

EXPERIMENTS DE BIOQUÍMICA VEGETAL PER A ESTUDIANTS DE BIOQUÍMICA

Josep J. Centelles i Serra
Santiago Imperial i Ródenas

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Biologia)



UNIVERSITAT DE BARCELONA



EXPERIMENTS DE BIOQUÍMICA VEGETAL PER A ESTUDIANTS DE BIOQUÍMICA

Josep J. Centelles i Serra
Santiago Imperial i Ródenas

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Biologia)

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	7
PRÀCTICA 1. ANÀLISI QUALITATIVA DE PIGMENTS VEGETALS	9
INTRODUCCIÓ	9
Pigments vegetals	9
Cromatografia de capa prima	13
OBJECTIUS	14
MATERIALS	15
PROCEDIMENT	16
Extracció dels pigments	16
Espectres d'absorbància	16
Cromatografia de capa prima	17
RESULTATS ESPERABLES EN LA PRÀCTICA	19
Extracció dels pigments	19
Espectres d'absorbància	19
Cromatografia de capa prima	20
BIBLIOGRAFIA	22
PRÀCTICA 2. AÏLLAMENT DE CLOROPLASTS I DETERMINACIÓ DE LA SEVA ACTIVITAT FOTOQUÍMICA	23
INTRODUCCIÓ	23
Fotosíntesi	23
Pigments responsables de la captació de la llum	23
Fase lluminosa: transferència d'excitació i reacció fotoquímica	24
Fotofosforilació	25
Fase fosca: cicle de Calvin-Benson	25
Experiments de Hill	26
OBJECTIUS	26
MATERIALS	26
PROCEDIMENT	27
Aïllament de cloroplasts	27
Comptatge de cloroplasts	27
Activitat fotoquímica	29
Extracció amb acetona	30
Determinació de la concentració de clorofil·les i carotenoides	30
RESULTATS ESPERABLES EN LA PRÀCTICA	33
Aïllament de cloroplasts	33
Comptatge de cloroplasts	33
Activitat fotoquímica	33
Determinació de la concentració de clorofil·les i carotenoides	34
BIBLIOGRAFIA	36

PRÀCTICA 3. CARACTERITZACIÓ DE LA POLIFENOL OXIDASA DE PLÀTAN	37
INTRODUCCIÓ	37
Compostos fenòlics	37
Polifenol oxidasa	37
Mètode de determinació de l'activitat polifenol oxidasa	38
Mecanisme de reacció de l'activitat difenolasa de la polifenol oxidasa	39
OBJECTIUS	39
MATERIALS	40
PROCEDIMENT	40
Preparació de l'extracte	40
Obtenció de l'espectre d'absorbància de la 2,3-dihidroindol 5,6-quinona	40
Assaig de l'activitat polifenol oxidasa	41
Efecte de diversos compostos sobre l'activitat polifenol oxidasa	43
RESULTATS ESPERABLES EN LA PRÀCTICA	44
Preparació de l'extracte	44
Obtenció de l'espectre d'absorbància de la 2,3-dihidroindol 5,6-quinona	45
Assaig de l'activitat polifenol oxidasa	45
Efecte de diversos compostos sobre l'activitat polifenol oxidasa	46
BIBLIOGRAFIA	48
 ANNEX 1. QÜESTIONS PER ALS ESTUDIANTS	 49
 ANNEX 2. INFORMACIÓ TÈCNICA	 51
Característiques d'alguns rotors de centrífuga	51
Normograma per a determinar la força centrífuga relativa (g)	52
Preparació de solucions tampó de fosfat	53

EXPERIMENTS DE BIOQUÍMICA VEGETAL PER A ESTUDIANTS DE BIOQUÍMICA

INTRODUCCIÓ

Aquest text presenta les pràctiques de laboratori corresponents a l'assignatura Bioquímica Vegetal de l'ensenyament de Bioquímica de la Universitat de Barcelona. Aquestes pràctiques s'han anat realitzant en els laboratoris de la Facultat de Biologia de manera continuada des del curs 2001–2002, en què es va iniciar el pla d'estudis vigent de l'ensenyament de Bioquímica.

