

# ***Trabajo Práctico***

## ***Fotosíntesis***

***B101***

### **Biología General**

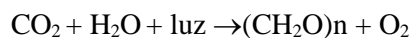
La fotosíntesis es el proceso por medio del cual las plantas (y algunos otros organismos) llevan a cabo la síntesis de moléculas orgánicas (hidratos de carbono) partiendo de una fuente de energía (la luz), una fuente de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua. Estos hidratos de carbono son utilizados como fuente de nutrientes y por ello a los organismos con esta capacidad de les denomina autótrofos.

#### **La fotosíntesis en eucariontes procede en dos etapas**

**Etapa lumínica o reacciones que captan energía:** es un proceso dependiente de la luz. La energía de la luz es necesaria para fabricar moléculas portadoras de energía: ATP y NADPH. Estos productos participan en la producción de azúcares durante la segunda etapa.

**Etapa de fijación del carbono o Ciclo de Calvin- Benson:** los productos de la primera etapa son los que aportan la energía necesaria para el CO<sub>2</sub> ambiental sea fijado en hidratos de carbono.

Ecuación general de la fotosíntesis:



En los organismos eucariontes (plantas y algas), la fotosíntesis ocurre en los **cloroplastos**. Estas organelas poseen una doble membrana. En el interior del cloroplasto se encuentra el *estroma*, una solución gelatinosa densa rica en enzimas, que embebe a los *tilacoides*, membranas con forma de saco aplanado o disco, delimitando una cavidad denominada *lumen* o *espacio tilacoide*. Los tilacoides se apilan para formar los *granum* o *grana*. La etapa lumínica ocurre en la membrana de los tilacoides mientras que la fijación del carbono se lleva a cabo en el estroma de los cloroplastos (Imagen 1).

