

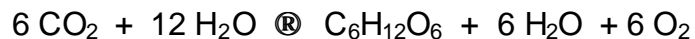
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO EN PONCE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Laboratorio de Biología General I (Biol 3013)

Ejercicio # 8: Fotosíntesis

INTRODUCCION

Al estudiar los organismos encontramos diferencias entre sus modos nutricionales. Existen organismos capaces de sintetizar su propio alimento partiendo de compuestos inorgánicos (autótrofos) y aquéllos que no pueden producirlos y dependen de las moléculas orgánicas producidas por otros organismos para ellos alimentarse (heterótrofos). Una de las estrategias más comunes utilizada por los organismos autótrofos (ej. plantas), es la fotosíntesis. La **fotosíntesis** es un proceso complejo de reacciones químicas (trayectos metabólicos), mediante el cual las plantas, algas y cianobacterias convierten energía radiante (ej. luz solar) en energía química (ej. glucosa), usando como materia prima moléculas inorgánicas (ej. agua y bióxido de carbono) y una fuente externa de energía radiante.



El proceso de fotosíntesis ocurre principalmente en las hojas de las plantas en los cloroplastos Fig. 1. El **cloroplasto** es un organelo de membrana doble y en forma de lente. En su interior posee un conjunto de sacos membranosos llamados **tilacoides** y cada uno tiene en su interior una cavidad llena de fluido llamada espacio tilacoidal. La membrana del tilacoide posee moléculas de **clorofila**, un pigmento de color verde que absorbe la energía en forma de luz necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis, y que también es responsable por la coloración verde de las hojas. Los tilacoides están arreglados en pilares, torres o paquetes de tilacoides llamados **grana** y están rodeados por un fluido denso llamado **estroma**. Cada una de estas zonas provee condiciones diferentes esenciales para la fotosíntesis (Ver Libro de Texto).

La fotosíntesis se divide en dos fases. La primera fase, **reacciones dependientes de luz**, ocurren en la membrana de los tilacoides, rompiendo moléculas de agua y liberando oxígeno, electrones, iones de Hidrógeno, produciendo NADPH y ATP. La segunda fase, **reacciones independientes de luz**, ocurre en el estroma en donde se fijan los átomos de carbono provenientes del CO₂, se producen azúcares, se consume ATP y se oxida al NADPH, liberando NADP⁺.

Para las reacciones dependientes de luz, se necesitará luz visible, algunas veces llamada luz blanca. Sin embargo, la luz visible no es blanca, sino que es un espectro de ondas electromagnéticas ó combinación de ondas de distintos colores. La luz visible es una fuente de energía que viaja a través del espacio mediante ondas de distintos largos (Fig. 8.6, Pág. 179). El largo de onda, (medida de la distancia entre dos

crestas de la onda), también conocido como **lambda (λ)**, puede variar en tamaño desde nanómetros (nm) hasta kilómetros (Km). Sin embargo, los largos de onda de la luz visible importantes para la fotosíntesis, son desde 380nm hasta 750nm (Fig. 8.6). Según el largo de onda (λ) cambia de tamaño, también cambia el color de la luz. La energía en forma de luz es transportada en paquetes llamados fotones, (**fotón** - partículas de energía que componen la luz). Es importante destacar que la cantidad de energía transportada por la luz visible cambiará de acuerdo al largo de onda a menor largo de onda mayor cantidad de energía es transportada. Como consecuencia, podemos esperar que el proceso de fotosíntesis varíe según el largo de onda utilizado.

En este ejercicio, se extraerán los pigmentos fotosintéticos de una hoja y se estudiarán sus características. También, determinaremos cuales son los largos de onda de luz visible que favorecen a la fotosíntesis y que le sucede a la producción de almidón en ausencia de luz. Por último, observaremos los cambios químicos que ocurren durante la absorción de CO₂.

OBJETIVOS

- Al finalizar este ejercicio de laboratorio, se espera que los estudiantes:
- puedan reconocer y entender la ecuación química que resume a la fotosíntesis.
 - puedan extraer y separar los pigmentos fotosintéticos de una planta.
 - determinen los largos de onda de la luz que influyen en mayor grado a la fotosíntesis.
 - determinen los efectos de la falta de luz en la producción de almidón en una hoja.

MATERIALES Y EQUIPO

- papel de aluminio
- papel de cromatografía (pre-cortado)
- vasos de precipitado (250 mL)
- mortero
- tubos capilares
- espectrofotómetro (+ cubetas)
- lámpara con bombilla de alta intensidad
- lámpara de luz ultra violeta
- Coleus (verguenza)
- cristal de reloj ó placa petri grande
- cámara de cromatografía (tubo de cristal, corcho con presilla)
- éter de petróleo / acetona 80% (9/1)
- Elodea
- pinzas
- arena
- regla
- plato caliente
- metanol
- solución de Lugol
- rojo fenol (fresco)
- acetona 80%

Métodos

Procedimiento # 1: Identificación de Pigmentos Fotosintéticos.

