

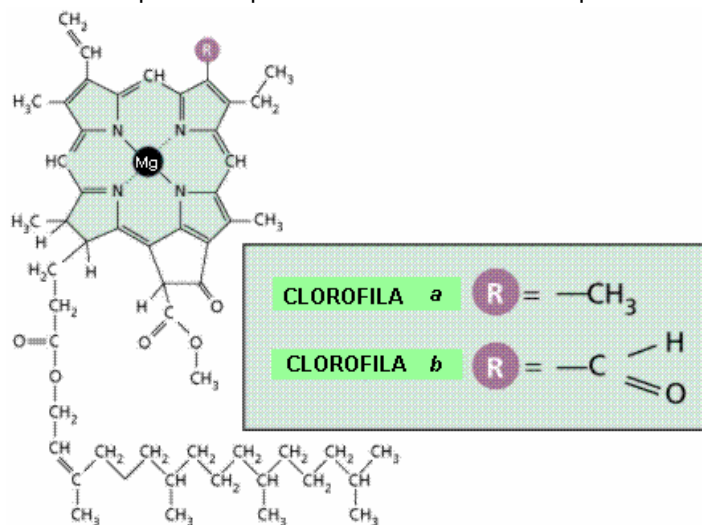
## FOTOSÍNTESIS

### INTRODUCCIÓN

La vida en la tierra depende fundamentalmente de la energía solar, la cual es transformada a energía química mediante el **proceso fotosintético**, que es responsable de la producción de toda la materia orgánica como lípidos, carbohidratos, proteínas, etc.

En este proceso son muy importantes los pigmentos fotosintéticos, entre los cuales se encuentran las clorofilas( a , b , c , d ) los carotenoides (carotenos y xantofilas ) y las ficobilinas. Los pigmentos fotosintéticos que se encuentran en plantas son: clorofila a, clorofila b, y xantofilas y carotenos.

La fotosíntesis es un proceso que ocurre en dos fases. La primera fase es un proceso que depende



de la luz (**procesos primarios**), requiere la energía directa de la luz que culmina con la generación de NADPH y ATP que son utilizados en la segunda fase.

La fase independiente de la luz (**procesos secundarios**), se realiza cuando los productos de las reacciones de luz son utilizados para formar enlaces covalentes carbono - carbono, de los carbohidratos.

La fotosíntesis está sometida a la influencia de las condiciones ambientales en el que se encuentra el vegetal.

### 1. REACCIÓN DE HILL

En 1937 Robert Hill demostró que **cloroplastos aislados producen oxígeno en ausencia de CO<sub>2</sub>**. Este descubrimiento fue uno de los primeros indicios de que la fuente de electrones en las reacciones de la fase clara de la fotosíntesis era el agua. En su sistema *in vitro*, Hill usó un aceptor artificial de electrones.

La ecuación general de la reacción de Hill.



Donde A es el aceptor artificial de electrones en su forma oxidada y AH<sub>2</sub> es su forma reducida.

Formalmente la reacción de Hill se describe como la **fotoreducción de un aceptor artificial de electrones por los hidrógenos del agua, con liberación de oxígeno**. En cloroplastos aislados un método conveniente para evidenciar la reacción de Hill es usar como aceptor artificial de electrones un reactivo que cambie de color una vez reducido, como el **2,6 diclorofenol indofenol**, que en su forma oxidada es azul y en su forma reducida es incoloro.

En el siguiente experimento verificaremos la reacción de Hill y determinaremos la importancia de los cloroplastos y la luz para que ocurra la reacción.

### Materiales:

- ❖ Extracto de cloroplastos mantenido en frío en solución de sacarosa 0.5 M
- ❖ 1 gradilla
- ❖ 3 tubos de ensayo
- ❖ 3 pipetas de 5ml
- ❖ 1 vaso de precipitado de 250 ml
- ❖ 1 propipeta
- ❖ 2,6 diclorofenol indofenol
- ❖ agua destilada
- ❖ 1 lámpara con ampolleta de 100 W
- ❖ 1 trozo de papel de aluminio de 25x10 cm

### Procedimiento

Prepare 3 tubos de ensayo según las instrucciones que aparecen en la tabla 1. Y expóngalos a la condición ambiental indicada. Observe cada 2 minutos hasta que note algún cambio en el tubo 1, luego compare el color con el de los otros tubos y registre su resultado final.

**Es importante que el extracto de cloroplastos original sea mantenido en frío.**

Tabla 1. Volumen de cada reactivo en ml.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Extracto de cloroplastos	1	1	0
DCPIP	5	5	5
Agua destilada	1	1	2

Condición	LUZ	OSCURIDAD	LUZ

## 2. SEPARACIÓN DE PIGMENTOS FOLIARES POR CROMATOGRAFÍA

### Introducción

La captación de la energía lumínica en el proceso de fotosíntesis es realizada por pigmentos fotosintéticos, en los organismos fotosintéticos eucariontes dichos pigmentos se encuentran insertos en membranas de los cloroplastos.

