónica Meringer**

## Introducción

Los pigmentos vegetales son compuestos químicos responsables de los colores típicos de las plantas. Los pigmentos se caracterizan por absorber luz y presentar color por el reflejo de ciertos

espectros de luz. Obviamente, las flores y los frutos contienen muchas moléculas orgánicas que absorben luz. Las hojas, tallos, y raíces también contienen muchos pigmentos, que incluyen las antocianinas, flavonoides, flavinas, quinonas y citocromos. Sin embargo, ninguno de éstos debe ser considerado como un pigmento fotosintético. Los pigmentos fotosintéticos son los únicos que tienen la capacidad de absorber la energía de la luz solar y hacerla disponible para el aparato fotosintético. En las plantas terrestres hay dos clases de pigmentos fotosintéticos: las **clorofilas** y los **carotenoides**, y en cianobacterias y algas rojas también se encuentran las **ficobilinas**. La capacidad de las clorofilas y los carotenoides para absorber la luz del sol y utilizarla de manera efectiva está relacionada con su estructura molecular y su organización dentro de la célula.

En los cloroplastos de las hojas, las plantas utilizan la luz solar para transformar la materia inorgánica (dióxido de carbono, agua y sales minerales) en materia orgánica necesaria para alimentar al resto de la planta. Además de las clorofilas, otros pigmentos están presentes en los vegetales para colaborar en la captación de energía. Entre ellos destacaremos a los carotenos, xantofilas, antocianos, etc. Estos pigmentos absorben la energía solar como si se tratase de antenas o células fotovoltaicas que ponen en marcha el motor fotosintético. Algunos pigmentos importantes y sus características son:



- **Clorofilas:** Se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores, especialmente en los órganos que están más expuestos a la luz, como pueden ser las hojas. Se sitúan en los cloroplastos, concretamente en las membranas de los tilacoides. Hay varios tipos de clorofila: a, b, c, d y e. De estas, solo dos se encuentran en los cloroplastos de las plantas superiores: la clorofila a, de color verde azulado, y la clorofila b, de color verde amarillento. La más importante es la clorofila «a», pues está presente en plantas, algas y cianobacterias fotosintéticas.

- **Carotenoides:** Los carotenoides son otro grupo importante de pigmentos fotosintéticos. Estos absorben luz violeta y azul verdosa y proporcionan los colores brillantes que presentan las frutas. Los carotenoides no pueden utilizar directamente la energía de la luz para la fotosíntesis, sino que deben transferir la energía absorbida a la clorofila. Por esta razón, se consideran pigmentos accesorios. Otro ejemplo de un pigmento accesorio muy visible es la fucoxantina, que le da el color marrón a las algas marinas y a las diatomeas.

Los carotenoides se pueden clasificar en dos grupos: **carotenos y xantofilas.**

-**Carotenos:** Los carotenos son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos como pigmentos en plantas y animales. En las plantas, los carotenos imparten colores amarillos, naranjas o rojos a las flores (caléndula), frutas (calabaza) y raíces (zanahoria). En animales son visibles en grasas (mantequilla), yemas de huevo, plumas (canario) y exoesqueleto (langosta). El caroteno más común es el  $\beta$ -caroteno, el cual es el precursor de la vitamina A y se considera muy importante para los animales.

-**Xantófilas:** Las xantofilas son pigmentos amarillos cuya estructura molecular es similar a la de los carotenos, pero con la diferencia de que contienen átomos de oxígeno.

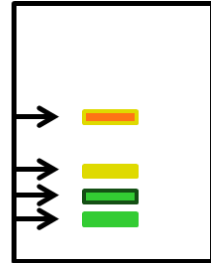
Todos estos pigmentos tienen propiedades físico-químicas diferentes como pueden ser, por ejemplo, su peso molecular o su solubilidad en disolventes orgánicos, como el alcohol etílico. Así, al hacer ascender por capilaridad a lo largo de un filtro una disolución que contenga estas moléculas se obtendrán líneas de diferentes colores, que corresponderán a los distintos pigmentos.