El manual inclou tres pràctiques de laboratori, que poden realitzar-se en tres sessions de cinc hores de treball i que tracten aspectes diversos, com ara la identificació de pigments vegetals, la demostració de l'activitat fotoquímica dels cloroplasts i la determinació d'una activitat enzimàtica present en les cèl·lules vegetals. Aquestes pràctiques complementen el programa de teoria de l'assignatura i permeten que l'alumnat comprovi experimentalment alguns dels conceptes tractats a les classes teòriques.

L'estructura de les pràctiques és la següent: cada pràctica s'inicia amb una introducció teòrica, a continuació es descriuen els objectius i tot seguit es detalla la part experimental, amb el procediment i els materials que cal utilitzar. En aquesta part del text s'han inclòs espais buits per tal que l'alumne pugui apuntar els seus resultats, així com les preguntes que li han de permetre discutir els resultats finals de la pràctica. Per tal de facilitar la tasca de l'alumne, s'inclou també un esquema que resumeix el procediment que s'ha de seguir en cada pràctica. La finalitat d'aquest esquema és proporcionar a l'alumne una visió global del procés i un punt de referència en tot moment durant la realització de la pràctica. A continuació sota el títol «Resultats esperables en la pràctica» s'inclou un resum de les dades representatives obtingudes des del curs 2001–2002, en què es van iniciar aquestes pràctiques en l'ensenyament de Bioquímica. És tasca del professorat, després de cada una de les pràctiques, posar en comú els resultats de cada grup i analitzar en cada cas les causes que determinats aspectes de la pràctica hagin pogut donar valors erronis o desviats de la normalitat. Finalment, cada pràctica acaba amb una bibliografia bàsica integrada per llibres de text o revisions generals.

El manual inclou també dos annexos que contenen material de suport per a l'alumne, que podrà utilitzar tant durant el desenvolupament de les pràctiques com després. Així, el primer annex conté una sèrie de qüestions que l'estudiant haurà de respondre després de la realització de les pràctiques i que seran indicatives del grau de comprensió adquirit. En l'altre annex s'inclou informació tècnica sobre les etapes de centrifugació i també sobre la metodologia necessària per preparar un tampó de fosfat. Aquest apartat està adreçat especialment als alumnes que no tenen una formació química avançada o que fa temps que no han tingut contacte amb el laboratori. Atès que els alumnes que cursen l'assignatura Bioquímica Vegetal de l'ensenyament de Bioquímica provenen d'ensenyaments molt diversos (Biologia, Farmàcia, Química, Medicina), hem considerat necessari incloure aquesta informació addicional en el manual.

En conjunt, amb aquest manual es pretén ajudar l'alumnat a desenvolupar els experiments proposats, però també a interpretar els resultats obtinguts i a justificar-los sobre la base dels coneixements teòrics. D'altra banda, el manual serveix també com a resum del quadern de laboratori i permet anotar els resultats a mesura que es van obtenint.

Encara que aquest text està adreçat als estudiants de l'ensenyament de Bioquímica, creiem que pot ser d'utilitat també als estudiants de Biologia i altres àrees afins. De fet, el manual contribueix a compensar la manca de textos docents pràctics de bioquímica vegetal.

Finalment, volem agrair la col·laboració en la preparació d'aquest text a les diverses promocions d'alumnes que han realitzat aquestes pràctiques en el laboratori i que ens han permès millorar les descripcions dels procediments experimentals. També agraïm a la doctora Montserrat Busquets els seus suggeriments i comentaris durant la seva etapa com a cap d'estudis de Bioquímica.

PRÀCTICA 1

ANÀLISI QUALITATIVA DE PIGMENTS VEGETALS

INTRODUCCIÓ

Pigments vegetals

Els pigments vegetals són compostos químics que poden transmetre i/o reflectir la llum. El color d'un pigment depèn de l'absorció selectiva de determinades longituds d'ona de la llum i de la reflexió d'altres. Els grups funcionals d'aquestes molècules que absorbeixen la llum s'anomenen *cromòfors* i generalment contenen dobles enllaços conjugats.