La energía radiante (ej. luz) es atrapada en la célula vegetales por sustancias que absorben luz llamadas **pigmentos**. El tipo de pigmento más abundante es la clorofila el cual es de color verde. Sin embargo, existen otros pigmentos de otros colores (**pigmentos accesorios**), cada uno absorbiendo luz a un largo de onda distinto (Tabla 8.I). De esta manera, plantas con varios pigmentos maximizan la absorción de luz a distintos largos de onda.

Tabla 8.I. Pigmentos fotosintéticos.

Pigmento	Color que se vé	Color que se absorve
Clorofila	amarillo verdoso	
Clorofila a	verde azul	
xantófilos	amarillo mostasa	
carotenos	amarillo, anaranjado	

Para poder extraer los pigmentos del interior de la célula, utilizaremos hojas de la planta *Coleus* (vergüenza) la cual será macerada en un mortero con la ayuda de arena (opcional) y un solvente orgánico. Una vez filtrado el extracto de pigmentos, utilizaremos una técnica sencilla llamada cromatografía de papel, para separar los pigmentos disueltos en un solvente de acuerdo a su solubilidad, polaridad, capacidad de adhesión y tamaño molecular.

Cromatografía en papel

- Obtenga una hoja de *Coleus* córtela en pedazos pequeños y colóquela en un mortero junto con un poco de arena (opcional) y 10mL de acetona al 80%. Macere la hoja lo más posible hasta obtener un extracto de pigmentos.
- Remueva del extracto, las partículas de hoja no maceradas.
- Obtenga un pedazo de papel de cromatografía, sujetándolo con unas pinzas o por las orillas y asegurándose de no tocar las partes más anchas. Esto evitará que la grasa de nuestras manos dañe los resultados.
- Con una regla y un **lápiz**, marque una línea a 2cm del borde del lado en forma triangular (línea de origen) y otra línea a 10cm de la primera línea (frente del disolvente).
- Utilizando un tubo capilar, coloque una línea de gotas del extracto de pigmentos sobre la línea de origen. Espere a que se seque por completo y repita entre 5 a 10 veces hasta tener una línea de pigmentos sólida y delgada sobre la línea de origen.
- En el lado opuesto a la línea de origen, perfore el papel con la presilla.

- Coloque la cámara de cromatografía sobre un lugar estable y añada 2mL de una solución 9 a 1 de éter de petróleo / acetona al 80%. Favor de no mover la cámara de cromatografía hasta terminar el experimento.
- Coloque el papel en la cámara de cromatografía de manera que solo la punta del papel (no el pigmento) entre en contacto con el disolvente.
- Espere a que el disolvente suba a través del papel hasta alcanzar la línea del frente del disolvente. Remueva el papel antes de que el disolvente alcance el final del papel y marque con lápiz hasta donde llegó el disolvente. Espere unos 5 minutos en lo que se seca el papel, y marque con lápiz el frente de cada pigmento.
- Observe su cromatograma bajo luz ultravioleta y marque con un **lápiz** los frentes del disolvente y demás pigmentos.
- Determine la distancia entre la línea de origen y hasta donde llegó el disolvente.
- Determine la distancia viajada por cada pigmento. Sustituya en la siguiente ecuación de Razón de flujo (R_f):

$$R_f = \frac{\text{distancia viajada por el pigmento}}{\text{distancia entre la línea de origen y el frente del disolvente}}$$

- Anote los resultados en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Resultados de la cromatografía en papel.

Color del pigmento con luz UV	R_f	Pigmento

Valores Teóricos para los R_f de los pigmentos

Xantófilos $R_f = 0.8$

Clorofila a $R_f = 0.5$

Clorofila b $R_f = 0.0$

¿Cuál pigmento viajó mayor distancia y por qué?

¿Por qué hubo que sacar el papel de cromatografía del disolvente al llegar a la línea del frente del solvente? ¿Qué hubiese sucedido con los pigmentos si no lo sacáramos?

¿Será posible tener un R_f mayor de 1? ¿Por qué si o por qué no?

Procedimiento # 2: Largos de onda de luz de mayor importancia para la clorofila.

Durante el día podemos observar cambios en el color de la luz solar. Esto se debe principalmente a cambios en la intensidad de los distintos largos de onda del espectro de luz visible. También sabemos que los distintos colores de luz varían tanto en el largo de su onda (λ) como en la cantidad de energía que transportan. Por lo tanto, podemos sospechar que no todos los largos de onda proveerán la misma cantidad de energía para la fotosíntesis y que a mayor diversidad de pigmentos en la célula, mayor variedad de largos de onda se absorberán.

- Obtenga tres o cuatro hojas de color verde únicamente de los alrededores de la Universidad. Corte en pedazos pequeños y colóquelas en un mortero con un poco de arena (opcional) y 30mL de acetona al 80%. Filtre el extracto de clorofila y descarte las partículas no maceradas.
- Utilizando el espectrofotómetro* calibrado con un blanco de acetona al 80%, comience a tomar la Absorbancia de su extracto a un largo de onda de 380nm y repita cambiando el largo de onda a intervalos de 25nm** hasta llegar a 780nm.
- * bajo supervisión del profesor ** recuerde recalibrar en cada (λ)
- Anote los resultados en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3. Absorbancia de la clorofila a distintos largos de onda.

X	largo de onda	Absorbancia	X	largo de onda	Absorbancia
1	380		10	605	
2	405		11	630	
3	430		12	655	
4	455		13	680	
5	480		14	705	
6	505		15	730	
7	530		16	755	
8	555		17	780	
9	580				

- Grafique los resultados utilizando Absorbancia vs. largo de onda y compare sus resultados con el espectro de absorción de la clorofila discutido en el capítulo 8 del libro de texto.

¿Cuáles colores o largos de onda favorecen a la fotosíntesis mediada por clorofila?

¿Cuáles colores o largos de onda no favorecen a la fotosíntesis mediada por clorofila?

Si su vecino deseara establecer una siembra de flores y le preguntara a usted que si el ponerle luz a las plantas de noche hace que las plantas crezcan más rápido. ¿Qué usted le diría? ¿Qué colores de luz le recomendaría si alguno?

Procedimiento # 3: Efectos de la luz y las moléculas de clorofila en la producción de almidón durante fotosíntesis.

Durante el proceso de fotosíntesis el producto principal lo son moléculas de carbono las cuales pueden ser almacenadas como almidón en la planta. Sin embargo, en periodos de oscuridad la planta continúa consumiendo energía y muchas veces degrada parte de las moléculas de carbono que ha producido (respiración celular).

Detección de almidón

Para determinar los aspectos de la luz en la producción de almidón:

- Obtenga una hoja que haya recibido luz por varias horas.
- Sumerja la hoja completa en agua hirviendo por 1 minuto.
- Pase la hoja a una solución de metano, hirviéndola por 3 a 5 minutos.
- Coloque la hoja en una placa Petri con un poco de agua y añada entre 10 a gotas de Lugol.
- Dibuje, describa y explique cualquier cambio de color en la hoja.

- Conserve la hoja para futura referencia.

Importancia de la luz

En ausencia de luz, no puede producirse azúcar o almidón en la hoja.

- Obtenga una hoja de Coleus que haya estado cubierta a mitad con papel de aluminio por dos o más días.
- Repita el procedimiento de la sección anterior hirviendo y tiñendo la hoja.
- Dibuje, describa y explique cualquier cambio de color en la hoja.



Procedimiento # 4: Absorción del CO₂ durante fotosíntesis.

El proceso de fotosíntesis utiliza como materia prima al bióxido de carbono (CO₂), agua y luz solar. La presencia de una planta producirá la absorción del CO₂ y la liberación de oxígeno. Si fomentamos a una planta acuática a fotosintetizar en un medio rico en CO₂ esperamos la fijación de carbono y la disminución del CO₂ en solución. Para reproducir estas condiciones lleve a cabo el siguiente procedimiento:

- Llene dos tubos de ensayo con una solución de rojo fenol diluido. (El rojo fenol es un indicador de pH el cual se torna amarillo en pH < 7 y permanece rojo a pH ≥ 7).
- Sople a través de un sorbeto suavemente en cada solución. El CO₂ de su aliento se disolverá en el agua y formará ácido carbónico el cual disminuirá el pH de la solución.



- Cuando el pH ha disminuido a menos de 7 la solución se tornará amarilla.
- Añada a uno de los tubos 5cm de Elodea a uno de los tubos y coloque ambos tubos a 50cm de una fuente de luz por un período de 45 minutos.
- Observe la reacción en los tubos y anote los cambios.

¿Que cambios ocurrieron en los tubos de ensayo y por qué?

Procedimiento # 5: Fluorescencia.

La luz reflejada por las moléculas de la clorofila es la del largo de onda correspondiente al verde. Sin embargo, no toda la luz que choca con los cloroplastos es reflejada, parte es absorbida y re-emitida en un largo de onda distinto, a este fenómeno se le llama **fluorescencia**.

- coloque un tubo de ensayo que contenga un extracto de clorofila frente a una bombilla y observe los cambios en coloración. Explique.

Bibliografía

Dolphin, Warren D. 1997. *Biology Laboratory Manual*. 4th Ed.

Mader, Sylvia S. 2000. *Inquiry into life, Laboratory Manual* 9th Ed.

Vodopich & Moore. 2002. *Biology Laboratory Manual*. 6th Ed.

Referencias en Internet

www.salonhogar.com

Esta separata fue revisada y editada en febrero 2004 por el Prof. David Forestier.