Existen diversas técnicas para extraer e identificar los pigmentos citados. Una de ellas es por el color:



PIGMENTO	COLOR
Clorofila A	Verde azulado
Clorofila B	Verde amarillento oscuro
Carotenos	Amarillo anaranjado
Xantófilas	Amarillo
Antocianinos	Rosado

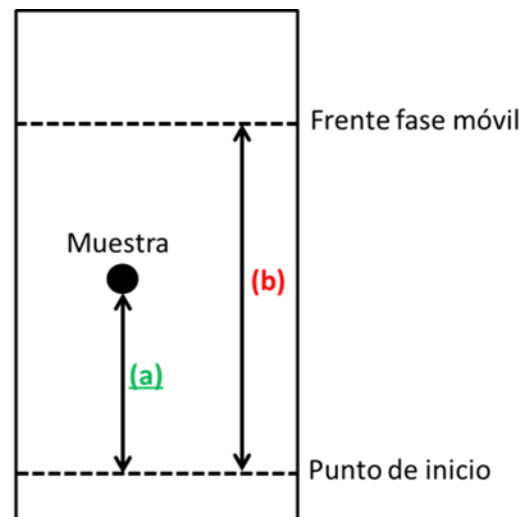
Carotenos  
Xantófila  
Clorofila a  
Clorofila b



Una técnica muy sencilla para separar pigmentos es la **cromatografía**. La cromatografía es un método físico en el que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: fase estacionaria (adsorbente) y la fase móvil. Esta técnica permite separar sustancias presentes en una mezcla, aprovechando la mayor o menor afinidad por un disolvente que recorre una columna de resinas o papel. El arrastre que ejerce el disolvente (fase móvil) sobre los distintos compuestos hace que éstos se desplacen con distinta velocidad, separándose poco a poco.

Para cada soluto se puede determinar el frente de corrida ( $R_f$ ) que corresponde a una medida de cuanto se ha movido un componente relativo al frente del solvente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (a)}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil (b)}}$$



$R_f$  es constante para una sustancia en particular, su valor va a depender de las fases estacionaria y móvil y de otros factores experimentales. Este valor puede servir para caracterizar los componentes de una mezcla si las condiciones experimentales se controlan cuidadosamente.

En este trabajo práctico realizaremos la extracción y separación de pigmentos de diferentes vegetales (espina o acelga, zanahoria y remolacha).

Llevaremos a cabo una cromatografía utilizando como fase estacionaria papel y/o tiza. Los pigmentos serán disueltos en alcohol etílico (solvente) y los pigmentos extraídos ascenderán por capilaridad en un material poroso (papel o tiza) de tal forma que los que tienen un mayor tamaño lo harán más despacio que aquellos que sean más pequeños.

### **Objetivos**

- Extraer y separar pigmentos de diferentes vegetales
- Realizar de manera sencilla la técnica de cromatografía
- Analizar y comparar resultados

### **Materiales:**

- Hojas de vegetales (espinaca, acelga, perejil, etc)
- Vegetales (zanahoria, remolacha, etc)
- Alcohol etílico 96%
- Mortero (o recipiente para poder triturar – aplastar los vegetales)
- Placa de Petri, bandejita o tapa de algún frasco
- Papel de filtro (filtro de café o servilletas de cocina)
- Embudo o colador
- Papel secante, hoja canson, tiza



### **Procedimiento:**

**1-** Colocar en el mortero (o recipiente para tal fin) el material vegetal del cual se van a extraer los pigmentos. En el caso de las hojas de espinaca o acelga, cortar en trozos pequeños y quitar las nervaduras; para las zanahorias y remolacha se debe rallar.



**2-** Agregar alcohol etílico 96% hasta cubrir las muestras. Evitar agregar demasiada cantidad de solvente para que no se diluyan los pigmentos (aproximadamente 20 ml). Se puede utilizar una jeringa o vasito medidor, dosificador de remedios, etc. para saber la cantidad que se agrega.



**3-** Machacar las hojas (o vegetales) hasta que el líquido adquiera una coloración intensa.



**4-** Con la ayuda del embudo o colador y/o el papel de filtro colar la preparación. Recolectar la muestra en la caja de Petri, bandejita o tapa de frasco.