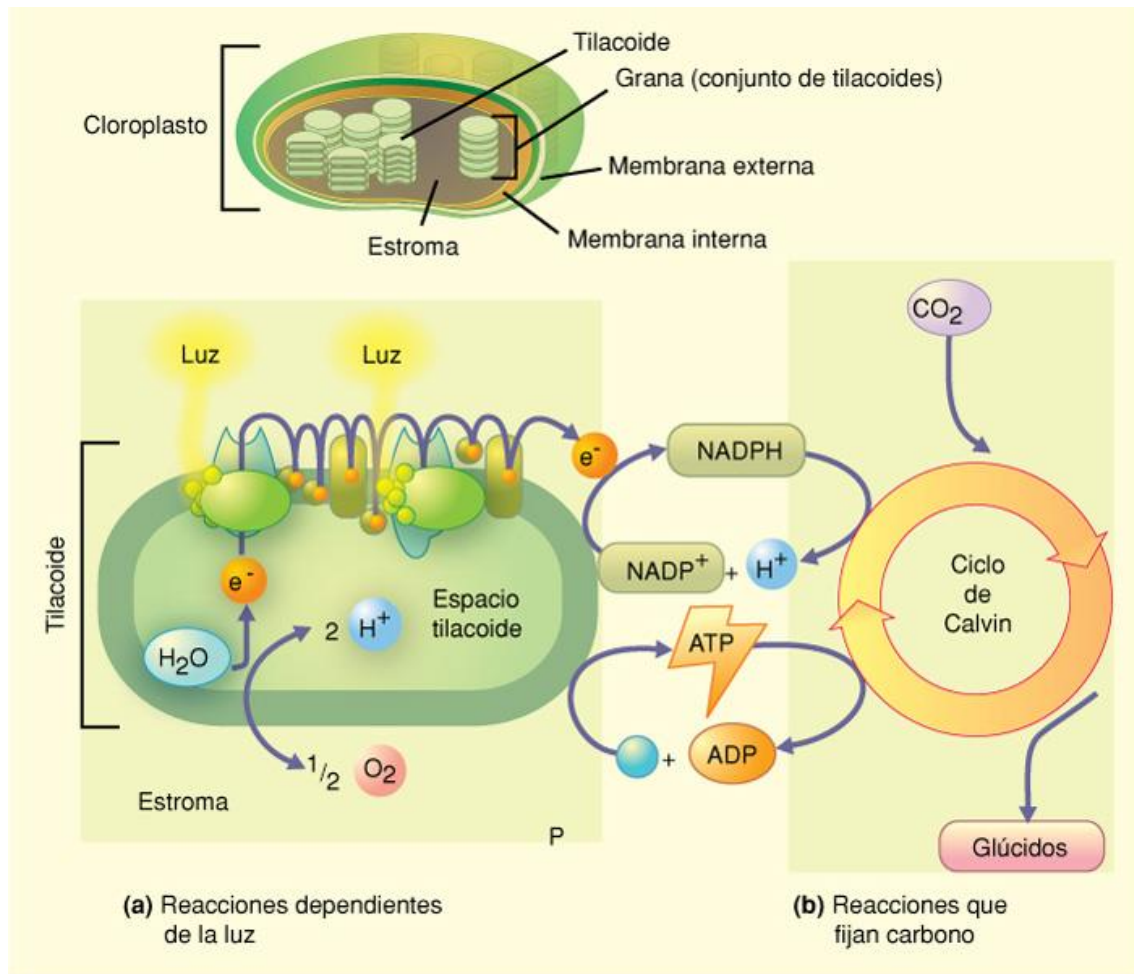


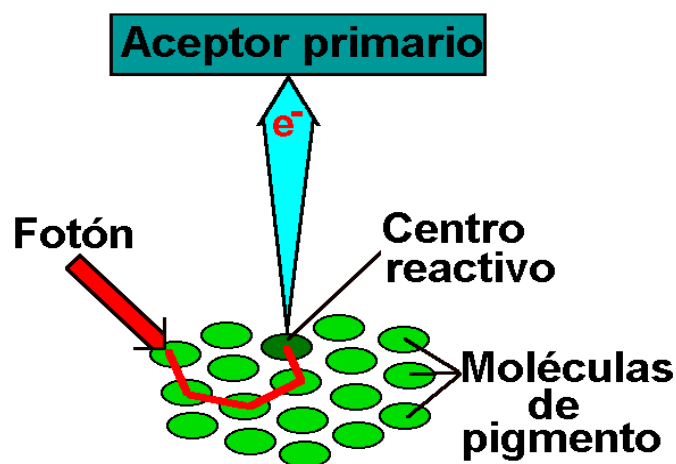
Imagen 1 (Curtis Biología-7ª Edición)

Los procariontes fotosintéticos (por ejemplo las cianobacterias) tienen tilacoides que son proyecciones internas de la membrana plasmática que contienen los compuestos necesarios para la fotosíntesis.

### Etapa lumínica

Las membranas tilacoides son ricas en pigmentos, como por ejemplo la clorofila. Un pigmento es cualquier sustancia capaz de absorber luz. En la etapa lumínica, un *quantum* de luz o *fotón* es absorbido por una molécula de clorofila. Cuando una molécula de clorofila absorbe un quantum de luz, un electrón es lanzado a un nivel energéticamente superior. A partir de ese momento se desencadena un proceso de transporte de electrones que transforma la energía lumínica captada por los pigmentos en moléculas de  $ATP$  y  $NADPH$ . El electrón que ha sido excitado es reemplazado por uno proveniente de la escisión de la molécula de agua, y se libera oxígeno como producto secundario de la reacción.

Los **fotosistemas** son conjuntos de moléculas de clorofila y otros pigmentos y proteínas transmembrana empaquetados en los tilacoides. Cada fotosistema tiene un centro de reacción fotoquímico que contiene una molécula de **clorofila a** y otras moléculas que participan en las reacciones de oxidoreducción del transporte de electrones. En el fotosistema I, la molécula de clorofila a tiene un pico de absorción de 700 nanómetros, se la denomina P<sub>700</sub>. En el fotosistema II el pico de absorción de la clorofila a es 680 nm y se conoce como P<sub>680</sub>. Muchos procariontes tienen un solo fotosistema: el **fotosistema II** (si bien fue el primero en la evolución, fue el segundo en descubrirse, de allí el II). Los eucariontes usan el **fotosistema II** más el **fotosistema I**.