Todos los eucariontes fotosintetizadores y algunos organismos procariontes, como las algas cianofíceas, contienen **clorofila a**, que es esencial para el tipo de fotosíntesis que realizan estos organismos. En las plantas, en las algas verdes y en las algas euglenófitas se encuentra además **clorofila b**. En otros organismos la clorofila b es reemplazada por otros tipos de clorofila., las diatomeas y algas café contienen clorofila a y c, y en las algas rojas existe clorofila a y d.

Además de las clorofilas hay otros pigmentos accesorios que participan en el proceso de fotosíntesis, son los llamados **carotenoides**. Los carotenoides son pigmentos liposolubles de color rojo, anaranjado o amarillo que se encuentran en todos los organismos fotosintéticos, al igual que las clorofilas se encuentran adosados al sistema de membranas de los plastidios. Los carotenoides

que no contienen oxígeno son llamados **carotenos**, y los que sí tienen se llaman **xantófilas**. Los carotenoides actúan como pigmentos fotosintéticos accesorios, sin embargo su rol principal es servir como agentes fotoprotectores del aparato fotosintético.

Dado que los pigmentos fotosintéticos presentan distintas solubilidades y peso molecular, es posible separarlos mediante la técnica de cromatografía.

Para realizarla primero se debe obtener un extracto de pigmentos fotosintéticos, destruyendo el tejido, y los cloroplastos en presencia de un solvente orgánico. Luego se puede proceder a separar los pigmentos presentes en la muestra mediante su solubilidad diferencial.

## Materiales

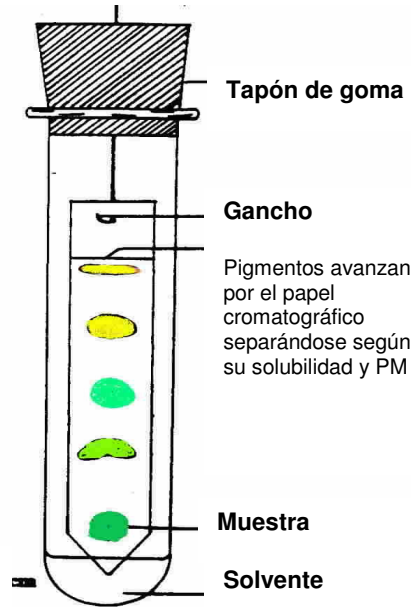
- ♣ 1 probeta de 100 ml con tapón de goma
- ♣ 1 alfiler
- ♣ 1 pipeta Pasteur o capilar
- ♣ 2 tiras de papel cromatográfico
- ♣ 2 vasos de precipitado
- ♣ 1 mortero
- ♣ 2 pipetas de 5 ml
- ♣ 1 propipeta
- ♣ tiza o carbonato de calcio
- ♣ arena de cuarzo (opcional)
- ♣ hojas de espinaca
- ♣ etanol o acetona
- ♣ toluol
- ♣ embudo
- ♣ papel filtro
- ♣ soporte universal, nuez y pinza
- ♣ secador de pelo o ventilador
- ♣ alusa plas

## Procedimiento

1. Lave y seque las hojas de espinaca y macérelas en un mortero con etanol 90% o con acetona. Agregue un poco de carbonato de calcio para mantener el pH, y arena de cuarzo para facilitar el macerado. Filtre el extracto.
2. Inserte el alfiler en el tapón de goma y dóblelo para colgar en él la tira de papel cromatográfico, corte la tira de papel de manera que al quedar colgada quede del largo de la probeta. Marque una línea con lápiz de grafito a 2 centímetros del extremo inferior del papel cromatográfico.
3. Prepare la cámara cromatográfica colocando 3 ml de toluol en la probeta, ponga inmediatamente el tapón de goma y selle con alusa plas. Deje que se establezca el sistema unos 10 minutos mientras realiza la aplicación de la muestra.
4. En el centro de la línea que realizó en la tira de papel cromatográfico aplique una gota del extracto, seque completamente con el ventilador y agregue otra gota del extracto en el mismo punto. Repita este procedimiento hasta completar 20 gotas. Trate de mantener constante el diámetro de la gota **ES IMPORTANTE QUE SEQUE BIEN ENTRE APLICACIONES**.
5. Cuelgue la tira de papel del gancho e introdúzcala en la probeta cuidando de no toque las paredes y que la mancha no toque el toluol. Asegure el tapón y selle con alusa plas. Deje el sistema cerrado y observe la migración de los pigmentos. Debería demorar unos 30 minutos.