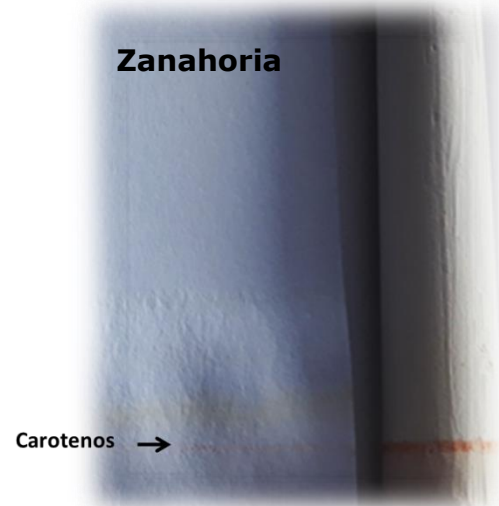
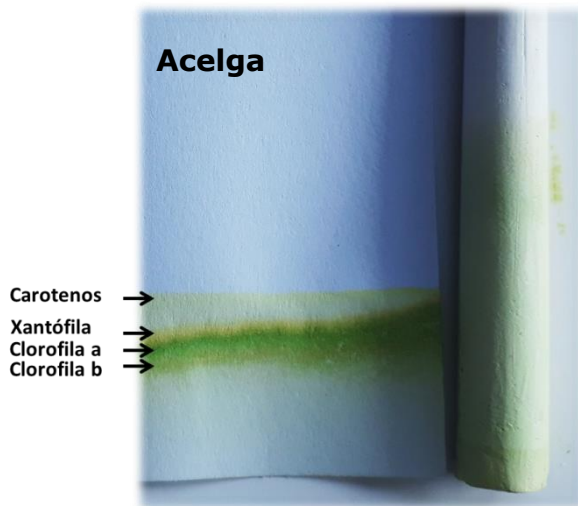
**5-** Cortar un rectángulo de papel secante u hoja canson y doblar a la mitad en forma de V. También se puede utilizar la tiza. Colocar el papel o tiza sobre el filtrado obtenido con cuidado de no tocar los bordes del recipiente. Dejar durante aproximadamente 30 minutos o hasta que el líquido haya ascendido lo suficiente y se vean los pigmentos separados.

