

Trabajo Práctico B101 Biología General

Práctico de Espectrofotometría.

Extracción de clorofila

1- Introducción

La espectroscopia surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda (λ). En un principio se refería al uso de la luz visible dispersada según su longitud de onda, por ejemplo por un prisma. Más tarde el concepto se amplió enormemente para comprender cualquier medida en función de la longitud de onda o de la frecuencia.

¿En que consiste la espectrometría UV-Visible?

La **espectrometría** UV-Vis es la técnica espectroscópica que permite medir la concentración o la cantidad de especies determinadas utilizando un **espectrofotómetro**. Este método es utilizado para medir cuanta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra, basándose en la Ley de Beer-Lambert. Esta medición también puede usarse para medir la cantidad de un producto químico conocido en una sustancia.

El estudio de la interacción de la luz (u otra radiación electromagnética) con la materia es una herramienta importante y versátil para la ciencia. En los últimos años los métodos espectrofotométricos se han convertido en importantes métodos de análisis cuantitativo. Son aplicables a muchos problemas industriales y clínicos relacionados con la determinación de compuestos. En todas las ramas de la biología molecular, la medicina y las ciencias de la vida, el espectrofotómetro es una ayuda esencial para la investigación y el control de rutina.

Para poder comprender el fundamento de la técnica revisaremos los conceptos de espectro electromagnético y el funcionamiento del espectrofotómetro.

El espectro electromagnético

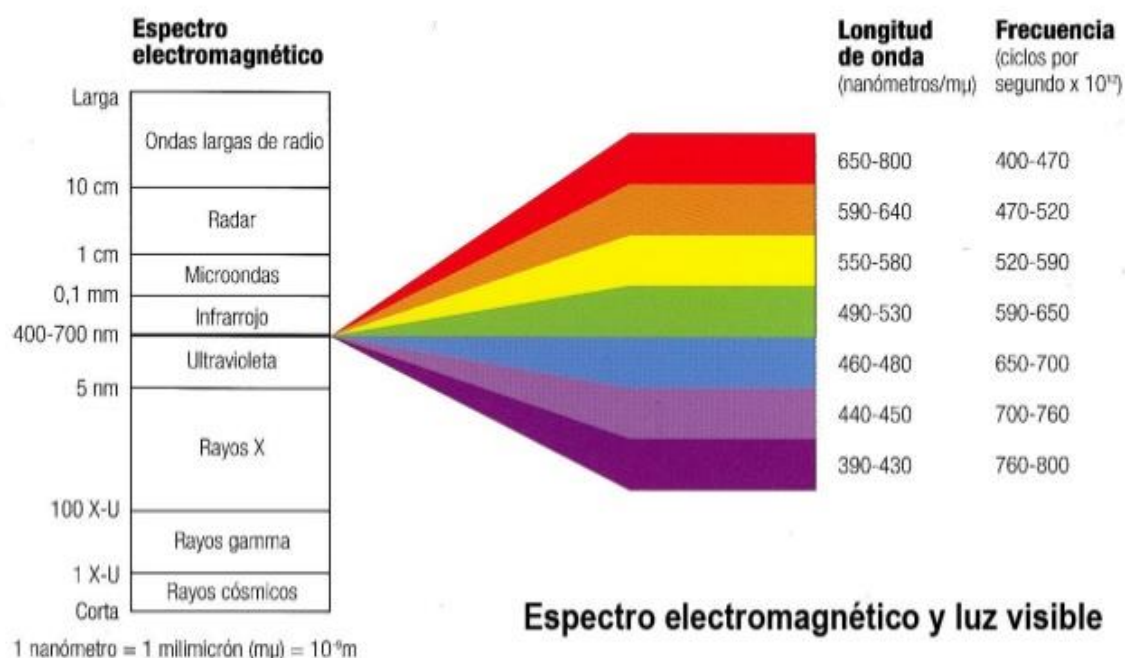
El espectro electromagnético (EM) es el rango de todos los tipos de radiación EM. La radiación es la energía que viaja y se extiende a medida que se esparce – la luz visible que viene de una lámpara y las ondas de radio que vienen de una estación de radio son dos tipos de radiación electromagnética. Los otros tipos de radiación EM que componen el espectro electromagnético son las microondas, la luz infrarroja, la luz ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma.

A diferencia de otros tipos de ondas, las ondas electromagnéticas no necesitan un medio para viajar, las ondas electromagnéticas pueden moverse a través de un vacío a $3,00 \times 10^8$ m/s, “la velocidad de la luz”. Se sabe que la velocidad de cualquier onda es el producto de la longitud de onda y la frecuencia, y puesto que la velocidad de la luz es constante, la longitud de onda (λ) y frecuencia (ν) debe ser inversamente proporcional.

-A longitud de onda más corta, mayor es la frecuencia.

-Cuanto mayor sea la longitud de onda, menor será la frecuencia.