Encara que el terme *pigment* inclou un gran nombre de compostos d'estructures diverses, la major part dels pigments poden classificar-se en dos grans grups: pigments nitrogenats i pigments no nitrogenats.

El primer grup comprèn els pigments que contenen almenys un àtom de nitrogen en la seva estructura, com les clorofil·les i les melanines. El segon grup, el formen els compostos que no contenen nitrogen, com els carotenoides i els flavonoides.

Clorofil·les

Les clorofil·les són els pigments responsables del color verd de les fulles de les plantes. A més, són essencials per a la captació de l'energia lluminosa i la seva transformació en energia química durant la fotosíntesi. Les clorofil·les absorbeixen la llum en tot l'espectre visible, excepte en la zona del verd i del groc, per això la seva coloració és verda. En aquestes molècules, el cromòfor està format per un anell tetrapirròlic de porfirina coordinat amb un àtom de magnesi. A les plantes hi ha dues formes de clorofil·la: la clorofil·la a i la clorofil·la b. L'estructura de les dues clorofil·les és molt similar i difereix únicament en un dels substituents de la porfirina, que en el cas de la clorofil·la a és un grup metil i en el cas de la clorofil·la b és un grup formil (figura 1).

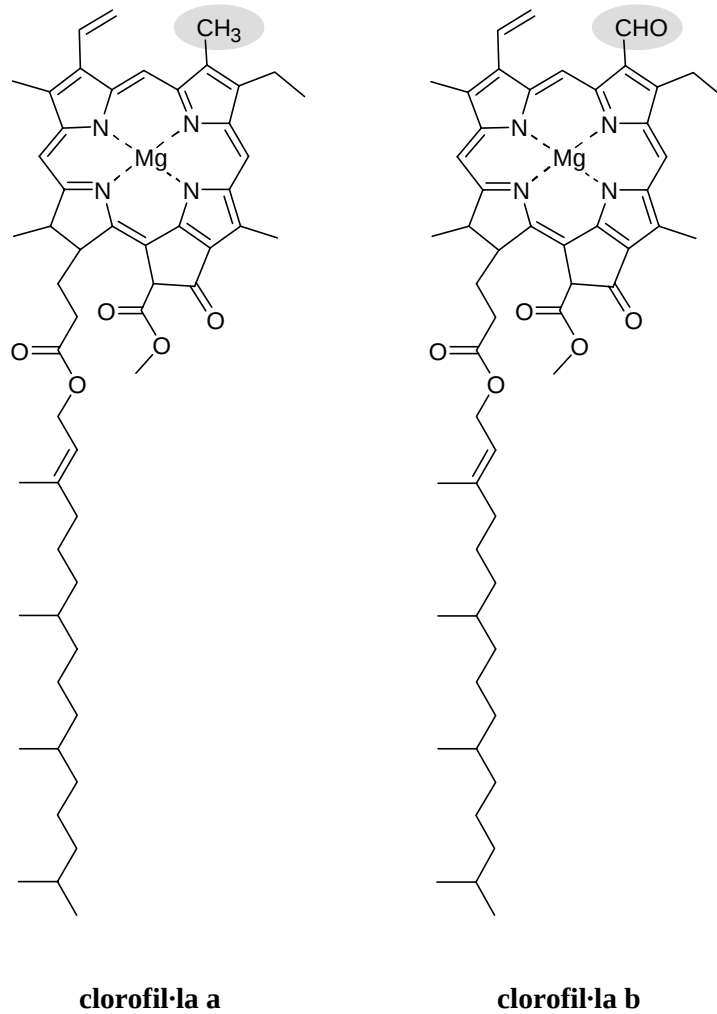


Figura 1. Estructura de les clorofil·les a i b.