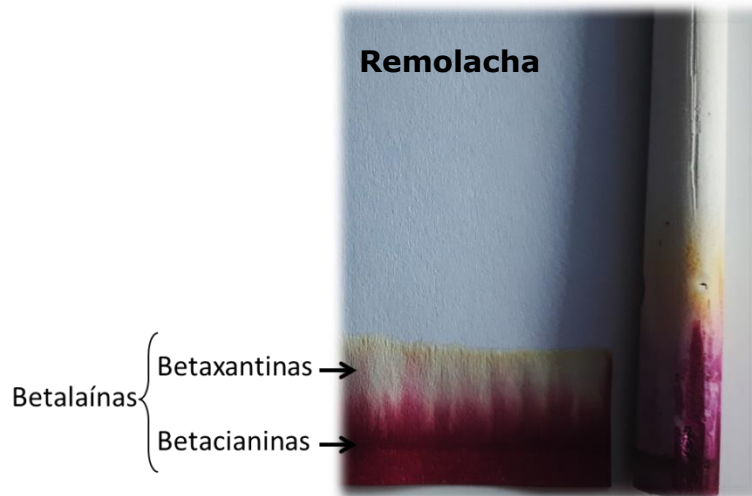


**6-** Observar e identificar las bandas de pigmentos.

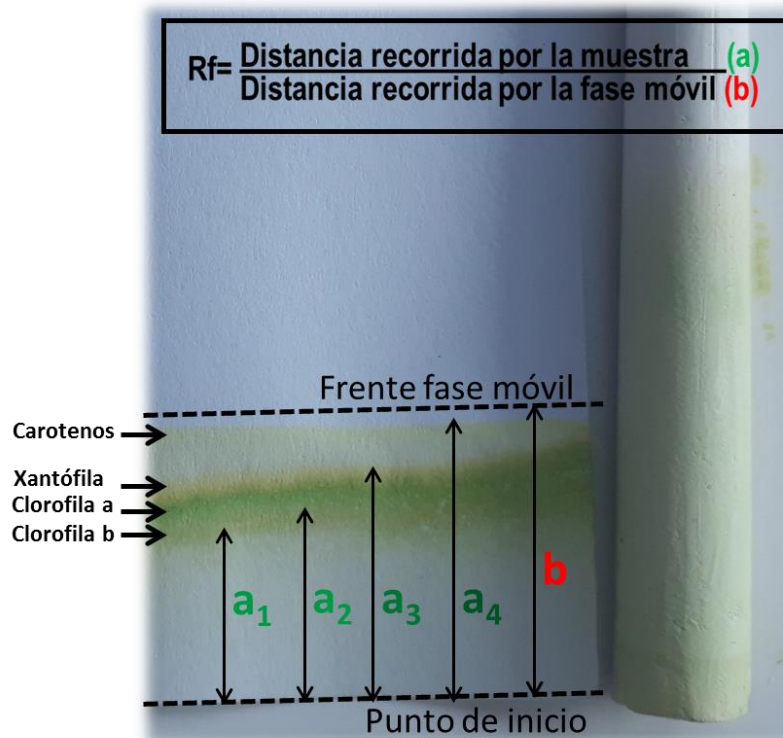
**Repetir los pasos 1 – 6 para cada uno de los vegetales.**

**Resultados esperados:**





7- Calcular los Rf para cada uno de los pigmentos que lograron separar.







### **Preguntas orientadoras para interpretar y discutir resultados:**

- 1-** ¿Qué pigmentos lograste separar e identificar en cada muestra vegetal?  
¿Fueron los mismos para todos los vegetales utilizados?
- 2-** ¿Por qué es posible separar pigmentos vegetales utilizando alcohol? ¿Qué otros solventes se pueden usar?
- 3-** ¿Cuál es la función de los pigmentos en las plantas?, ¿podría una planta vivir sin pigmentos?
- 4-** Las flores son estructuras pigmentadas ¿qué función tienen estos pigmentos?
- 5-** ¿Por qué crees que los distintos pigmentos tienen distinta velocidad de ascenso por el papel de filtro?
- 6-** ¿Cuál es el principal pigmento que contienen las remolachas?
- 7-** ¿Todos los pigmentos vegetales son fotosintéticos?



## **ANEXO: Actividades sugeridas**

Una vez realizada la cromatografía, se pueden utilizar los filtrados obtenidos para realizar las siguientes actividades y abordar de esta manera los contenidos básicos sobre soluciones, concentración y diluciones seriadas.

### **Actividad 1:**

Piensa y luego responde:

- 1-** ¿Los filtrados obtenidos son soluciones? ¿Por qué? Si es así, identifica el soluto y el solvente.
- 2-** ¿Se podría conocer la concentración de los pigmentos vegetales? Si tu respuesta es afirmativa, explica como lo harías. Si tu respuesta es negativa fundamenta.
- 3-** Al observar los filtrados, ¿Consideras que tienen la misma cantidad de pigmentos? ¿Tienen la misma concentración?
- 4-** ¿Conoces que son las diluciones? ¿y las diluciones seriadas?