6. Una vez lograda la separación, saque la tira de papel y marque el lugar alcanzado por el solvente. Seque el papel y marque el centro de la mancha correspondiente a cada pigmento e identifíquelo.
7. Mida la distancia recorrida por cada pigmento y calcule su Rf.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el pigmento}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$$



Esquema una cromatografía en papel

### Preguntas.

- 1.- ¿Por qué fue necesario usar un solvente orgánico para extraer los pigmentos?
- 2.- Busque las estructuras de los pigmentos fotosintéticos de plantas. Explique porqué dichos pigmentos se encuentran asociados a membranas. Destaca las diferencias entre la clorofila a y b, y entre xantófilas y carotenos.
- 3.- El toluol (tolueno) es un solvente apolar. Investigue las características de solubilidad y peso molecular de los pigmentos fotosintéticos de plantas y explique el orden de migración obtenido en esta cromatografía.
4. Explique qué relación existe entre el valor de Rf y la solubilidad de cada pigmento.
- 5.- Investigue qué son los complejos antena y los centros de reacción y qué rol tienen en ellos los pigmentos estudiados.

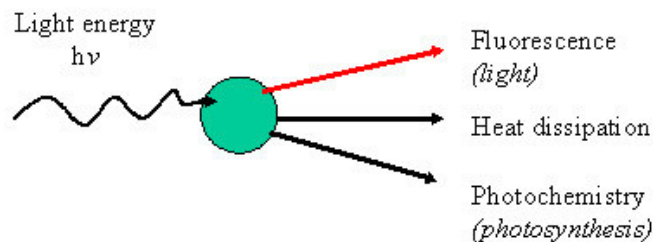
### Conceptos a Estudiar

- Características de los pigmentos fotosintéticos de plantas
- Técnica de cromatografía

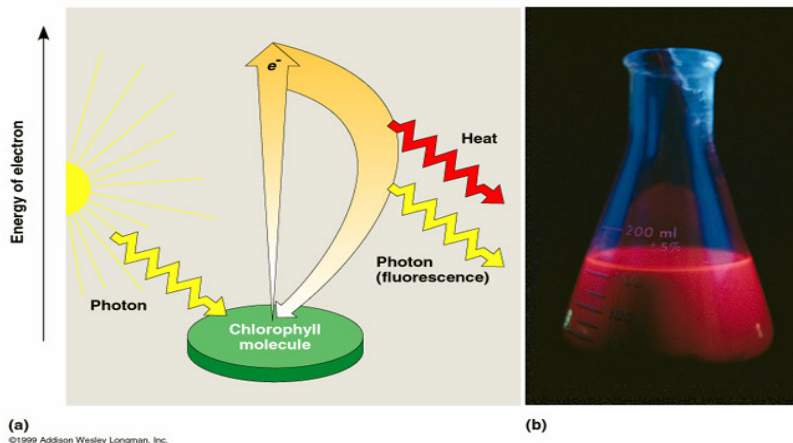
### 3. FLUORESCENCIA DE UN EXTRACTO FOLIAR

#### Introducción:

Cuando la clorofila absorbe energía luminosa pueden ocurrir tres cosas: 1) que la energía sea atrapada y convertida en energía química como en la fotosíntesis, 2) que se disipe como calor, 3) que sea emitida inmediatamente como una longitud de onda mayor con pérdida de energía como fluorescencia. La clorofila es capaz de disparar una reacción química cuando se encuentra asociada a proteínas inmersas o embebidas en la membrana de los tilacoides de los cloroplastos, o en las membranas plegadas que se encuentran en organismos procariotes fotosintéticos.



En esta experiencia se observará la fluorescencia de un extracto foliar



#### Procedimiento

- Filtre el extracto inicial del experimento anterior (realizado en acetona).
- Ponga 1 ml del extracto foliar filtrado en un tubo de ensayo y agregue 4 ml de eter de petróleo agite suavemente y deje en tubo en la gradilla hasta que se separen dos fases.
- Exponga el tubo a la lámpara de luz ultravioleta y anote sus observaciones.
- Saque el tubo de la luz y observe.

---

**Preguntas:**

- ¿El fenómeno observado es una emisión de fosforescencia o de fluorescencia? Fundamente en base a sus observaciones.
- Investigue cuál es la explicación científica para la emisión de fluorescencia y de fosforescencia.
- Explique qué ocurre en el tubo de ensayo observado por usted.
- ¿Por qué la fluorescencia del extracto foliar debería ser más notoria que la fluorescencia en una hoja o en una planta intacta?
- Existen instrumentos para medir la fluorescencia en cultivos o en otras plantas en terreno. ¿Con qué objetivo se realizan tales determinaciones (aplicaciones)?

**NOTA IMPORTANTE:** esta semana cada grupo deberá sembrar Habas para el laboratorio de auxinas.