Carotenoides

Els carotenoides són pigments naturals de color vermell, taronja o groc. Són els responsables de la coloració taronja de la pastanaga o del color vermell del fruit del tomàquet madur. Pel que fa a la seva estructura, els carotenoides són tetraterpens (40 àtoms de carboni) formats per 8 unitats isoprenoides de 5 àtoms de carboni. Normalment es fa servir el terme *carotè* per designar aquells carotenoides que només contenen àtoms de C i H a la seva estructura, mentre que el terme *carotenoide* és més general i comprèn, a més dels carotens, altres compostos, com les xantofil·les. Els carotens es presenten fonamentalment en quatre formes: α , β , γ i δ , dels quals el més abundant és el β -carotè. En els animals, els carotens es transformen en vitamina A, i per això es coneixen com a *provitamines A*. Les principals diferències estructurals entre els carotens es troben en la presència o no d'anells en els extrems de la molècula i en les característiques d'aquests anells (figura 2).

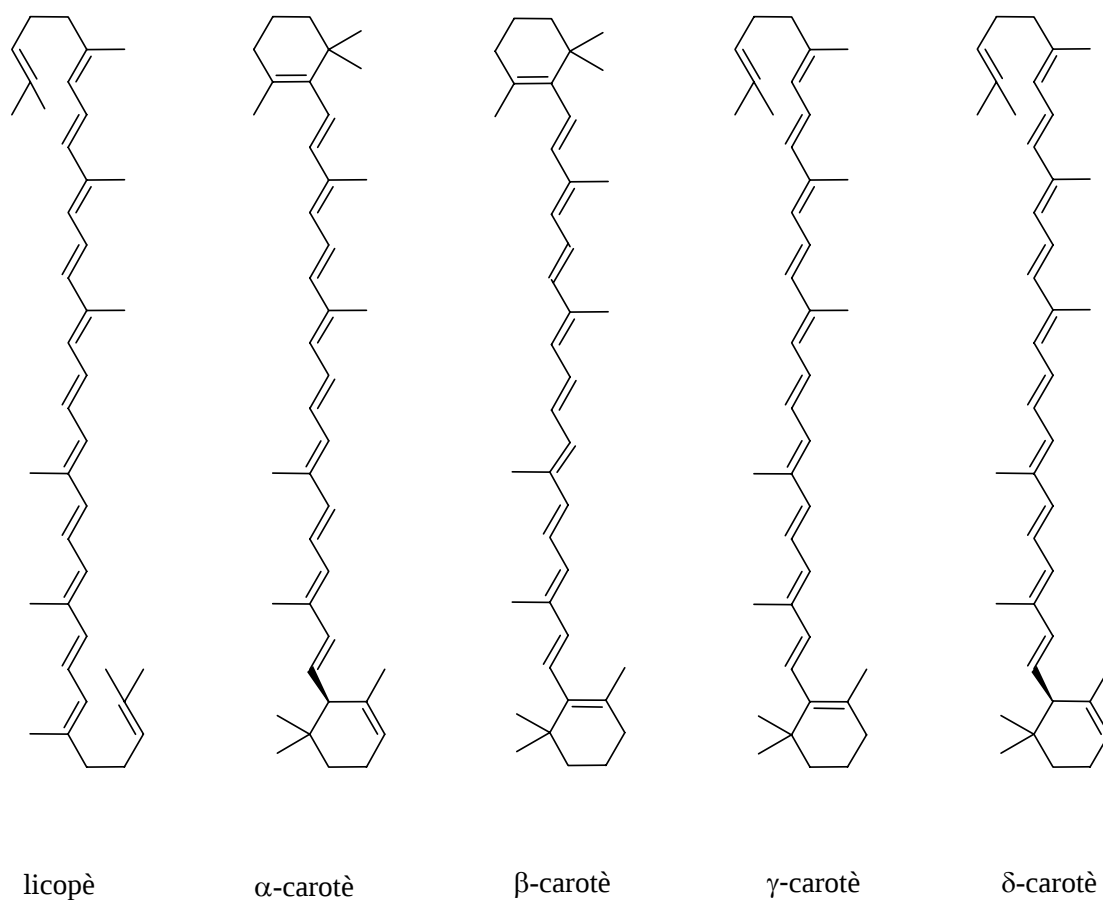


Figura 2. Estructura dels principals carotens.