La **fotofosforilación** es el proceso global de transformación de la energía almacenada en el electrón del centro reactivo excitado por la luz, en un enlace pirofosfato de una molécula de ADP (Imagen 2). Cuando un fotón es absorbido por uno de los pigmentos del fotosistema II este rebota rápidamente por las demás moléculas hasta alcanzar la *clorofila a* en el centro de reacción. Cuando esta molécula absorbe la energía lumínica, un electrón es lanzado a un nivel energético superior y es transferido a otra molécula, un *aceptor primario de electrones*. La molécula de clorofila, al perder un electrón, se oxida y queda cargada positivamente, sin embargo este electrón es reemplazado por electrones que provienen indirectamente de la escisión de la molécula de H<sub>2</sub>O. La escisión del agua aporta los electrones necesarios y libera el oxígeno contenido en dicha molécula al ambiente. Los electrones pasan desde el aceptor primario (en el fotosistema II), a lo largo de una cadena de transporte de electrones, a un nivel de energía inferior hasta ser captados por el centro de reacción del fotosistema I. Cuando la molécula reactiva P<sub>700</sub> del fotosistema I atrapa un fotón de luz, se desencadena una cadena transportadora de electrones hasta llegar al NADP<sup>+</sup> para formar NADPH. El electrón eliminado del fotosistema I es reemplazado por el proveniente del fotosistema II. De esta manera se genera

un flujo continuo de electrones desde el H<sub>2</sub>O hasta el fotosistema II, desde este hasta el fotosistema I para llegar al NADP<sup>+</sup>. A medida que los electrones pasan por esta cadena de transporte, se forma un gradiente de protones que se acumulan en el espacio tilacoide y que luego impulsan la generación de moléculas de ATP al retornar al estroma a través del complejo ATP sintetasa (Imagen 2).

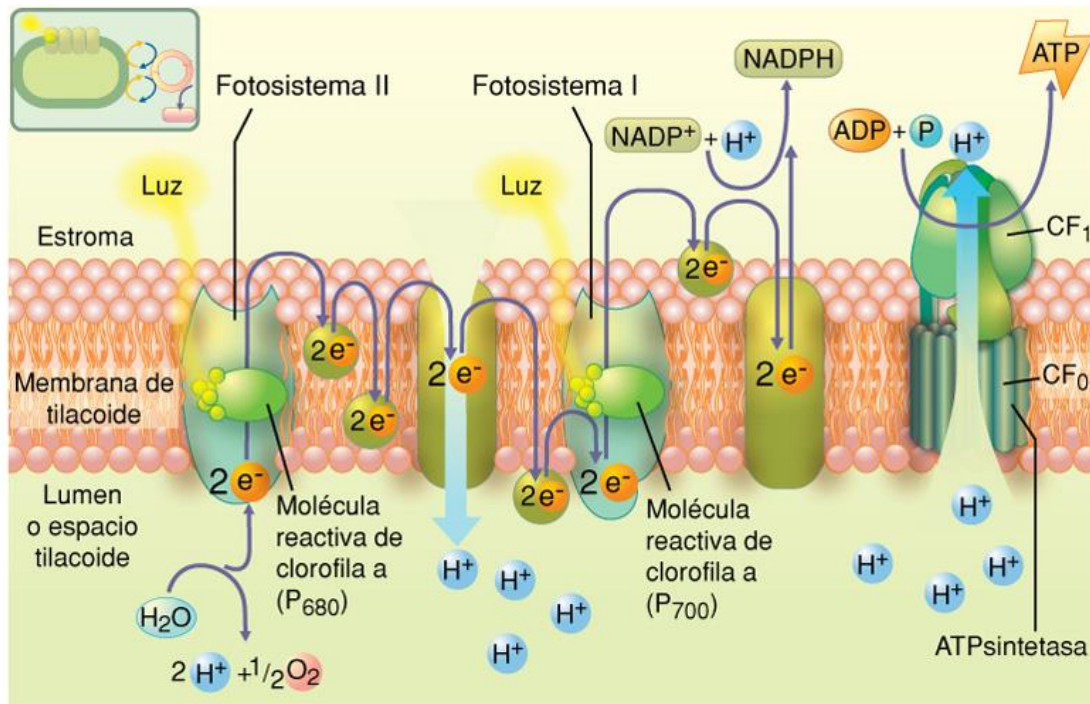


Imagen 2 (Curtis Biología-7º Edición)

