

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE CLOROFILA Y CROMATOGRAFÍA

OBJETIVO: Extraer diferentes pigmentos, de productos vegetales, así como la identificación de estos.

MATERIALES

- Mortero
- Tijeras
- Espinacas u hojas verdes
- Embudo con papel de filtro
- Tubos de ensayo en gradilla
- Éter etílico
- Alcohol metílico puro (cuidado, sus vapores son muy tóxicos)
- Capsula de Petri o vaso de precipitados
- Capilar o micropipeta (cuentagotas en su defecto)
- Tira de papel cromatográfico WathmAN



INTRODUCCION

Los cloroplastos poseen una mezcla de pigmentos con diferentes colores: clorofila-a (verde intenso), clorofila-b (verde), carotenos (amarillo) y xantofilas (amarillo anaranjado) en diferentes proporciones.

FUNDAMENTO

Todas estas sustancias presentan un grado diferente de solubilidad en disolventes apolares, lo que permite su separación cuando una solución de las mismas asciende por capilaridad a través de una tira de papel poroso (papel de cromatografía o de filtro) dispuesta verticalmente sobre una película de un disolvente orgánico (etanol), ya que las mas solubles se desplazaran a mayor velocidad, pues acompañaran fácilmente al disolventes a medida que este asciende. Las menos solubles avanzaran menos en la tira de papel de filtro. Aparecerán, por tanto, varias bandas de diferentes colores (hasta siete o más, dependiendo del material utilizado) que estarán más o menos alejados de la

disolución alcohólica según la mayor o menor solubilidad de los pigmentos. Estas bandas poseerán diferente grosor, dependiendo de la abundancia del pigmento en la disolución.

TECNICA

1. Colocar en un mortero trozos de hojas de espinacas lavadas, quitando las nervaduras más gruesas, junto con 10 o 15 cc de éter etílico.
 2. Triturar sin golpear hasta que el líquido adquiriera una coloración verde intensa (utilizar campana de gases a lo largo de toda la práctica).
 3. Filtrar en un embudo con papel de filtro y recoger en un tubo de ensayo (es suficiente con 2 o 3 cc. de solución de pigmentos).
 4. Colocar en la tapadera de una caja de Petri metanol absoluto hasta una altura de 0.5 a 1cm.
 5. Cortar una tira de papel de filtro de unos 8 cm de anchura y unos 10 a 15 cm de altura.
 6. Poner con el capilar en el papel de cromatografía entre 5 y 10 gotas de solución de pigmentos, espaciadas en el tiempo con el fin de que vaya secándose el éter etílico y aumente la cantidad de pigmentos. Las gotas se pondrán siempre en el mismo punto (se puede marcar con un lápiz), situado a unos 2 cm por encima del borde inferior del papel.
 7. Doblar el papel cromatográfico a lo largo y colocarlo en la placa de petri con la mancha de pigmento a 1 cm de la superficie del eluyente. Podemos sustituir la placa petri por un vaso de precipitados y fijar el papel cromatográfico con una pinza a un soporte horizontal colocado en el borde del vaso (por ejemplo, una varilla de vidrio).
 8. Espera unos 30 minutos y observar.
- Repite el mismo procedimiento con otro vegetal.



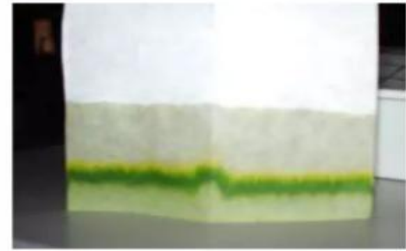
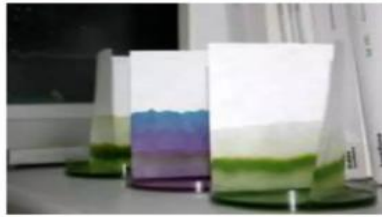
PROCEDIMIENTO SEGUIDO POR EL EQUIPO

1. Identificamos el material necesario para realizar el material y fueron las espinacas y el betabel.
2. Empezamos a cortar cada uno de los vegetales para meterlos al mortero para ir machacando los vegetales previamente ir poniendo 2.0ml de éter etílico en cada uno de los vegetales que se fueran machacar para lograr una consistencia y extraer el color de los vegetales.
3. Posteriormente de machacar con el mortero los vegetales vaciar la sustancia extraída con el mortero se vacío éter etílico a un tubo de ensayo de tal manera que se logre extraer el colorante de los vegetales y se haga junto con el éter etílico el machacado.
4. Después de ello se lograron dos tipos de sustancias una de color verde que era la de las espinacas y otra color roja que es la del betabel.
5. Se tuvo dificultad para lograr extraer el colorante del betabel debido a que es un vegetal que absorbe todo pero se logró.
6. Consecutivamente se agregaron 5 gotas de cada uno de los colorante extraídos para hacer la separación de los pigmento con alcohol etílico.
7. Del mismo modo se agregaron cerca de 5cm de alcohol etílico en un vaso de precipitado para hacer la separación y colgar el papel cromatografico.
8. Se colgaron en una base cerca del alcohol etílico para lograr una separación y se tocó solo un poco con el papel de cromatografía el alcohol etílico.
9. **Se observó la degradación de pigmento y se observó anteriormente se estaba cuidando cada 10 minutos durante media hora la reacción.**