Si, a més, els anells dels extrems de la cadena hidrocarbonada contenen algun grup alcohol com a substituent, els carotenoides resultants s'anomenen *xantofil·les*. Les xantofil·les són, doncs, carotenoides amb grups hidroxils, i, per tant, són molècules més polars que els carotens. Les més abundants en les cèl·lules vegetals són la luteïna, la violaxantina, i la neoxantina. L'estructura d'aquestes pigments es mostra a la figura 3.

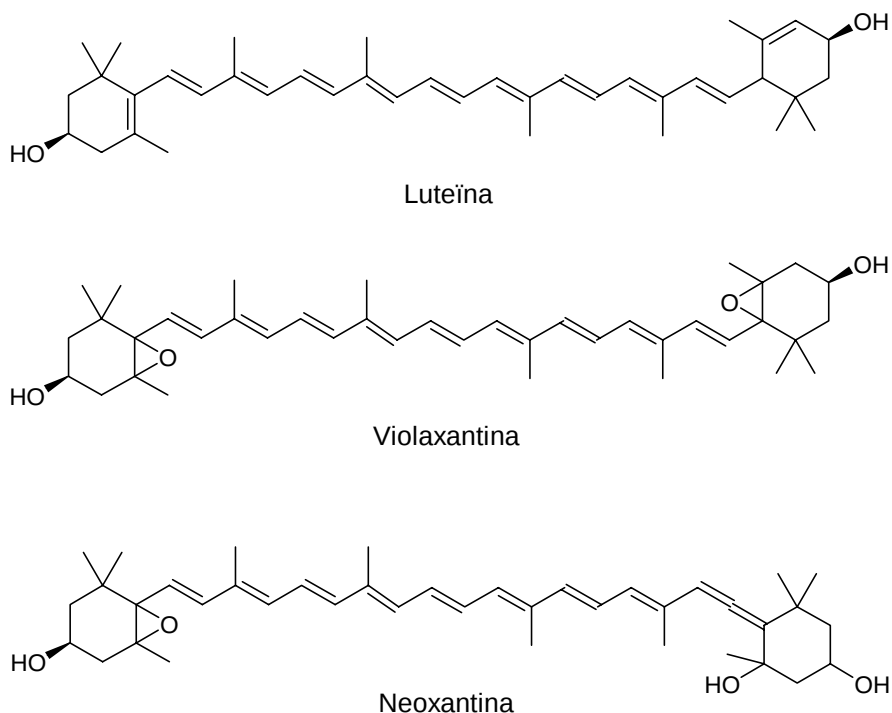


Figura 3. Estructura de les xantofil·les més abundants en les cèl·lules vegetals.

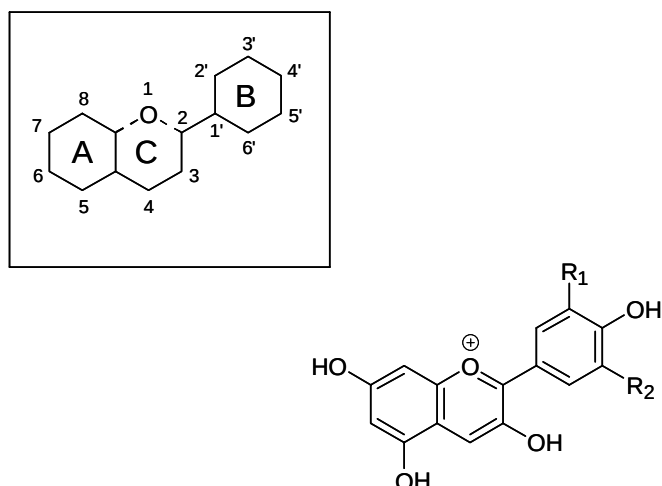
Antocianines

A part de les clorofil·les i els carotenoides, l'altre gran grup de pigments vegetals és l'integrat pels flavonoides. Aquests compostos tenen una estructura bàsica formada per 15 àtoms de carboni, C6-C3-C6, distribuïts en dos anells aromàtics (A i B) i un anell heterocíclic central (figura 4). Dins dels flavonoides, les antocianines són les molècules responsables, en moltes plantes superiors, de la coloració de les flors i dels fruits .