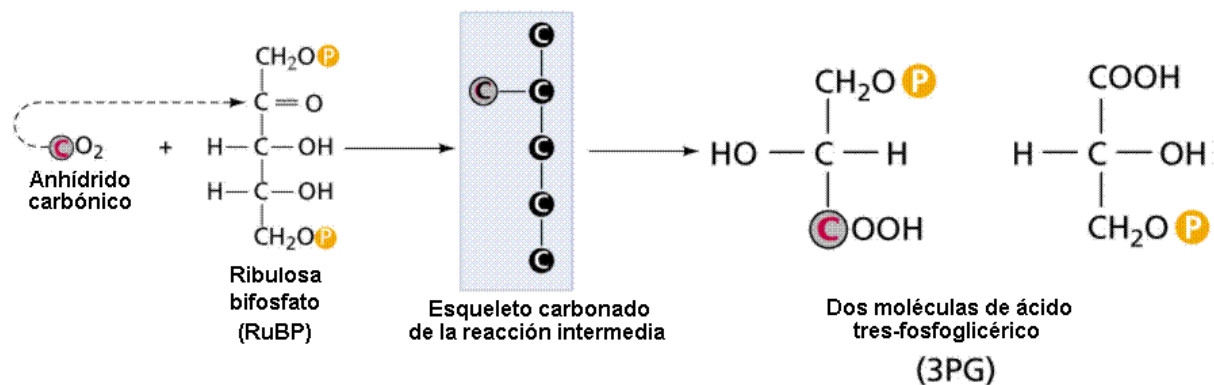
El fotosistema I puede trabajar en forma independiente del fotosistema II. Cuando esto ocurre, los electrones de P<sub>700</sub> son lanzados a una cadena de transporte pero no alcanzan como destino final al NADP<sup>+</sup>, sino que son reciclados a la molécula de clorofila desde donde salieron. En este transcurso de este pasaje se genera un gradiente de protones que actúa como fuerza motriz para la síntesis de moléculas de ATP. El flujo cíclico de electrones, que produce ATP pero no NADPH es una ruta alternativa que permite regular la cantidad de ATP y NADPH en presencia de luz según la necesidad de la planta.

Las halobacterias, una clase de arqueobacterias que se desarrollan en el agua saturada o casi saturada de sal, son aerobios facultativos por lo que pueden desarrollarse en ausencia de oxígeno. Estas bacterias pueden sobrevivir en ambientes salinizados, ya que tienen una vía separada de creación de energía aparte de la fotosíntesis. Poseen, en su membrana celular, el pigmento púrpura **retinal** que permite crear un gradiente de protones a lo largo de la membrana que actúa como fuerza motriz para la generación de moléculas ATP en ausencia de clorofila.

Este hecho apoya la idea que el proceso quimiosmótico es una forma universal de creación de ATP.

### Etapa de fijación del carbono: Ciclo de Calvin- Benson

El ATP y NADPH formados en la etapa lumínica se utilizan en la etapa de fijación del carbono para dar lugar a la formación de moléculas de hidratos de carbono  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ . La transformación del  $\text{CO}_2$  en un compuesto orgánico se conoce como **fijación del Carbono**. Para ello debe existir un primer paso de incorporación del  $\text{CO}_2$  por parte de los organismos fotosintéticos. Así, las algas toman directamente el  $\text{CO}_2$  que está disuelto en el agua circundante. Las plantas terrestres toman el  $\text{CO}_2$  del aire por medio de estructuras especializadas denominadas *estomas*, presentes en la superficie de las hojas y tallos verdes, que a través de sus poros permiten el intercambio gaseoso. La fijación del carbono ocurre en el *estroma* del coloroplasto en forma cíclica. El Ciclo de Calvin-Benson, denominado así por su descubridor, el químico estadounidense Melvin Calvin (1911-1997), comienza cuando el  $\text{CO}_2$  se une a una molécula de **ribulosa 1,5 bifosfato** (RuBP). La RuBP tiene cinco carbonos en su molécula. El producto de la unión del  $\text{CO}_2$  con RuBP forma un producto de seis carbonos que se escinde y forma dos moléculas de **fosfoglicerato** o PGA de tres carbonos, por lo que se conoce también con el nombre de vía de los tres carbonos:



La enzima que cataliza esta reacción es la RuBP carboxi-oxigenasa (**rubisco**), posiblemente la proteína más abundante sobre la tierra.