La gama de longitudes de onda de radiación electromagnética se llama espectro electromagnético y se extiende de longitudes de onda muy cortas (rayos cósmicos) a longitudes de onda muy largas (ondas térmicas), la radiación electromagnética visible (luz blanca) es una región muy pequeña del espectro electromagnético que se extiende desde 750 nm a aproximadamente 350 nm.



Espectrofotómetro

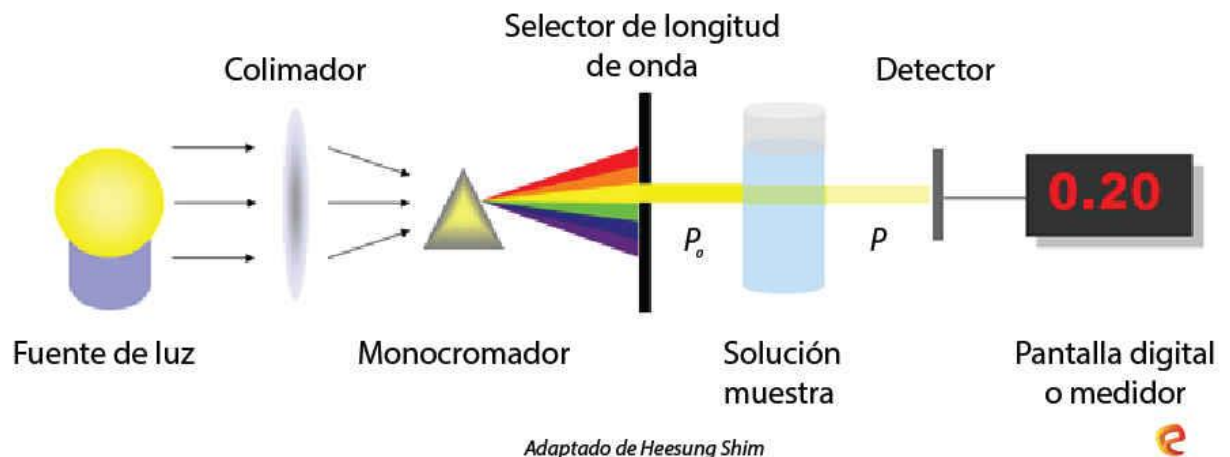
El **espectrofotómetro** es un instrumento para medir la intensidad de luz absorbida después de pasar a través de una solución muestra.

Con el **espectrofotómetro**, la cantidad de una sustancia química conocida (concentraciones) puede determinarse midiendo la intensidad de la luz detectada. Dependiendo del rango de longitud de onda de la fuente de luz, se puede clasificar en dos tipos diferentes:

- Espectrofotómetro UV-Visible utiliza luz en el rango ultravioleta (185 – 400 nm) y rango visible (400 – 700 nm) de espectro de radiación electromagnética.

- Espectrofotómetro de infrarrojos: utiliza luz en el espectro de infrarrojos (700 – 15,000 nm) del espectro de radiación electromagnética.

La estructura básica de los espectrofotómetros consiste en una fuente de luz, un colimador, un monocromador, un selector de longitud de onda, una cubeta para la solución muestra, un detector fotoeléctrico y una pantalla digital o un medidor.



El espectrofotómetro, en general, consta de dos dispositivos; un espectrómetro y un fotómetro. Un espectrómetro es un dispositivo que produce, dispersa y mide la luz. Un fotómetro tiene un detector fotoeléctrico que mide la intensidad de la luz.

Espectrómetro: Produce un rango deseado de longitud de onda de luz. Primero un colimador (lente) transmite un haz recto de luz (fotones) que pasa a través de un monocromador (prisma) para dividirlo en varias componentes de longitudes de onda (espectro). Entonces un selector de longitud de onda (ranura) transmite sólo las longitudes de onda deseadas.

Fotómetro: Después de que el rango deseado de longitud de onda de luz pasa a través de la solución muestra en la cubeta, el fotómetro detecta la cantidad de fotones que se absorbe y luego envía una señal a un galvanómetro o una pantalla digital.

Los espectros de absorción de luz visible pueden tomarse en cualquier material que sea visiblemente claro. El poliestireno, el cuarzo, y las células de borosilicato (Pyrex), son los materiales más usados. La luz ultravioleta es absorbida por la mayor parte de cristales y plásticos, por lo que se usan células de cuarzo.

Transmitancia y absorbancia

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple: $I_0 = I_a + I_t$

La transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_o , y se representa normalmente en tanto por ciento: $\% T = I_t/I_o \times 100$

La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$, en consecuencia: $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_o$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_o = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$.

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste.

IMPORTANTE: Para utilizar un espectrofotómetro hay que preparar una serie de diluciones con concentración conocida. Una de estas muestras no contendrá soluto y es conocido como el "BLANCO". Se usa para ajustar el instrumento para leer transmitancia del 100 % o 0 de absorbancia.