Les antocianines són molècules en què l'hidroxil de l'anell central està glicosilat. La part no glicosilada de la molècula d'antocianina s'anomena *antocianidina*.

Les antocianidines reben el nom de la planta de la qual van ser aïllades per primer cop. Així, la més comuna és la cianidina aïllada a partir de *Centaurea cyanus*. Una altra, la pelargonidina, va rebre el nom d'un gerani (del gènere *Pelargonium*) amb flors de color vermell intens, la petunidina de color porpra és present a les petúnies i la malvidina de color malva és present a les malvàcies.

En la figura 4 també es mostren algunes antocianidines i s'indiquen els seus colors. Com es pot veure, el nombre i la posició dels substituents hidroxil i metoxi de l'anell B determinen la coloració final de la molècula.



	R ₁	R ₂	Color
Pelargonidina	H	H	vermell
Cianidina	OH	H	magenta
Delfinidinina	OH	OH	porpra
Peonidina	OCH ₃	H	magenta
Petunidina	OCH ₃	OH	porpra
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	porpra

Figura 4. Estructura bàsica dels flavonoides (requadrada) i d'algunes antocianidines.

Cromatografia de capa prima

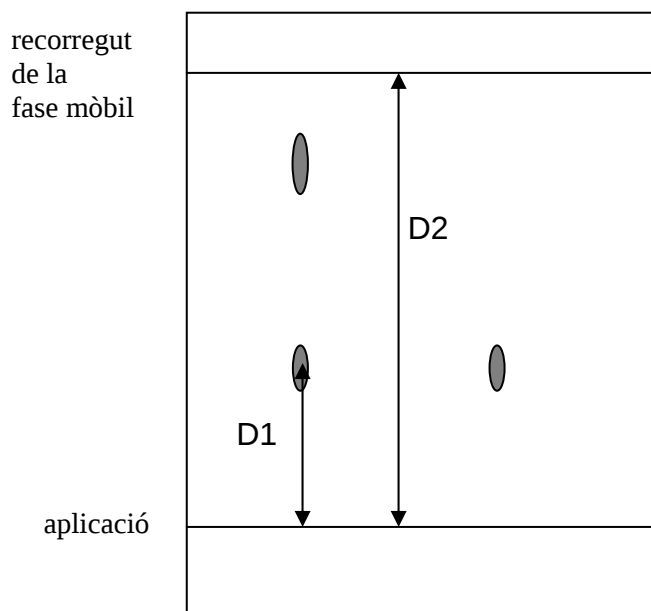
La cromatografia és una tècnica de separació que es basa en la diferent solubilitat dels components d'una mescla en una fase mòbil (un líquid o un gas), que es mou a través d'una fase estacionària (un sòlid o un líquid). Segons l'estat físic de la fase mòbil i de la fase estacionària, es parla de cromatografia gas-sòlid, cromatografia gas-líquid, cromatografia líquid-sòlid o cromatografia líquid-líquid. Els pigments vegetals extrets amb dissolvents orgànics es poden separar gràcies a aquesta tècnica.

La cromatografia va ser utilitzada per primera vegada per Mikhail Semenovitch Tswett l'any 1903 per separar els pigments vegetals. Aquest botànic rus va anomenar la tècnica de separació *escriptura en color*, del grec *chromatos* ('color') i *graphein* ('escriptura'), a causa dels diferents colors que va separar en cromatografiar una solució d'extractes de fulles verdes en èter de petroli a través d'un tub de vidre amb pols d'alúmina.

