

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

LABORATORIO DE QUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS

Curso 2017-2018

EN EL LABORATORIO EL ESTUDIANTE DEBE ESTAR PROVISTO DE:

- **CUADERNILLO DE PRÁCTICAS**
- **CUADERNO DE LABORATORIO**
- **GAFAS DE SEGURIDAD**
- **BATA DE LABORATORIO**
- **GUANTES DE LATEX O SIMILARES**
- **MARCADOR PERMANENTE**
- **LAPIZ**

OBJETIVOS GENERALES:

El estudiante tras realizar las prácticas de laboratorio de Química de Biomoléculas ha de adquirir las siguientes competencias:

- 1.- Ser capaz de manejar modelos moleculares para la representación tridimensional de moléculas sencillas.
- 2.- Ha de saber relacionar la estructura de los compuestos orgánicos sencillos con sus propiedades físicas.
- 3.- Ha de ser capaz de encontrar la información necesaria en bases de datos, revistas científicas o libros, etc. para elaborar una memoria o informe.
- 4.- Ser capaz de interpretar, valorar y comunicar datos relevantes haciendo uso del lenguaje propio de la química orgánica.
- 5- Conocer las técnicas básicas empleadas en la manipulación, aislamiento, purificación y análisis de compuestos orgánicos y los riesgos asociados a su uso.

Para alcanzar los objetivos anteriores, los estudiantes realizarán cinco sesiones de tres horas de duración:

1	ESTEREOQUÍMICA DE LOS COMPUESTOS. MODELOS MOLECULARES	3 h
2	FUERZAS INTERMOLECULARES Y PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS	3 h
3	EXTRACCIÓN ÁCIDO-BASE. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE UN COMPUESTO SÓLIDO.	3 h
4	EXTRACCIÓN ÁCIDO-BASE. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE UN COMPUESTO LÍQUIDO	3 h
5	EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PIGMENTOS PROCEDENTES DE LAS HOJAS DE ESPINACAS	3 h

EVALUACIÓN:

La calificación obtenida en las prácticas de laboratorio supondrá el 15% de la calificación global de la asignatura. Para aprobar la asignatura es necesaria la asistencia a las cinco sesiones de laboratorio y haber obtenido al menos una calificación de 4 puntos sobre 10 en las prácticas de laboratorio.

Convocatoria ordinaria

Para la calificación final se considerarán las siguientes contribuciones:

- a) Asistencia, puntualidad, equipamiento adecuado, actitud y cumplimiento de las Normas de Seguridad (10%)
- b) Evaluación de las cuestiones previas y post-laboratorio planteadas. (20%)
- c) Diario de laboratorio, trabajo experimental y evaluación de los resultados obtenidos (30%).
- d) Examen escrito de cuestiones relacionadas con la preparación y desarrollo de las prácticas (40%). El alumno deberá superar esta prueba con un mínimo de 4 sobre diez para poder hacer la media con la nota de la evaluación continuada (apartados a, b y c). Dicha prueba escrita será la misma para todos los subgrupos y coincidirá con el examen teórico de la asignatura.

Convocatoria extraordinaria

En el caso de no superar la evaluación final en la convocatoria ordinaria, se repetirá el examen escrito, que hará media con la nota de la evaluación continuada de acuerdo con lo expuesto anteriormente. La fecha del examen coincidirá con la que la Facultad haya previsto para la parte teórica de la asignatura.

NORMAS DE SEGURIDAD PARA LA ESTANCIA EN EL LABORATORIO

Cuando un estudiante entre por primera vez en el laboratorio debe localizar: salida de emergencia, duchas de emergencia, lava-ojos, extintores y manta ignífuga.

Durante su estancia en el laboratorio, el alumno deberá ir provisto **obligatoriamente** de los siguientes elementos:

- Bata
- Gafas de seguridad
- Guantes de latex, nitrilo, etc.

Las siguientes normas son de **obligado y estricto cumplimiento**:

- 1) Utilice las taquillas para dejar abrigos y mochilas.
- 2) Queda terminante **prohibido consumir alimentos** en el laboratorio.
- 3) La bata y las gafas de seguridad **deberán usarse en todo momento** durante la estancia en el laboratorio. **No se permitirá el acceso al laboratorio de alumnos que no dispongan o no hagan uso de los objetos descritos.** Los guantes deberán usarse siempre durante la manipulación de los productos.
- 4) Las lentes de contacto pueden resultar muy peligrosas en caso de salpicaduras accidentales a los ojos. En tales casos, se recomienda el uso de gafas graduadas o de gafas de seguridad especiales.
- 5) Deben utilizarse embudos de vidrio para el trasvase de líquidos. Si han de usarse pipetas, utilícense las peras de goma apropiadas. **No pipetear jamás líquidos con la boca.**
- 6) **Ciérrense los frascos de reactivos y disolventes inmediatamente después de su uso.** Evítese la inhalación de vapores tanto de sólidos como de líquidos. Todos los reactivos han de manejarse exclusivamente en vitrina.
- 7) **No deberán manipularse jamás productos o disolventes inflamables en la proximidad de mantas y placas calefactoras. Si algún líquido o sólido se derrama en cualquier lugar del laboratorio, se deberá limpiar inmediatamente de la forma adecuada.**
- 8) **Los disolventes orgánicos no deben calentarse nunca directamente sino por medio de baños de agua alejados de la fuente de calor y siempre en matraces Erlenmeyers o tubos de ensayo, nunca en vasos de precipitados.**

- 9) **No deben verterse residuos en las pilas**, deberán tratarse adecuadamente o almacenarlos en los lugares adecuados. **No debe tirarse material de vidrio roto en las papeleras**. Se depositará en los recipientes adecuados.
- 10) Dado que se usa material eléctrico (mantas, reguladores, etc.) es necesario **mantener perfectamente limpio y seco el puesto de trabajo y el material asignado**. La manipulación de cualquier elemento de dicho material deberá hacerse con el aparato en cuestión a temperatura ambiente y desconectado de la red.
- 11) **No tener jamás en marcha mantas o placas calefactoras en vacío**, es decir, sin un recipiente (vaso, matraz, etc.) al que calentar.
- 12) **En los montajes de reflujo y destilaciones deberá añadirse el germen de ebullición ("plato poroso") en frío**. Antes de comenzar la calefacción, deberá verificarse que el montaje, particularmente que las juntas esmeriladas, estén bien ajustadas.
- 13) **¡¡ No se debe abandonar jamás el puesto de trabajo mientras se esté llevando a cabo alguna reacción o destilación!!**

¡EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS NORMAS PODRÁ IMPLICAR DESDE UNA SERIA AMONESTACIÓN HASTA LA EXPULSIÓN DEL ALUMNO DEL LABORATORIO!