La energía almacenada en las moléculas de ATP y NADPH generadas en la etapa lumínica se usa para fosforilar el PGA y reducirlo a fosfogliceraldehido o PGAL, también de tres carbonos (Imagen 3).

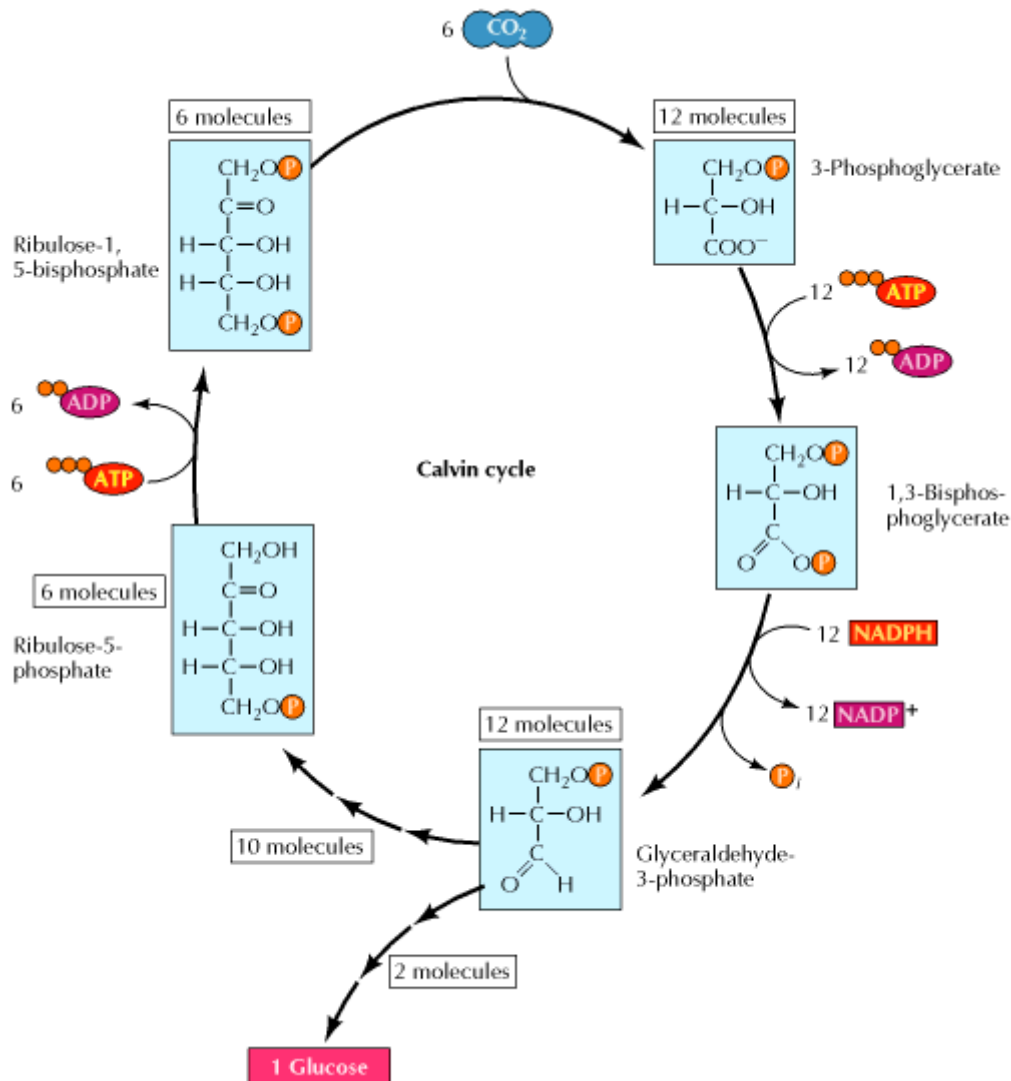


Imagen 3: Ciclo de Calvin-Benson.

Globalmente, 6 moléculas de RuBP se combinan con 6 de CO<sub>2</sub> para dar lugar a la formación de 12 moléculas de PGA. Del total de 12 moléculas transformadas, dos moléculas de PGAL salen del ciclo para convertirse en glucosa. Las 10 moléculas restantes de PGAL son convertidas por medio del ATP en 6 moléculas de RuBP (5 carbonos), que recomienzan el ciclo. A su vez, cada reacción del Ciclo es catalizada por una enzima específica. (Imagen 3).

### Fotorrespiración

La rubisco tiene una desventaja: tiene tanta facilidad para combinarse con el CO<sub>2</sub> para activar la formación de azúcar, como de combinarse con el O<sub>2</sub> para formar ácido glicólico, sustrato de la fotorrespiración o ciclo C<sub>2</sub>. Este proceso, usa moléculas de ATP y NADPH pero **libera** CO<sub>2</sub> en lugar de **fijarlo** (Imagen 4). Se produce en los peroxisomas y en las mitocondrias y está favorecido por temperaturas mayores a 28°C.

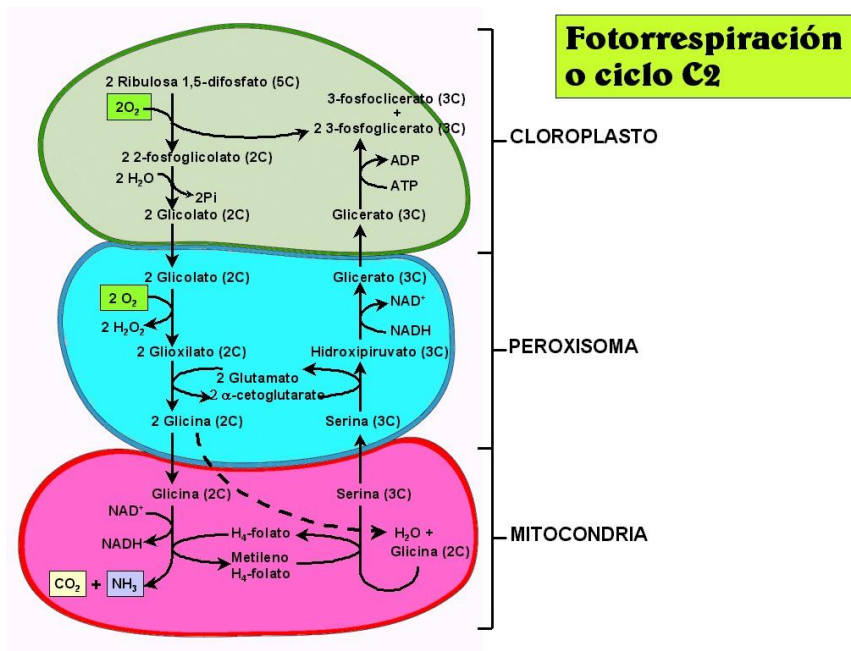


Imagen 4

### La vía de 4 Carbonos

Algunas plantas han desarrollado una etapa previa al Ciclo de Calvin para evitar la pérdida de eficiencia fotosintética debido a la fotorrespiración. En estas plantas, la fijación del CO<sub>2</sub> comienza en el citoplasma con la unión del mismo a fosfoenolpiruvato (PEP), molécula de tres carbonos, que se convierte en ácido oxálico de cuatro carbonos. Esta reacción es irreversible y es mediada por la enzima **PEP-carboxilasa**, que tiene mayor afinidad por el CO<sub>2</sub> que la rubisco. El ácido oxálico es convertido luego en ácido málico o aspártico, también de 4C (de aquí el nombre de vía de los 4 carbonos). Las plantas en las cuales se lleva a cabo esta vía tienen una organización anatómica particular (Imagen 5). Las reacciones de la PEP-carboxilasa ocurren en las células del mesófilo de las hojas. El ácido málico pasa a las células de la vaina fascicular (nivel mayor de profundidad en la hoja) donde se desdobra nuevamente en PEP y CO<sub>2</sub>, que entra finalmente en el ciclo de Calvin, mientras que el PEP vuelve a las células del mesófilo. La glucosa formada puede ser transportada rápidamente al resto de la planta. Este proceso separa físicamente la captura de CO<sub>2</sub> de las reacciones del Ciclo del Calvin e involucra gasto de ATP.