Després de més de cent anys, la cromatografia és una de les tècniques més utilitzades en bioquímica. Segons el tipus de suport, la cromatografia es classifica en cromatografia plana i cromatografia en columna. La cromatografia de capa prima (en anglès, *thin layer chromatography*, TLC) és una cromatografia plana líquid-sòlid, una de les tècniques més senzilles, sensibles i econòmiques utilitzades per separar i caracteritzar els components d'una mescla.

Un dels aspectes més importants de la cromatografia plana és que, en un sistema cromatogràfic determinat, el moviment relatiu d'un compost respecte al front de l'eluent és una propietat característica i reproducible. En el cas de les cromatografies planes, el moviment d'un compost s'expressa amb un valor de factor de retenció (R_f).

El valor de R_f es defineix com la distància recorreguda per la mostra (D1) dividida per la distància recorreguda per l'eluent (D2):



$$R_f = D1/D2$$

D1 = distància recorreguda per la mostra, mesurada des del centre de la taca fins al punt d'aplicació.

D2 = distància total recorreguda per la fase mòbil.

Figura 5. Esquema d'una separació per cromatografia de capa prima.

Per a un sistema cromatogràfic determinat, el valor de R_f és una constant característica de cada compost. És a dir, si es fan diferents separacions cromatogràfiques fent servir les mateixes fases mòbil i estacionària, la relació entre les distàncies recorregudes per un compost determinat i per la fase mòbil es manté constant.

El valor de R_f varia entre 0 (el compost no es desplaça) i 1 (el compost no queda retingut i es desplaça amb la fase mòbil).

OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta pràctica són tres:

- 1) Extreure, utilitzant dissolvents orgànics, els pigments vegetals presents a les fulles d'espínacs, les arrels de les pastanagues i el fruit de tomàquet madur.
- 2) Obtindre els espectres d'absorbància dels diferents extractes i analitzar els màxims d'absorbància obtinguts segons la coloració dels pigments.
- 3) Separar i identificar els pigments vegetals presents en els extractes utilitzant la tècnica de la cromatografia de capa prima.

MATERIALS

- Material biològic: arrel de pastanaga (*Daucus carota*), fruit de tomàquet (*Lycopersicon esculentum*) sencer o triturat, fulles d'espinaç (*Spinacea oleracea*).
- Reactius: acetona, cloroform, èter, hexà (ATENCIÓ!, són productes inflamables: cal treballar a la vitrina), sulfat de sodi anhidre, NaCl 0,5 M.
- Altres materials: gasa hidròfila, embuts, vas de precipitat de vidre de 50 ml, tubs d'assaig de vidre, paper de filtre Whatman del núm. 1, paper d'alumini, cubetes per espectrofotòmetre de vidre o quars, plaques de silicagel per a TLC.
- Instrumental: morter, embut de decantació, rotavapor (figura 6), espectrofotòmetre, cambra cromatogràfica (figura 7).



Figura 6. Rotavapor.



Figura 7. Cambra cromatogràfica.

PROCEDIMENT

Extracció dels pigments

La preparació de l'extracte dependrà del material de partida.

- a) *A partir d'espínacs*: es trossegueu 5 g de fulles d'espínac i s'homogeneïtzen en un morter amb 15 ml d'acetona durant 5-10 minuts (mínim).
- b) *A partir de pastanaga*: es pesen 20 g de pastanaga ratllada i s'homogeneïtzen en un morter amb sorra (o esferes de vidre) i 30 ml d'acetona.
- c) *A partir de tomàquet*: es parteix de 10 g de tomàquet (pot ser fresc o triturat), que s'homogeneïtzen en un morter amb 15 ml de cloroform.

A continuació, el procediment que se segueix *per als espínacs i la pastanaga* és el següent:

Es fa passar l'homogenat a través de 4 capes de gasa i es recull en un tub de vidre. Tot seguit, es filtra la suspensió resultant a través de paper Whatman del núm. 1 i es recull el filtrat directament sobre un embut de decantació. Es renta el paper de filtre amb 15 ml d'acetona i el rentat es recull en l'embut de decantació. A continuació, s'afegeixen 10 ml d'èter i 10 ml d'aigua destil·lada. Es barreja suaument i es deixa reposar fins que se separin nítidament les dues fases (2-10 minuts). Es descarta la fase inferior (acetona-aigua). En cas que la separació de les dues fases no sigui prou clara, afegiu-hi NaCl 0,5 M. Es renta de nou amb 10 ml d'aigua destil·lada i es descarta la fase inferior.