3-Desarrollo de la práctica

Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

Los pigmentos fotosintéticos son elementos indispensables en la absorción de luz y, por tanto, en la fotosíntesis. El más importante es la Clorofila a (Cla), de distribución universal en la fotosíntesis oxigénica. Además, los organismos fotosintéticos poseen una serie de "pigmentos accesorios" que participan, con la Cla del proceso de recepción de luz y transferencia de energía a los centros de reacción. El equipo pigmentario de las plantas vasculares terrestres contiene Clorofila b (Clb) y carotenoides, además de Cla.

La siguiente práctica tiene como objetivo extraer y cuantificar los pigmentos mencionados. Para esto, utilizaremos 2 hojas de 2 tipos de plantas distintas: una planta de sombra y otra de sol. Posteriormente se comparará ambos resultados para ver si hay discrepancias.

-Materiales:

Hoja de planta de sol y otra hoja de planta de sombra.

Mortero.

Solución de Acetona.

MgCO₃.

Papel de filtro.

Probeta.

Tubo de 15 ml.

Espectrofotómetro.

-Extracción:

1. Se colocan 0.3 gramos de cada hoja y se colocan en el mortero.

2. Se añaden 10 ml de solución de acetona previamente neutralizada con MgCO_3 , y se aplasta y frota las hojas hasta que esté totalmente homogéneo. Una vez que este homogéneo, se filtra a través de 2 capas de papel de filtro, que se recogerá en una probeta. El volumen final ha de ser de 15 ml, así que se irá añadiendo más solución de acetona hasta alcanzar los 15 ml necesarios. Se almacenará en un tubo, el cual evitará pérdidas de líquido por evaporación. Este paso se realizará para la planta de sol y para la planta de sombra.

-Determinación de picos de absorción:

3. Para realizar la cuantificación de los pigmentos que se quiere hacer un barrido en las longitudes visibles colocando el espectro en la función **“spectrum”**. La misma nos permitirá realizar un barrido de longitudes de onda y determinar en cuales absorbe nuestra muestra.

4. Colocar el blanco de reactivos en la primer celda y la muestra a medir en la segunda celda

5. Configurar los siguientes parámetros:

- Modo de medición (A, %T, E).
- Rango de las exploraciones de λ . Ingresar la λ inicial y final del escaneo.
- Velocidad de escaneo de λ . (rápido: 0,05s; medio: 0,2s; lento: 0,5s; muy lento: 2,0s)

6. Determinar los picos de absorción.

-Resultados y discusión.

La clorofila α absorbe las longitudes de ondas correspondiente al violeta, azul, anaranjado-rojizo, rojo y pocas radiaciones de las longitudes de onda intermedias. La clorofila absorbe la energía solar para iniciar el ciclo fotosintético, la principal propiedad fisicoquímica responsable de esto es la elevada absorbancia que presenta la clorofila en el intervalo de longitudes de onda entre 400nm y 700nm. La molécula de clorofila a puede absorber un fotón de estas longitudes de onda al excitar un electrón de los que ocupan los orbitales moleculares que forman dobles enlaces conjugados $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}=\text{N}$ de la estructura central que rodea al átomo de magnesio.

La presencia de un grupo CH_3 o CHO en uno de los anillos diferencia a la clorofila α y β , respectivamente. La presencia de este grupo funcional altera ligeramente la estructura y energía de los dobles enlaces conjugados, dando lugar a espectros de absorción distintos para cada clorofila. La clorofila α en disolución presenta máximos de absorción en alrededor de 430 nm y 662 nm, mientras que la clorofila β los presenta en 453 nm y 642 nm. La posición exacta de estos máximos depende del disolvente que se utilice.

-Uso del Espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis:



Advertencias y precauciones

- _ Utilizar siempre guantes cuando manipule las celdas.
- _ Las celdas solo pueden tomarse de los lados opacos, no de las partes transparentes.
- _ Para lavar las celdas, desechar la muestra en un recipiente adecuado, lavarla con abundante agua destilada, luego con etanol y por último dejar la celda secar sobre papel antes de guardarla.
- _ Utilizar papel tissue para adsorber la humedad remanente de las celdas. No frotarlas por ningún lado.
- _ No usar teléfonos móviles cerca del equipo, pueden dañar la información.
- _ Cuando esté realizando las mediciones la cubierta del equipo siempre debe estar cerrada. Cualquier radiación externa puede afectar las mediciones.

Preguntas a resolver

- 1- ¿En qué consiste el blanco de reactivos?
- 2- ¿Cuáles son los criterios para seleccionar la longitud de onda a la cual se realizarán las mediciones?
- 3- ¿Qué tipo de moléculas pueden ser analizadas por espectrofotometría de absorción?
- 4- ¿Cuál es el rango de lectura del equipo utilizado?
- 5- ¿A qué atribuye la presencia de dos picos en el espectro de absorción?