RESULTADOS

Se obtuvieron los pigmentos del betabel y espinacas:



Se logro la extraccion de pigmentos de acuerdo al nivel de color que se presenta contunacion y identificamos lo siguiente:

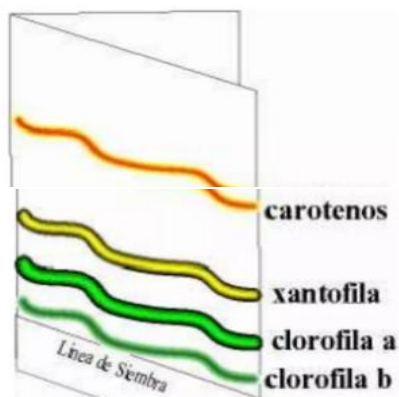
PIGMENTO	COLOR
Clorofila A	Verde azulado
Clorofila B	Verde amarillento
Carotenos	Naranja
Xantofilas	Amarillo

En primer lugar al romper las células en el mortero los pigmentos que se hallaban encerrados en los cloroplastos dentro de ellas pasan al alcohol. En la disolución extraída del vegetal tendremos tantos pigmentos como bandas coloreadas aparezcan en la cromatografía. Al observar el papel vemos 4bandas que corresponden a los distintos pigmentos fotosintéticos presentes en las hojas del vegetal usado, que en orden de menor a mayor solubilidad en etanol son la clorofila b, clorofila a, xantofila y carotenos

OBSERVACIONES

Al observar el papel donde hemos hecho la cromatografía, vemos cuatro bandas o zonas, que corresponden a los distintos pigmentos fotosintéticos presentes en las hojas de espinaca. Según su grado de solubilidad con el éter de petróleo se reconocen estas bandas y en este orden:

- clorofila b
- clorofila a
- xantofila
- carotenos



Esta técnica de separación se basa en la diferente solubilidad de los pigmentos en el alcohol. En primer lugar al romper las células en el mortero los pigmentos que se hallaban encerrados en los cloroplastos dentro de ellas pasan al alcohol. En numerosas ocasiones uno de los pigmentos es más abundante y enmascara a los demás que no se pueden observar. La separación se produce en la hoja de papel de filtro colocada sobre la placa , ya que el pigmento más soluble en el alcohol será el que forme una banda coloreada en la parte superior del papel y el menos soluble en alcohol será el último en ascender a través del papel. En la disolución extraída del vegetal tendremos tantos pigmentos como bandas coloreadas aparezcan en la cromatografía.

CONCLUSIONES

En esta práctica se aprendió que los vegetales tienen diferentes tipos de clorofila y que esos son los pigmentos que la conforman, del mismo se aprendió a distinguir diferentes tipos de colores y a utilizar aspectos importantes en el laboratorio que nos van dejar buenos aprendizajes para bioquímica.

Entre todos los caracteres más externos de los vegetales, el más notable y característico es probablemente el color. El color no es únicamente un carácter llamativo de la vegetación, sino que, además, algunos de los pigmentos que lo condicionan están estrechamente ligados a las actividades fisiológicas del propio vegetal. Por consiguiente, el estudio de cómo las plantas viven y se desarrollan requieren el previo conocimiento de los pigmentos vegetales

LOS CLOROPLASTOS

Los cloroplastos deben su color verde a un pigmento denominado clorofila. Sin embargo, lo que en realidad existe en los cloroplastos es una mezcla de pigmentos representados principalmente por dos tipos de clorofila (clorofila a y clorofila b), por β caroteno y por xantofila. Todas estas sustancias presentan un grado diferente de solubilidad, lo cual permite su separación cuando una solución de la misma asciende por capilaridad por una tira de papel poroso (papel de filtro), ya que las más solubles se desplazarán a mayor velocidad, pues acompañarán fácilmente al disolvente a medida que éste va ascendiendo. De esta forma, al cabo de cierto tiempo, a lo largo del papel de filtro se irán situando los distintos pigmentos en forma de bandas coloreadas, tanto más desplazadas cuanto más solubles sean los pigmentos a que pertenecen y tanto más anchas cuanto mayor sea la abundancia de estos en la mezcla.

¿Dónde están los pigmentos?

Estos pigmentos se encuentran en el interior de la células vegetales específicamente en una organela llamada cloroplasto . Los cloroplastos son simplemente plástidos que contienen pigmentos clorofílicos. Los compuestos clorofílicos están ligados químicamente con las estructuras internas del cloroplasto (membrana tilacoides) y se hallan retenidos en estado coloidal. Asociados con las clorofilas, existen también en los cloroplastos dos clases de pigmentos amarillos y amarillo-anaranjados que son los xantofilas y carotenoides.

CUESTIONARIO

1. La solubilidad en alcohol de los pigmentos es, de mayor a menor: carotenos, clorofila a, clorofila b y xantofila. Indicar que pigmento corresponde a cada banda.

Las bandas naranjas son los carotenos y las amarillas son las xantofilas, estas van por arriba de la clorofila.

2. ¿Por qué empleamos éter etílico para extraer la clorofila?

3. ¿Qué pigmentos son los más abundantes?

4. Por encima de las clorofilas aparece más de una banda ¿Qué significado tiene?

5. Explica el proceso de separación por cromatografía en papel.

6. Explica que es el beta-caroteno. Cuáles son los beneficios de su consumo.