Es pesen 5 g de sulfat de sodi anhidre en un vas de precipitats de 50 ml, es cobreix el vas amb paper d'alumini i s'hi afegeix la dissolució que conté els pigments. Es torna a filtrar la mostra a través de paper Whatman del núm. 1 i es recull directament en un baló. Posteriorment, es renta el paper amb una mica d'èter, i el rentat es recull en el baló.

S'evaporen les restes d'èter de la mostra al rotavapor (20-30 min a temperatura ambient). S'afegeixen uns 3 ml de cloroform al residu sòlid i es recupera la fase de cloroform. Aquesta dissolució serà la mostra de pigments que s'analitzarà en els apartats següents en l'espectrofotòmetre.

IMPORTANT: les mostres s'han de mantenir durant tot el procés protegides de la llum, per la qual cosa cobrirem els recipients amb paper d'alumini.

El procediment que se segueix *per al tomàquet* és idèntic al descrit per als espínacs i la pastanaga, llevat dels canvis deguts a la utilització de cloroform com a dissolvent de l'homogeneïtzació: el rentat del paper Whatman del núm. 1 es fa amb 15 ml de cloroform i a l'extracció s'afegeixen 20 ml d'aigua (**sense èter!**). El rentat final es fa amb cloroform.

Espectres d'absorbància

S'obté un espectre continu d'absorbància entre 350-800 nm de cadascuna de les mostres de pigments preparades en l'etapa anterior. En cas d'utilitzar un espectrofotòmetre Shimadzu UV 160A, es fa servir el programa 2.spectrum amb els paràmetres que s'indiquen a continuació:

```
SPECTRUM      PARAMETER CHANGE Y/N ?  
  
1.λS= 800.0NM      λE= 350.0NM  
2.MEASURE(ABS/T%)=ABS  
3.UPPER=+1.00Å      LOWER=+0.00Å  
4.SCAN SPEED=FAST  
5.CYCLE      T= 10SEC  N= 1  
6.OVERLAY      NO  
7.COPY      NO  
8.SURVEY SCAN      NO  
9.FILE
```

Figura 8. Programació de l'espectrofotòmetre per a l'obtenció de l'espectre d'absorbància.

Cromatografia de capa prima

Per a l'anàlisi qualitativa de pigments per cromatografia de capa prima, cadascun dels extractes anteriors s'ha de concentrar amb el rotavapor i s'ha de redissoldre en 200 µl de cloroform.

Es marca una ratlla amb llapis a 2 cm de l'extrem inferior de la placa cromatogràfica. S'apliquen les mostres sobre la ratlla tot deixant una distància d'1,5 cm de marge i entre les aplicacions. S'apliquen 15 µl de cada mostra. Les aplicacions s'han de fer de 5 µl en 5 µl i cal esperar que s'assequin cada cop.

Es preparen 220 ml d'eluent (hexà/èter/acetona 60/30/20) i s'aboquen dins la cambra de cromatografia. Es deixen saturar 20 min abans de començar la cromatografia. Cal protegir la cambra de la llum amb paper d'alumini.

Es deixa desenvolupar la cromatografia durant 30 min, aproximadament, fins que el front quedi a 3 cm de l'extrem superior de la placa. Un cop acabada la separació, es marca el front amb un llapis i es deixa assecar la placa.

Exercicis:

- Calculeu els valors de Rf .
- Observeu la placa sota llum ultraviolada i anoteu els canvis.
- Identifiqueu els principals pigments presents en cadascuna de les mostres analitzades.
- Determineu la relació entre l'estructura química dels pigments i la seva mobilitat (Rf) en les condicions utilitzades en la cromatografia de capa prima.