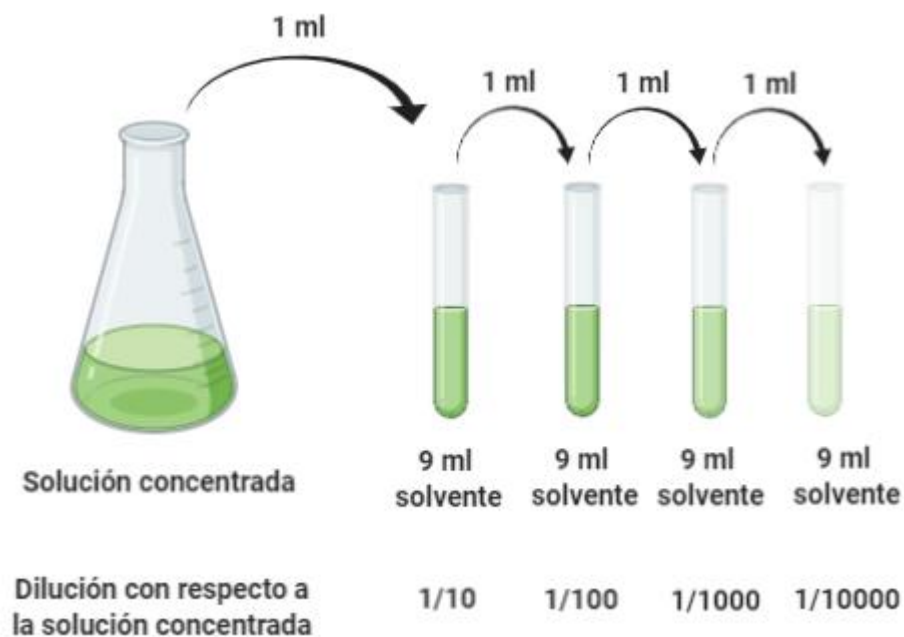
### **Trabajo Práctico: Diluciones**

#### **Introducción:**

En el laboratorio muchas veces es necesario diluir las muestras o los reactivos para obtener concentraciones muy pequeñas o adecuadas para alguna técnica en particular. Realizar una **dilución** significa agregar solvente, sin afectar la cantidad de soluto, alterando el volumen de la solución y por lo tanto la concentración de la misma (que disminuirá). La concentración de una solución es la relación entre la cantidad de soluto y solución o solvente. Existen distintas formas de expresar la concentración: molaridad (M), normalidad (N), molalidad (M), porcentual (% p/p, % p/v, % v/v). La concentración de la solución diluida dependerá del **factor de dilución** empleado; es decir de la relación que hay entre las concentraciones diluida y concentrada, o del cociente entre el volumen de la solución concentrada y el volumen de la diluida.

Por ejemplo, si necesitamos diluir una solución a la mitad de su concentración, tomamos un volumen de solución y le agregamos otro volumen igual de solvente (dilución  $\frac{1}{2}$ ). Si en cambio necesitamos hacer una solución 10 veces diluida (dilución  $\frac{1}{10}$ ), tomaremos un volumen de solución (Ej. 1 ml) y le agregaremos 9 veces ese volumen de solvente (9 ml).

Cuando se necesita preparar soluciones con concentraciones muy bajas de un soluto o alguna solución muy diluida, es conveniente realizar varias diluciones, en vez de prepararla en un único paso, ya que la cantidad de soluto o el volumen que se tendría que tomar de la solución serían tan pequeños que sería muy difícil de pesar o pipetear (a veces imposible). Es decir, que en estos casos se realizan **diluciones seriadas** (en serie), en donde se parte de una solución concentrada (madre o stock) y se realizan diluciones sucesivas a partir de esta utilizando (generalmente) el mismo factor de dilución como se observa en la figura.



### Actividad:

Utilizando los filtrados obtenidos en la extracción de pigmentos vegetales realiza diferentes diluciones simples y seriadas empleando diferentes factores de dilución.



### **Materiales:**

- Tubos de ensayo (o vasitos transparentes)
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml (o jeringa)

### **Procedimiento:**

#### ***Diluciones simples:***

**1-** Luego de realizar la cromatografía, toma lo que quedó del filtrado obtenido en la extracción de pigmentos vegetales de remolacha (será la solución concentrada) y realiza las siguientes diluciones: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20.

**2-** Realiza los cálculos necesarios y completa la siguiente tabla:

<b>Dilución</b>	<b>Volumen (ml) de solución concentrada</b>	<b>Volumen (ml) de solvente (agua o alcohol)</b>
<b>1/2</b>		
<b>1/4</b>		
<b>1/10</b>		
<b>1/20</b>		

**3-** Rotula cada tubo (o vasito) con la dilución que corresponda y luego realiza las diluciones correspondientes.

**4-** Observa la coloración de cada una de las diluciones y analiza los resultados.

**5-** Si la concentración de la solución inicial (concentrada) fuese 10% p/v. Calcula las concentraciones de los tubos con las diluciones 1/2, 1/4, 1/10 y 1/20.