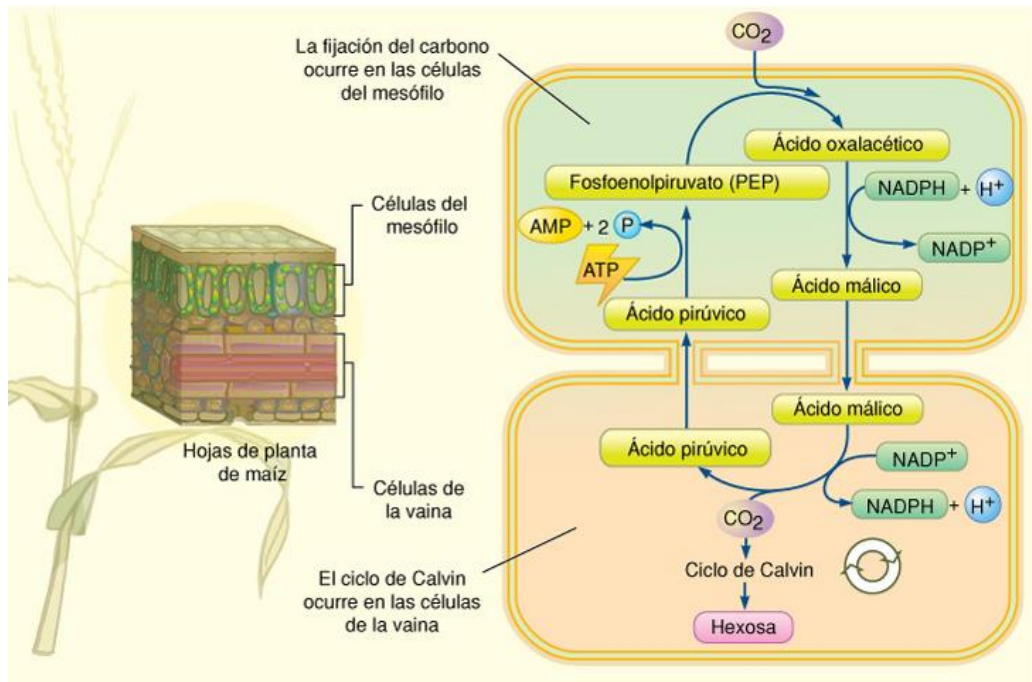


Imagen 5 (Curtis Biología-7ª Edición)

Las plantas que usan la vía de 4 carbonos, o plantas C<sub>4</sub>, crecen muy juntas, y deben ajustarse a la disminución de CO<sub>2</sub> que este hecho implica, es decir, tienen menor “acceso” al CO<sub>2</sub> del aire que les rodea. Para solventar este inconveniente las plantas llevan a cabo este paso previo de fijación del CO<sub>2</sub> de manera de generar un aumento localizado de la concentración de CO<sub>2</sub> en las células de la vaina disponible para entrar en el Ciclo de Calvin-Benson.

### Plantas CAM

En condiciones de extrema sequedad, ciertas plantas abren los estomas por la noche y los mantienen cerrados durante el día, mecanismo que impide la excesiva pérdida de agua por la transpiración. De esta manera las plantas se protegen de la desecación pero a la vez impiden el intercambio gaseoso necesario para la fotosíntesis durante el día. Por ello, muchas plantas de ambientes secos cuentan una vía metabólica llamada *metabolismo ácido de las crasuláceas* o fotosíntesis CAM. Esta ruta metabólica, si bien fue investigada en principio en especies de la familia Crasulaceae, se ha detectado en numerosas especies de otros grupos vegetales, que comparten la característica de ser **suculentas**, es decir de hojas gruesas, y suelen encontrarse donde el agua es escasa o de difícil acceso. Estas plantas poseen la vía de los cuatro carbonos, pero a diferencia de las plantas C<sub>4</sub>, donde la separación es espacial entre las células del mesófilo y de la vaina del haz, en las plantas CAM la separación es temporal: el CO<sub>2</sub> es incorporado durante la noche, donde la evapotranspiración es mínima, y reacciona con el PEP formando ácido málico que se almacena en las vacuolas, lo que hace descender el pH citosólico durante la noche (de allí el nombre *metabolismo ácido*). Durante el día, con los estomas cerrados, las



vacuolas liberan el ácido málico que luego es descarboxilado y el CO<sub>2</sub> así liberado se incorpora al Ciclo de Calvin-Benson.

### **Protección de las plantas contra el sol**

El proceso fotosintético es más eficiente con niveles intermedios de luz solar. A pleno sol, especialmente a mediodía, las plantas absorben mucha más energía de la que pueden usar. Si no encuentran una forma de dispersar la energía de una manera segura la clorofila pasa a un estado hiperexcitado, desde el cual su energía puede transferirse al oxígeno dando como resultado "oxígeno singulet", un potente oxidante, que puede causar daño indiscriminado a la planta e inclusive su muerte. Entre los mecanismos antioxidantes para protección de las plantas se encuentran:

- los carotenoides, otros pigmentos, son capaces de detoxificar a la planta del "oxígeno singulet" capturando su energía y disipándola en forma de calor.
- atenuación no fotoquímica de la energía solar, proceso en el cual interviene una proteína que se encuentra asociada al fotosistema II conocida por las siglas PsbS.

## ***Trabajo de Laboratorio.***

### **Materiales:**

- tres vasos de precipitado, uno de 1000 mL y dos de 500 mL
- un tubo de ensayo de 15 mL
- elodeas (*Egeria densa*)
- agua
- marcador de pH (azul de bromotimol: 0,1g en 100 mL de alcohol etílico al 20%)
- pipetas de vidrio
- fuente de luz
- papel aluminio

### **Fundamento del práctico**

El azul de bromotimol es un ácido orgánico débil derivado del trifenilmetano. A pesar de su nombre, el azul de bromotimol puede adoptar diferentes colores. Puede ser de color amarillo o fucsia (sobre una solución ácida) y verde o azul (en una solución básica). Es un indicador usado especialmente para determinar el pH en zonas próximas al pH=7, ya que posee un intervalo de viraje del amarillo al azul entre valores 6 y 7,6.

En el TP, cuando insuflamos aire pulmonar rico en CO<sub>2</sub>, al entrar en contacto el dióxido de Carbono con el agua se forma ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), de forma que desciende el pH y el indicador vira al amarillo.

Al colocar la planta y permitir que realice fotosíntesis, se consumirá CO<sub>2</sub> del agua, haciendo que el pH aumente, y el indicador vire hacia un color amarillo-verdoso.

### **Actividad**

Coloque agua de la canilla en un vaso de precipitado hasta los 600 ml, luego agregue 5 ml de azul de bromotimol. Con la pipeta insufla aire en el agua hasta que el indicador de pH vire de color. Una vez que el mismo se torne amarillento divida el agua en tres partes, dos de 295 ml aprox. y la tercera de alrededor de 10 ml en un tubo de ensayo (este será su control de pH). Coloque un racimo de elodeas dentro de cada vaso de precipitado.

A continuación rotule un vaso de precipitado como control y el otro como experimental, el tubo de ensayo déjelo a la luz hasta el final.

- Grupo control:

Tome el frasco y protéjalo de la luz con el papel aluminio

- Grupo experimento:

Tome el frasco y expóngalo a la luz por un lapso de 20-30 minutos.

### **Preguntas**

1. ¿Qué sucede en cada caso? (grupo control, experimental y tubo de ensayo)
2. ¿A qué atribuye usted el cambio?
3. ¿Qué prueba este experimento?