TELÉFONOS DE URGENCIA: 112

SEGURO ESCOLAR (SERVICIO PREVENCIÓN RIESGOS LABORALES)(96) 398.33.01
INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA (SERVICIO PERMANENTE) (91) 562.04.20

SESIÓN 1. ESTEREOQUÍMICA DE LOS COMPUESTOS. MODELOS MOLECULARES

Los modelos moleculares son una herramienta para la representación tridimensional de compuestos químicos. Los *kits* de modelos moleculares están constituidos por diferentes piezas que representan los átomos en sus diferentes hibridaciones y sus enlaces con la geometría adecuada. Enlazando las piezas adecuadas dispondremos de una representación tridimensional de la molécula que permite analizarla y apreciar fácilmente sus características estructurales.

Se trabajará con modelos que representan:

A.- ÁTOMOS Y ENLACES

B.- CONFÓRMEROS Y PROYECCIONES DE FISCHER

B.1.- MOLÉCULAS DE CADENA ABIERTA

B2.- ANILLOS DE SEIS ESLABONES: CICLOHEXANOS

C.- CARBONO ESTEREOGÉNICO E ISOMERIA ÓPTICA

C.1.- CARBONO ESTEREOGÉNICO

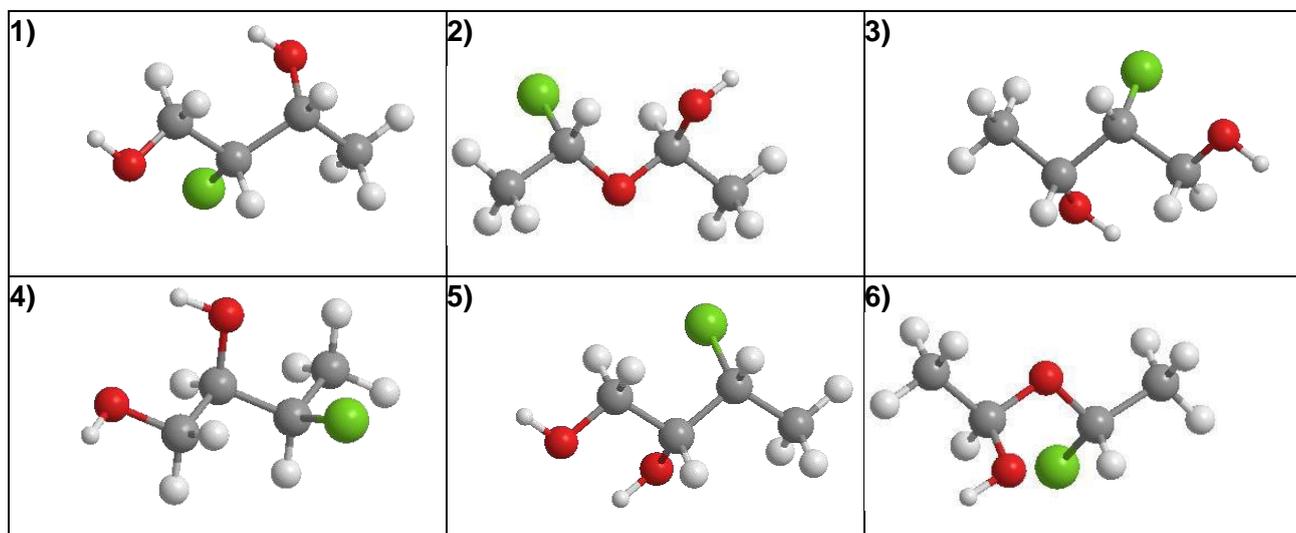
C.2.- IMÁGENES ESPECULARES NO SUPERPONIBLES: PAREJAS DE ENANTIÓMEROS

C.3.- COMPUESTOS CON DOS CENTROS ESTEREOGÉNICOS: YVCH-CHXZ

CUESTIONES (no necesita copiar los enunciados, basta indicar el número pero conteste las cuestiones por orden).

Cuestiones previas

1. Los siguientes modelos de bolas y varillas representan compuestos de fórmula $C_4H_9ClO_2$.



a) Complete una tabla del tipo siguiente dibujando cada estructura con líneas, cuñas punteadas y cuñas sólidas marcando con un asterisco sobre la estructura los carbonos estereogénicos. De el nombre correcto completo para dos de estos compuestos.

Compuesto	Estructura	Nombre (sólo 2 compuestos)
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		

b) Compare las estructuras 1-6 y complete una tabla del tipo siguiente que indique la relación entre ellas: idénticas, isómeros, tipo de isómero etc.

	1	2	3	4	5	6
1						
2						
3						
4						
5						
6						

2. Dibuje la estructura de los dos isómeros del 2-metoxi-3-cloro-2-buteno de forma que se muestre claramente la geometría de la molécula y la disposición espacial de sus átomos.

a) Isómero *Z*

b) Isómero *E*

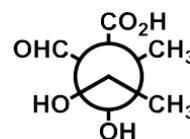
3. Complete la tabla siguiente:

Compuesto	a)	b)	c)	d)
Proyección líneas-cuñas				
Proyección de Fisher				
Configuración absoluta				

4. a) Dibuje la estructura de líneas y cuñas del 1-propanol con todos sus átomos.

b) Dibuje las proyecciones de Newman y caballete de una conformación alternada y una eclipsada del 1-propanol **entre los carbonos 1 y 2**.

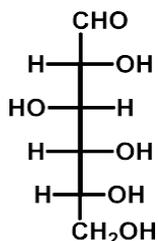
5. a) Dibuje la siguiente proyección de Newman en forma eclipsada.



b) Pase la proyección de Newman a proyección de Fisher correcta.

c) Indique sobre la proyección de Fisher la configuración absoluta de los carbonos con la letra *R/S* al lado del átomo implicado.

6. La figura siguiente muestra la proyección de Fisher de la D-glucosa:



a) Indique la configuración absoluta de todos sus carbonos estereogénicos con *R/S* al lado de cada carbono y nombre el compuesto según IUPAC.

b) Dibuje la proyección de Fisher de la L-glucosa, indique con *R/S* la configuración absoluta de cada carbono y nombre el compuesto según IUPAC.

c) La D-galactosa es un isómero de la D-glucosa con distinta configuración en C-4 (epímero en C-4). Dibuje la proyección de Fisher de la D-galactosa, indique con *R/S* la configuración absoluta de sus carbonos y nombre el compuesto según IUPAC.

7. Se conocen 9 isómeros distintos del dimetilciclohexano:

a) Dibuje en forma plana todos los dimetilciclohexanos posibles. Utilice cuñas-líneas discontinuas para indicar la disposición espacial de los sustituyentes.

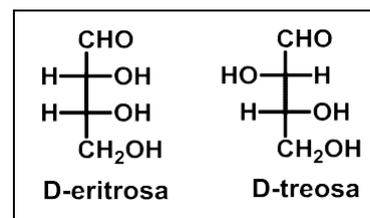
b) ¿Presentaran actividad óptica los compuestos anteriores? Justifique la respuesta.

c) Nombre correctamente todos los 1,3-dimetilciclohexanos.

d) Dibuje las dos estructuras de silla para todos los 1,3-dimetilciclohexanos y nombre cada posición como axial o ecuatorial. Compare las estabildades relativas de cada par de sillas y rodee con un círculo la silla más estable.

Cuestiones posteriores

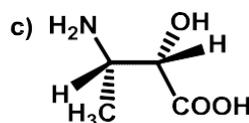
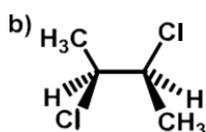
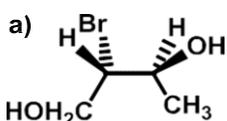
1. La D-eritrosa y la D-treosa son dos azúcares isómeros con las siguientes proyecciones de Fisher:



Teniendo en cuenta sus estructuras complete una tabla del tipo siguiente:

	Proyección en perspectiva C ₂ -C ₃		Proyección de Newman C ₂ -C ₃	
	eclipsada	alternada	eclipsada	alternada
D-eritrosa				
D-treosa				

2. a) Convierta las siguientes fórmulas en perspectiva en proyecciones de Fisher correctas:



- b) Indique la configuración absoluta de cada carbono con la letra R/S al lado del átomo implicado

3. a) Dibuje la proyección de Fischer del (2R,3S)-1,2,3-butanotriol indicando la configuración de los estereocentros con la letra R/S al lado del átomo implicado.

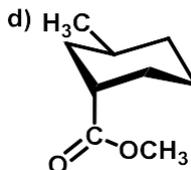
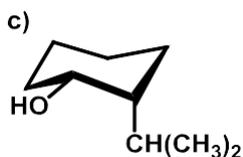
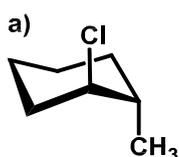
- b) Convierta la proyección de Fisher en proyecciones de Newmann eclipsada y alternada (una de cada).

4. Para cada uno de los siguientes derivados del ciclohexano, indique:

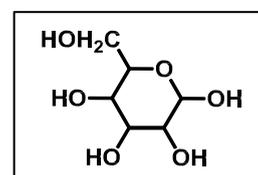
a) Si la molécula es un isómero *cis* o *trans*.

b) Si se encuentra en la conformación más estable.

c) Si la respuesta del apartado b) es negativa, dibuje la conformación más estable.



5. En disolución acuosa la forma más estable de la glucosa contiene un anillo de seis miembros del tipo siguiente en una conformación de silla con todos los sustituyentes ecuatoriales.

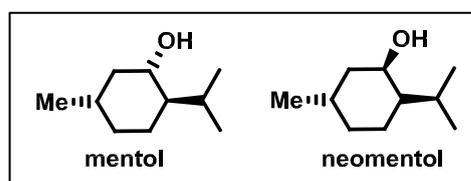


a) Represente la conformación más estable de la glucosa.

b) Represente la conformación menos estable de la glucosa.

c) Representa la conformación más estable de la galactosa (ver Cuestión previa 6).

6. El mentol y el neomentol son dos compuestos isómeros con las estructuras que aparecen en la imagen. Dibuje la conformación de silla más estable para cada uno de ellos.



SESIÓN II

FUERZAS INTERMOLECULARES Y PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS

1. Objetivo

Demostrar que la comprensión de los distintos tipos de fuerzas intermoleculares puede ayudar a predecir las propiedades físicas de los compuestos.

2. Introducción

La electronegatividad (χ) es una propiedad atómica que representa la capacidad de un átomo en una molécula para atraer los electrones de enlace hacia sí. A continuación se dan algunos valores de electronegatividad, según la escala de Pauling, necesarios para la comprensión de la práctica.

<u>H</u> 2.20																			<u>He</u>
<u>Li</u> 0.98	<u>Be</u> 1.57											<u>B</u> 2.04	<u>C</u> 2.55	<u>N</u> 3.04	<u>O</u> 3.44	<u>F</u> 3.98			<u>Ne</u>
<u>Na</u> 0.93	<u>Mg</u> 1.31											<u>Al</u> 1.61	<u>Si</u> 1.90	<u>P</u> 2.19	<u>S</u> 2.58	<u>Cl</u> 3.16			<u>Ar</u>
<u>K</u> 0.82	<u>Ca</u> 1.00	<u>Sc</u> 1.36	<u>Ti</u> 1.54	<u>V</u> 1.63	<u>Cr</u> 1.66	<u>Mn</u> 1.55	<u>Fe</u> 1.83	<u>Co</u> 1.88	<u>Ni</u> 1.91	<u>Cu</u> 1.90	<u>Zn</u> 1.65	<u>Ga</u> 1.81	<u>Ge</u> 2.01	<u>As</u> 2.18	<u>Se</u> 2.55	<u>Br</u> 2.96			<u>Kr</u> 3.00

El porcentaje de carácter iónico de un enlace viene determinado por la diferencia de electronegatividad de los dos átomos que forman el mismo según la ecuación:

$$\% \text{ carácter iónico} = 1 - e^{-1/4(\chi^A - \chi^B)^2} \times 100$$

La polaridad de un enlace depende del carácter iónico del mismo y la de una molécula depende de la distribución de los enlaces polares y del peso relativo entre enlaces polares/enlaces apolares. Según la polaridad de sus enlaces los compuestos pueden considerarse iónicos ($\Delta\chi > 1.7$), covalentes polares ($0.5 \leq \Delta\chi \leq 1.7$) ó covalentes apolares ($0 \leq \Delta\chi \leq 0.5$).

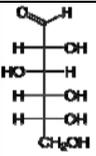
El análisis de la naturaleza y distribución de los enlaces de una molécula nos permite predecir qué tipos de fuerzas intermoleculares se podrían establecer y la naturaleza de dichas fuerzas de cohesión intermolecular influye en las propiedades físicas de los compuestos.

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas, indique en la tabla de la página siguiente cuáles serían sus predicciones en cuanto a los valores esperados, dentro del rango indicado, para cada compuesto y propiedad física.

3. Material y productos

Varilla - 7 Tubos de ensayo o viales con tapón - Pipeta Pasteur - Vidrio de reloj - Espátula - Vaso de precipitados de 50mL - Rotulador permanente - Ácido esteárico – Glucosa - Cloruro de calcio – Hexano - Agua - Un equipo para determinar puntos de fusión.

Tabla de resultados

Compuesto	Ácido esteárico	Glucosa	CaCl ₂	Hexano	Agua
Estructura	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH		[Ca] ²⁺ [Cl] ₂ ⁻	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	
Δχ del enlace más polar en cada caso					
% carácter iónico del enlace más polar en cada caso					
Polaridad de la molécula (iónica, polar, apolar)					
Predicciones					
Punto de fusión (bajo, intermedio, alto)					
¿Es soluble en agua? (si /no)					
¿Es soluble en hexano? (si/no)					
Datos experimentales					
Punto de fusión (bajo, intermedio, alto)					
¿Es soluble en agua? (si /no)					
¿Es soluble en hexano? (si/no)					
Datos descritos en la literatura					
Punto de fusión (bajo, intermedio, alto)					
¿Es soluble en agua? (si /no)					

¿Es soluble en hexano? (si/no)						
-----------------------------------	--	--	--	--	--	--

4. Procedimiento experimental

- Determinar si el punto de fusión de cada producto es menor que 100°C, entre 100-200°C, o mayor que 200°C y anotar en la sección 'datos experimentales' de la tabla de resultados.
- Etiquetar los 7 viales con números del 1-7 utilizando marcadores permanentes. A los viales etiquetados del 1-4 añadir 3 ml, aproximadamente, de agua desionizada y a los viales con etiquetas del 5-7 añadir la misma cantidad de hexano, utilizando la pipeta Pasteur.
- Añadir el soluto correspondiente a cada tubo según se indica a continuación. Tapar y agitar anotando la correspondiente observación en la sección 'datos experimentales' de la tabla de resultados.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
disolvente	agua	agua	agua	agua	hexano	hexano	hexano
soluto	ácido esteárico	glucosa	CaCl ₂	hexano	ácido esteárico	glucosa	CaCl ₂

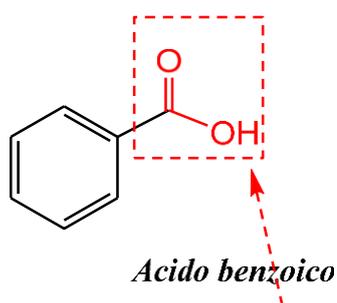
- Buscar los valores descritos en la literatura para las propiedades en estudio de cada compuesto y anotarlos en la sección correspondiente de la tabla de resultados. Comparar los datos predichos, los observados y los descritos en la literatura.

SESIONES III Y IV

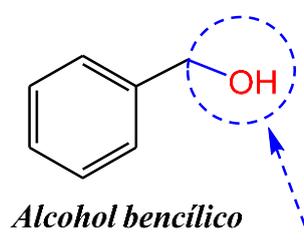
EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO, SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE UNA MEZCLA BINARIA DE ÁCIDO CARBOXÍLICO Y ALCOHOL BENCÍLICO

1. Introducción

La separación de los componentes de una mezcla binaria compuesta por ácido benzoico y alcohol bencílico, se basa en las diferentes propiedades ácido/base de ambas sustancias y en una técnica denominada **extracción líquido-líquido**. Posteriormente, se purificarán ambas sustancias mediante el empleo de otras técnicas: la **recristalización** para el sólido (ácido benzoico) y la **destilación** para el componente líquido (alcohol bencílico).



Grupo funcional **Ácido carboxílico**



Grupo funcional **Álcohol**

2. Objetivos

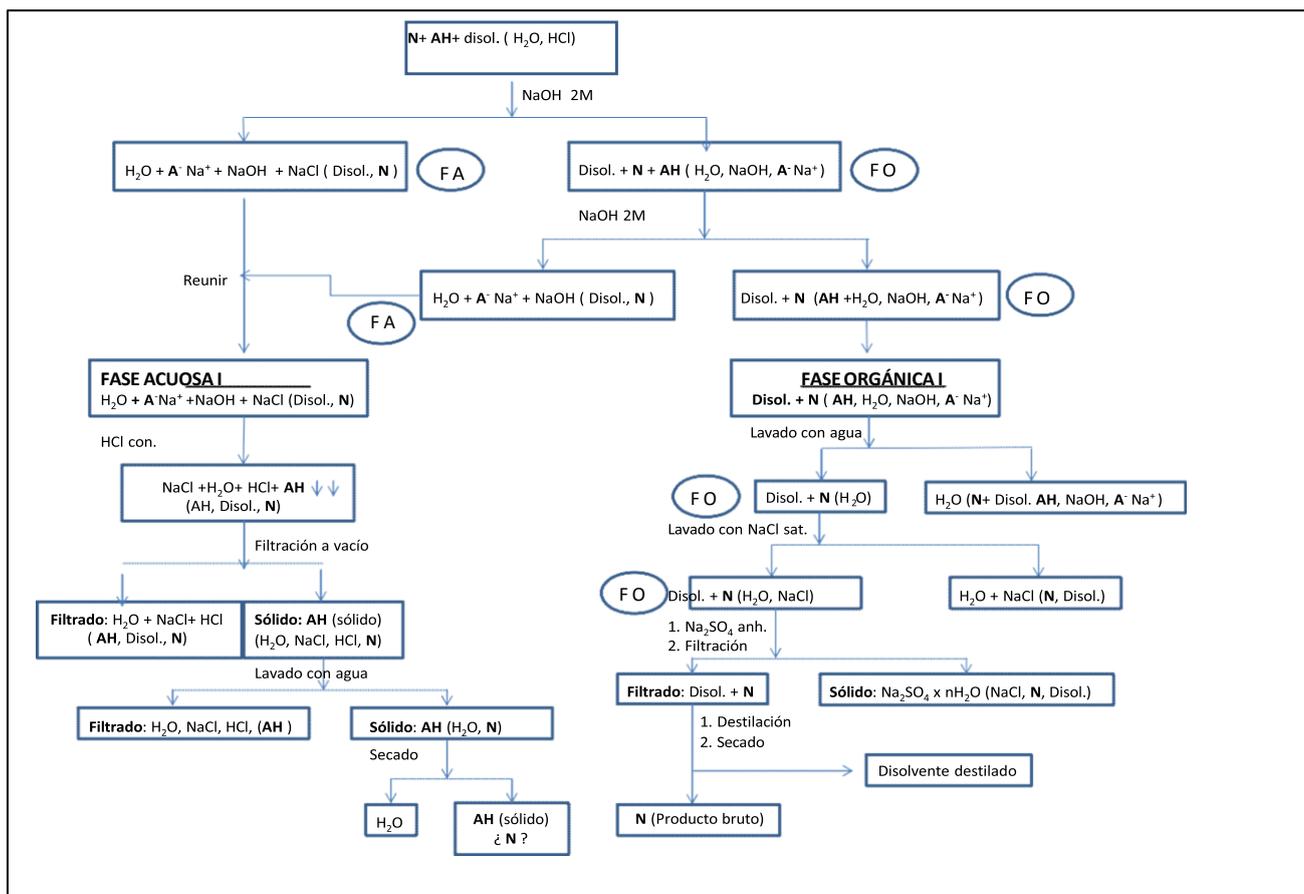
Separación, mediante extracción líquido-líquido, de los componentes de una mezcla compuesta por ácido benzoico y alcohol bencílico, basada en el carácter ácido de uno de los componentes.

Aislamiento y caracterización de un compuesto sólido (Ácido benzoico). Aislamiento y caracterización de un compuesto líquido (Alcohol bencílico).

- **Ácido benzoico**, sólido cristalino incoloro presente en una gran variedad de plantas, especialmente en aceites esenciales y empleado como conservante de alimentos, debido a su carácter ácido. Es muy poco soluble en agua fría (2.1 g/1000 mL) y soluble en alcoholes y hexano.

- **Alcohol bencílico**, líquido incoloro con un aroma suave agradable, producido en forma natural por varias plantas, se encuentra en numerosas frutas y en el té, así como en aceites esenciales como el jazmín, jacinto. Es parcialmente soluble en agua (4 g/100 mL) y es completamente miscible en alcoholes y éter etílico.

ESQUEMA DE SEPARACIÓN DE UN ÁCIDO Y UN NEUTRO



3. Procedimiento experimental.

3.1.- Extracción líquido-líquido

50 mL de una disolución de acetato de etilo que contienen 5 mL de alcohol bencílico y 5 g ácido benzoico se transvasa, con ayuda de un embudo cónico, a un embudo de decantación. La disolución anterior se extrae con aproximadamente 20 mL de disolución NaOH/H₂O 2N, agitando y abriendo la llave de forma alternativa. El embudo se deja reposar y una vez se han separado las dos fases claramente, se saca la fase acuosa inferior quitando el tapón y abriendo la llave con cuidado. La fase orgánica se vuelve a extraer dos veces más, siguiendo el mismo procedimiento. Una vez finalizada la extracción, se combinan las fases acuosas y se reservan para continuar en el apartado 3.2.

La fase orgánica resultante se lava una vez con 20 mL de agua. Seguidamente, se separan las fases, se desecha la acuosa, y se lava la superior orgánica con 20 ml de disolución saturada de NaCl en agua. Finalmente, la fase orgánica se transvasa a un erlenmeyer seco de 100 mL y se deja secar con MgSO₄ anhidro. (Alternativamente, la filtración se puede hacer sobre un frasco preparado para tal efecto y el filtrado se guarda con el desecante hasta la siguiente sesión de prácticas)

3.2.- Aislamiento y caracterización del ácido benzoico.

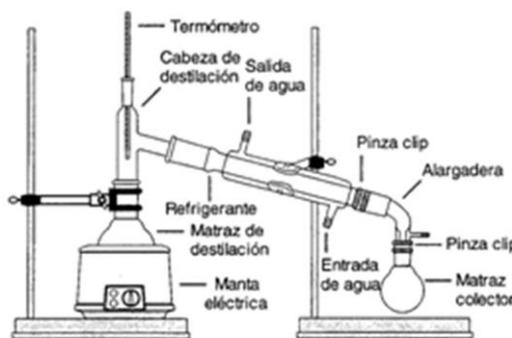
La solución acuosa básica se acidula con HCl concentrado (gota a gota y con agitación) hasta pH 2-3. El ácido benzoico precipitado se filtra a vacío, se lava con un poco de agua

fría y se recristaliza de agua caliente.

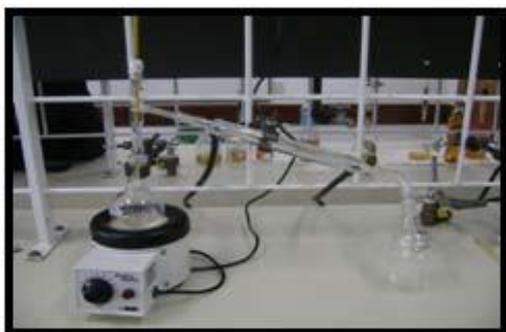
Recristalización: Transferir el ácido benzoico a un erlenmeyer de 250 mL limpio, añadir aproximadamente 40 mL de agua y calentar la mezcla hasta ebullición sobre una placa calefactora. Si con este volumen de agua el ácido no se ha disuelto completamente se añade poco a poco más agua hasta conseguir una disolución completa. Si llegado a este punto, se observa alguna turbidez en la disolución que no desaparece tras la adición de agua se procederá a una filtración por gravedad en

caliente de las impurezas insolubles; para lo cual será necesario otro erlenmeyer de 250 mL y un embudo cónico caliente (en estufa) y un filtro de pliegues. Si durante la filtración en caliente el sólido comienza a cristalizar en el filtro o en el vástago del embudo, se añadirá una pequeña cantidad de agua a ebullición para redisolverlo (la disolución filtrada debe ser transparente y lo suficientemente concentrada como para que el sólido cristalice al enfriar). La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se enfría con un baño de agua-hielo durante unos 10 minutos para que la cristalización sea completa. Los cristales obtenidos se recogen por filtración a vacío, se lavan en el embudo Büchner con pequeñas porciones de agua fría y se dejan secar. Una vez secos los cristales, se pesan para determinar el rendimiento de la cristalización y se caracterizan determinando su punto de fusión.

3.3. Aislamiento y caracterización del alcohol bencílico.



Destilación sencilla.



La disolución de acetato de etilo obtenida en el apartado 3.1, se filtra por gravedad a un matraz de fondo redondo al que se le añaden unas piedras de porcelana porosa y se monta un sistema de destilación. La mezcla se calienta (a un 30% de la potencia de la manta eléctrica) y se destila el acetato de etilo. Cuando deja de destilar, el residuo que queda en el balón se destila, calentando a una potencia del 90%, recogiendo el destilado en un vial previamente pesado. Lea la temperatura del termómetro mientras

se recoge el destilado. El alcohol bencílico destilado se pesa y se calcula el porcentaje de alcohol puro recuperado.

SESIÓN V

EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PIGMENTOS VEGETALES PRESENTES EN ESPINACAS FRESCAS

1. Introducción

La fotosíntesis, proceso que permite a los vegetales obtener la materia y la energía que necesitan para desarrollar sus funciones vitales, se lleva a cabo gracias a la presencia en las hojas y en los tallos jóvenes de pigmentos capaces de captar la energía lumínica.

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 requiere el previo conocimiento de los pigmentos vegetales que contienen.

¿Qué son los pigmentos?

Si es posible encontrar en el reino vegetal todos los matices y combinaciones de colores del espectro, existe un predominio general de los colores primarios: verde, amarillo, rojo, azul. Estos colores son conferidos a los vegetales por determinados *compuestos químicos* definidos, llamados **pigmentos**. El color particular que presenta un determinado órgano vegetal depende generalmente del predominio de uno u otro pigmento o de la combinación de ellos. Cuando un vegetal presenta un color blanco, es debido a la falta de tales pigmentos. La luz solar que incide sobre él no es absorbida selectivamente como ocurre en las partes coloreadas, sino que es transmitida o reflejada prácticamente sin sufrir modificación.

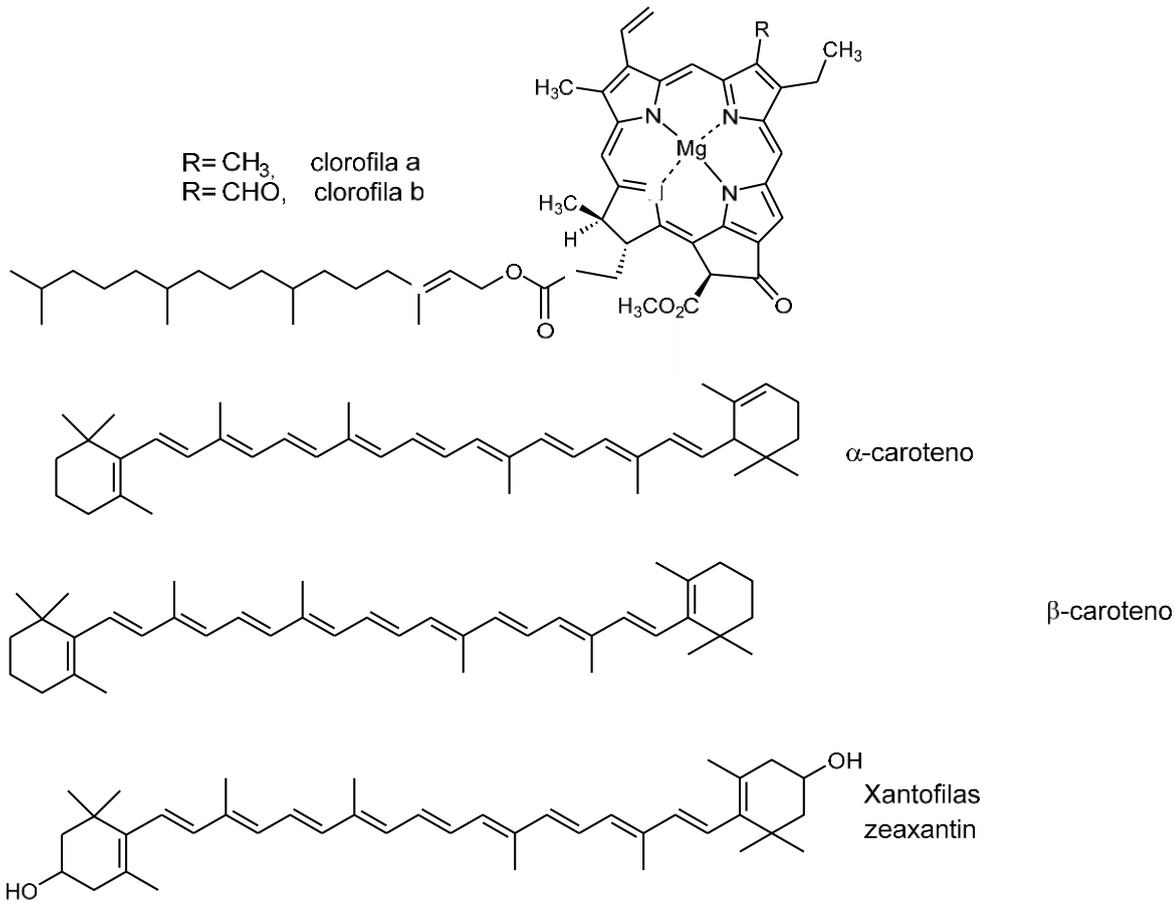
- *Las Clorofilas*. El color verde tan uniformemente presente en los vegetales es debido a la presencia de dos pigmentos estrechamente emparentados llamados **clorofila a** y **clorofila b**. Están presentes en los cloroplastos de las plantas verdes, especialmente en las hojas.
- *Carotenoides*. Son pigmentos rojos, amarillos o de color naranja que se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal. Se les llama pigmentos lipocrómicos porque son solubles en lípidos. En las plantas superiores los carotenoides se encuentran en las hojas junto con las clorofilas; también constituyen los principales pigmentos de ciertas flores amarillas, naranja y rojas, y de ciertos frutos.

Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentra directamente relacionado con su estructura: los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación. Cuando el número de dobles enlaces conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Por ejemplo, el fitoeno que posee únicamente tres enlaces dobles conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y apareciendo por tanto incoloro a la vista, el licopeno, compuesto que confiere su color rojo

al tomate contiene 11 enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color verde (ζ -Caroteno), amarillo (β -caroteno), y anaranjado (neurosporaxantina)

Los **carotenoides** comprenden dos grupos de compuestos:

- a. **Carotenos**, que son hidrocarburos (solubles en éter de petróleo o mezcla de hexanos).
- b. **Xantofilas**, que son derivados oxigenados de los anteriores. Dichos grupos oxigenados son, alcoholes, aldehídos, cetonas, epóxidos y ácidos carboxílicos.



¿Cómo se dividen los disolventes?

Los pigmentos clorofílicos son **insolubles** en **agua**, pero sí son **solubles** (afinidad química) en **disolventes orgánicos** como por ejemplo etanol y acetona. A los disolventes que extraen simultáneamente todos los pigmentos de la hoja se los suele llamar **extractantes**. Existen otros disolventes que presentan afinidad por algunos pigmentos y se los llama **separadores**, como por ejemplo el hexano y el éter de petróleo, entre otros.

En el método de extracción simple, que veremos más adelante, se utilizará como extractante la acetona y como separador el hexano.

En el segundo método, el cromatográfico, se realizará una separación más fina de los pigmentos, y se basa en la adsorción y solubilidad diferenciales de los mismos. Un soporte inerte como papel de filtro, silicagel o alúmina y unos granos de carbonato de calcio para deshidratar la muestra, son los componentes necesarios para desarrollar la técnica. Es una técnica que permite la separación de las sustancias de una mezcla que tienen una afinidad diferente por el disolvente en que se encuentran.

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

2. Objetivos

Extraer los pigmentos fotosintéticos presentes en un producto natural (espinacas) y separarlos. Esta separación se realizará mediante una técnica sencilla como la extracción líquido-líquido, ya vista anteriormente, y por técnicas de cromatografía simples como son la de papel o capa fina.

3. Material y productos

Mortero - Embudo cónico – Embudo de decantación – Viales de 20 mL - Papel de filtro - Placas de cromatografía – Capilares - Vasos de precipitado de 50 y 100 mL – Vidrio de reloj - Matraces Erlenmeyer -Pipetas Pasteur - Varilla de vidrio- Espátula - Acetona – Metanol – Hexano- Acetato de etilo- Carbonato de calcio - Espinacas.

4. Procedimiento experimental

4.1. Extracción de pigmentos vegetales mediante extracción líquido-líquido

A 7 g de hojas frescas de espinacas troceadas se le añade una punta de espátula de carbonato cálcico (para neutralizar los tejidos ácidos y prevenir una pérdida parcial de magnesio de las clorofilas) y se tritura la mezcla en un mortero. A continuación se añaden 25 mL de acetona y se deja macerar la mezcla hasta decoloración de las hojas (es posible que sea necesario transvasar a un vaso de precipitados)

Una vez obtenido el extracto, se filtra por gravedad en un embudo cónico provisto de una bola de algodón o mediante un embudo Buchner provisto de papel de filtro.

El filtrado resultante (disolución A) contiene las clorofilas a y b, los carotenoides, las xantofilas y otras moléculas incoloras solubles en acetona. De dicha disolución se toman 5 mL y se reservan en un vial al que se etiqueta como “disolución A”

Con el resto de filtrado (disolución A) se procederá a hacer un cambio de disolvente. Eliminaremos la acetona y la sustituiremos por hexano.

Para ello, la disolución A (unos 20 mL) se introduce en un embudo de decantación al que se añaden 15 mL de hexano. A continuación, y con objeto de eliminar la acetona, se

añaden 35 mL de agua destilada a la mezcla, lentamente y dejándola resbalar por las paredes del embudo. Se agita suavemente y se espera hasta que se separen las dos fases; en la superior (hexano) estarán los pigmentos que se desean separar y en la inferior la mezcla de acetona y agua. Si se forman emulsiones, se adiciona una pequeña cantidad de cloruro sódico sólido y se agita, hasta obtener una separación perfecta de fases. Se abre la llave del embudo y se recoge la fase inferior en un Erlenmeyer. Se repite el lavado de la fase orgánica con agua dos veces más, y en el último lavado, para asegurarnos de que se elimina toda la acetona, se deja escapar un par de gotas de la fase superior.

A continuación, al embudo que contiene el extracto de hexano, se añaden 10 mL de metanol y se mezcla enérgicamente, teniendo la precaución de destapar el embudo de vez en cuando para dejar escapar los gases acumulados. La solución de metanol es más polar y más densa que la de hexano y puesto que ambos son inmiscibles se formarán dos nuevas fases:

La superior, de **hexano (disolución B)**, lleva disueltos los pigmentos menos polares, **carotenos**

La inferior, de **metanol (disolución C)**, lleva disueltos los más polares, **clorofila a**, **clorofila b** y **xantofilas**. Separar la capa inferior.

Se repite la extracción con 10 mL más de metanol. Se reúnen los dos extractos metanólicos (20 mL totales) en un vial y la capa superior (hexano, unos 15 mL totales) se pasa a otro vial.

4.2. Separación de pigmentos vegetales por cromatografía de papel y capa fina

Trabajaremos con las disoluciones A, B y C obtenidas en el apartado 4.1.

4.2.1. Separación de pigmentos vegetales por cromatografía sobre papel.

1.- Sobre un rectángulo de papel de filtro de unos 8 centímetros de ancho por 6 centímetros de alto doblado en V (para que se mantenga en pie dentro de la cubeta) se traza con lápiz, una línea de siembra a 1 cm de la base. Sobre la línea se marcan tres puntos equidistantes entre sí y sobre cada punto se realizan de 5 a 8 descargas con el capilar cargado de las disoluciones A, B y C, dejando entre cada toque el tiempo necesario para que se evapore el disolvente.

2.- Se coloca el papel ya sembrado en una cubeta de cromatografía o en un vaso de precipitados que contendrá el disolvente separador denominado eluyente (hexano- acetona, 8,5-1,5), se tapa con un vidrio de reloj y se deja que el líquido suba por el papel hasta aproximadamente 0.5 cm de su extremo superior.

3.- A continuación se saca el papel de la cubeta o vaso de precipitados, se evapora el eluyente en la misma vitrina y se observa la cromatografía a la luz visible y a la luz UV.

4.- Los pigmentos se habrán separando según su adsorción o afinidad con el disolvente. Dibuje lo observado en la cromatografía de papel en el cuaderno de laboratorio. Determine los R_f de cada una de las manchas observadas.

A continuación se puede observar una fotografía en la que se aprecian perfectamente los distintos tipos de pigmentos extraídos de una muestra de espinacas (E) y de una muestra de los pigmentos extraídos de perejil deshidratado (P).

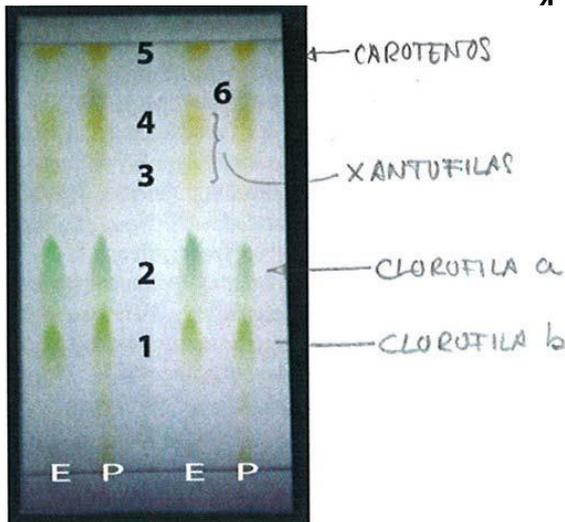


Figura 5. Cromatograma en papel Whatman® 3MM en el cual se han aplicado, por duplicado, una muestra de un extracto de espinaca fresca (E) junto a uno de perejil deshidratado (P). Los diferentes pigmentos se han identificado mediante los números: 1) clorofila *b*; 2) clorofila *a*; 3) violaxantina; 4) luteína; 5) β -caroteno; α -caroteno y 6) Feofitinas como producto de degradación sólo en el extracto de perejil deshidratado.

2.2. Separación de pigmentos vegetales por Cromatografía en capa fina

1.- Para analizar las muestras por cromatografía en capa fina se utilizará un cromatofolio de silicagel de 8x4. A partir del borde inferior de la placa se traza con lápiz una línea recta a un cm del mismo. Sobre la línea se marcan tres puntos y se realizan de 5 a 8 descargas con el capilar cargado de las disoluciones A, B y C, dejando entre cada toque el tiempo necesario para que se evapore el disolvente.

2.- Después de que el disolvente se haya evaporado, se introducirá la placa en el interior de la cubeta de cromatografía, empleando como eluyente de desarrollo la mezcla

hexano: acetato de etilo 7:3.

3.- Finalizado el desarrollo, se saca el cromatofolio con unas pinzas, se deja secar en la vitrina y se marca rápidamente con un lápiz cada una de las manchas. En caso de que no se observen a simple vista las manchas, se pueden revelar con yodo o se observan con luz UV.

4.- Los pigmentos se habrán separando según su adsorción o afinidad con el disolvente. Dibuje lo observado en la cromatografía de capa fina en el cuaderno de laboratorio. Determine los R_f de cada una de las manchas observadas.

A continuación se puede observar unas fotografías en las que se aprecian perfectamente los distintos tipos de pigmentos extraídos de una muestra de espinacas

5. Resultados

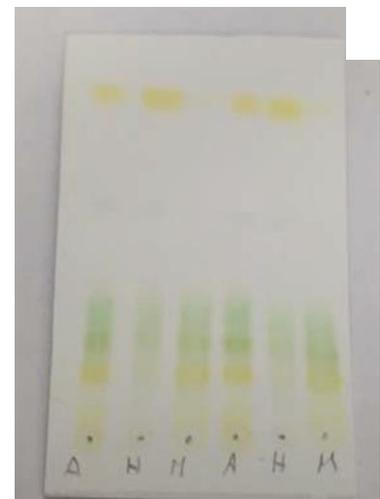
Eluyente: Hexano- ACOEt (

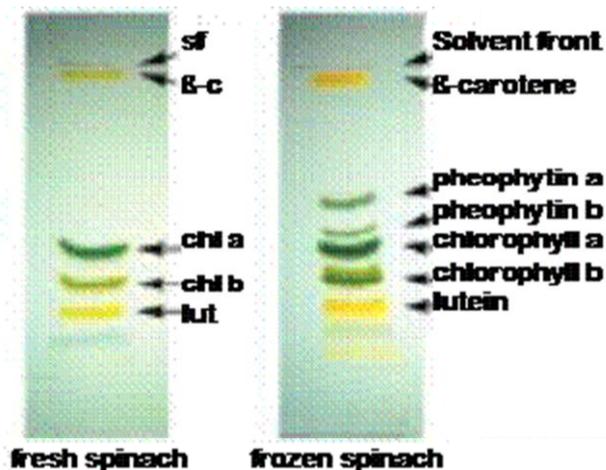
A = Solución A (carotenos, clorofila *a*, clorofila *b* y xantofilas, por este orden)

H = Solución B (mayoritariamente carotenos)

M = Solución C (clorofila *a*, clorofila *b* y xantofilas)

Soporte: Sílica gel





BIBLIOGRAFÍA

1. La práctica de Modelos Moleculares se puede preparar con cualquier libro de texto de Química Orgánica General y con los apuntes de clase.
2. Martínez Grau, W.A.; Csáky, A.G. *Técnicas Experimentales en Síntesis Orgánica*, Ed. Síntesis: Madrid, **1998**.
3. Harwood, L.M.; Moody, C.J. *Experimental Organic Chemistry: Standard & Microscale*, 2ª Edición. Blackwell Scientific Publications: Oxford, **1998**.
4. "An improved method for the extraction and thin layer chromatography of chlorophyll a and b from spinach" H. T. Quach, R. L. Steeper, G. W. Griffin. *J Chem Educ.* **2004**, *81*, 385-387
5. Bossert, R.G.; Brode, W.R. *Laboratory Text and Notebook for Organic Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, **1968**.
6. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S., Jr. *Química Orgánica Experimental*, Ed. Eunibar, **1978**.
7. Palleros, D. R.; *Experimental Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2000.
8. Valcárcel Cases, M.; *Técnicas analíticas de separación*, Editorial Reverté,