	<b>Solución concentrada</b>	<b>Dilución 1/2</b>	<b>Dilución 1/4</b>	<b>Dilución 1/10</b>	<b>Dilución 1/20</b>
<b>Concentración (% p/v)</b>	10% p/v				



### **Diluciones seriadas:**

**1-** Luego de realizar la cromatografía, toma lo que quedó del filtrado obtenido en la extracción de pigmentos vegetales de acelga (será la solución concentrada) y realiza cuatro diluciones seriadas 1/5.

**2-** Realiza los cálculos necesarios y completa la siguiente tabla:

	<b>Solución concentrada</b>	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Tubo 3</b>	<b>Tubo 4</b>
<b>Volumen de solvente (agua o alcohol)</b>					
<b>Volumen de la solución a diluir</b>					
<b>Factor de dilución de cada tubo</b>					

**3-** Rotula cada tubo (o vasito) del 1 al 4 y luego realiza las diluciones correspondientes.

**4-** Observa la coloración de cada una de las diluciones y analiza los resultados.

**5-** Si la concentración de la solución inicial (concentrada) fuese 10% p/v. Calcula las concentraciones de los tubos 1, 2, 3 y 4.

	<b>Solución concentrada</b>	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Tubo 3</b>	<b>Tubo 4</b>
<b>Concentración (% p/v)</b>	10% p/v				



## Actividad 2:

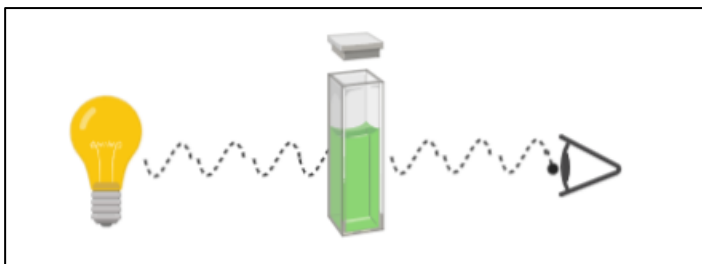
La siguiente actividad propone realizar una aproximación a espectrofotometría de absorción utilizando un Smart Phone (Kuntzleman y Jacobson, 2016. Journal of chemical education)

### Introducción:

La espectrofotometría es utilizada para identificar compuestos por su espectro de absorción y conocer la concentración de un material o sustancia, seguir el curso de reacciones químicas y enzimáticas así como determinar enzima y proteínas incluso ácidos nucleicos.

El experimento que se propone permite a los estudiantes realizar un análisis de la Ley de Beer con la cámara de un teléfono celular. El protocolo, configuración, recopilación de datos y análisis son rápidos y simples. Sin embargo, la realización de esta experiencia permite explorar cualitativa y cuantitativamente conceptos y ecuaciones involucradas en la espectrometría de absorción.

En la espectrometría de absorción, la luz se dirige a través de una muestra y la fracción de luz que pasa a través de la misma es medida, como se muestra en la imagen.



La cantidad de luz absorbida, o absorbancia,  $A$ , se define como:

$$A = -\log(I/I_0)$$

Donde  $I$  es la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra e  $I_0$  es la intensidad de la luz transmitida a través de un blanco.

Para estimar el color de luz que es absorbida por la especie química en solución, es útil utilizar una rueda de colores como se muestra en la figura. Esta aproximación se hace utilizando el color opuesto al color observado del compuesto.



Por ejemplo, si una especie en particular aparece verde en solución, probablemente absorbe muy bien la luz roja.

Como detector de luz se utiliza la aplicación del teléfono celular, Color Meter Free, la cual se puede descargar desde la Play Store.

Para colocar la muestra a analizar se pueden utilizar cubetas, tubos de ensayo e incluso vasos de plástico transparentes.



### **Materiales:**

- Muestras de pigmentos vegetales (diluciones obtenidas en la actividad 1)
- Teléfono celular con la aplicación Color Meter Free.
- Cubeta de espectrofotómetro (o vaso transparente)
- Fondo rojo (hoja canson, cartulina, pantalla de computadora o celular)
- Caja de cartón (opcional)

### **Procedimiento:**

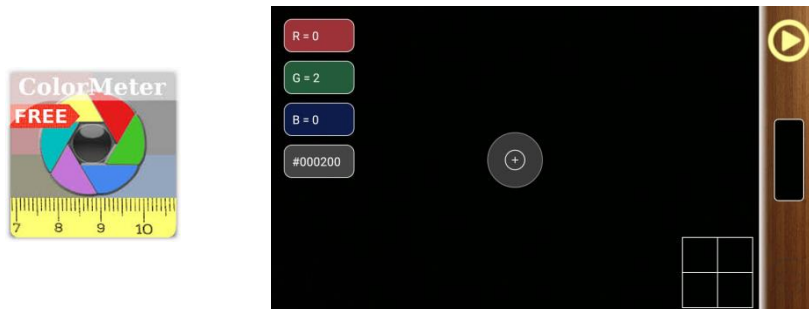
- 1-** Tomar las diluciones seriadas del filtrado de remolacha (cada una en su tubo de ensayo o vasito transparente)
- 2-** Cortar un rectángulo de cartulina roja para utilizar de fondo.
- 3-** Armar el sistema como se muestra en la imagen. El fondo debe ser rojo, las diferentes muestras se deben colocar siempre a la misma distancia (distancia 2), se recomienda marcar el lugar en donde se colocará el tubo. La toma con el celular también debe estar siempre a la misma distancia de la muestra y respetar el ángulo de la captura de la imagen. Para ello se recomienda utilizar algún tipo de soporte (se puede hacer con cartón).



**Opcional:** Se puede tapar la muestra con una caja de cartón dejando una ranura para que la luz incida sobre la muestra.

#### 4- Determinación de la absorbancia.

1°- Abrir el analizador de imágenes del celular (Color Meter Free)

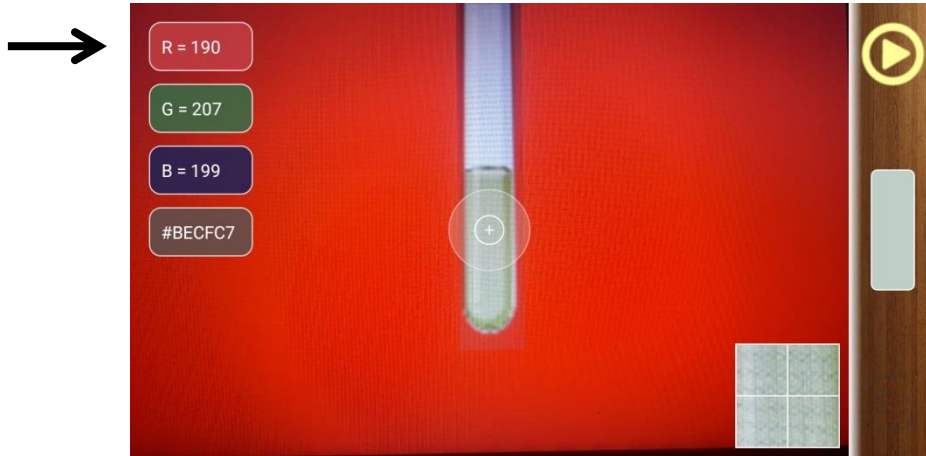


2°- Tomar un tubo y colocar alcohol 96% para utilizarlo como blanco ( $I_0$ ) y registrar el valor R de la luz que pasa a través del blanco.



3°- Tomar el tubo 1 y realizar la determinación. Registrar el valor R de la luz que pasa a través de la muestra, este será el valor I.





4°- Calcular la absorbancia de la muestra utilizando la fórmula:

$$\mathbf{A = -\log (I/I_0)}$$

\*Por ejemplo:

$$A = -\log (190/225)$$
$$A = 0,073$$

5°- Repetir para cada tubo. Registrar los valores de R y calcular la absorbancia.

**5-** Analizar los resultados. Comparar los valores de absorbancia con el color observado en cada una de las muestras.

**NOTA:** En este caso no contamos una curva patrón para comparar y calcular concentraciones ya que estamos trabajando con extractos de pigmentos vegetales. La cuantificación de clorofila se realiza en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm.