

Una experiencia sencilla con fundamentos complejos: la separación de pigmentos fotosintéticos mediante cromatografía sobre papel

Favio Daniel Torossi Baudino

Resumen: La separación mediante cromatografía sobre papel de los pigmentos fotosintéticos en general y de los de la espinaca en particular, frecuentemente es explicada en base a sus diferencias de solubilidad. Esta incorrección, junto a la percepción de una metodología considerada como una auténtica y pura partición entre dos fases líquidas inmiscibles, pone de manifiesto la necesidad de analizar y esclarecer el complejo entramado conceptual que subyace tras la aparente sencillez de esta clásica práctica de laboratorio. Los fundamentos teóricos y experimentales que permiten dilucidar parte de dicha complejidad se presentan, en este artículo, con la finalidad de propiciar modelos explicativos más coherentes con los fenómenos involucrados.

Palabras clave: Cromatografía; cromatografía sobre papel; pigmentos fotosintéticos; clorofila; polaridad.

Abstract: The separation of photosynthetic pigments by paper chromatography in general and those of the spinach in particular, frequently is explained on the basis of its differences of solubility. This incorrect explanation, next to the perception of a methodology considered like an authentic and pure partition between two immiscible liquid phases, shows the necessity to analyze and clarify the conceptual framed complex that sublies after the apparent simplicity of this classic laboratory practice. The theoretical and experimental foundations that allow to explain part of this complexity are presented, in this article, with purpose of causing more coherent explanatory models with the involved phenomena.

Keywords: Chromatography; paper chromatography; photosynthetic pigments; chlorophyll; polarity.

Introducción

Sin lugar a dudas, la cromatografía (del griego *chroma*, color y *graphos*, escritura) está íntimamente relacionada con los pigmentos fotosintéticos. El término fue utilizado por el botánico ruso Tswett en su experiencia publicada en 1906, para definir el procedimiento de separar un extracto vegetal a través de una columna rellena con carbonato de calcio. Los diferentes colores de los pigmentos obtenidos no solo inspiraron al nombre sino además, propiciaron el inicio formal de una metodología que revolucionó los campos más diversos de la química. Su impacto científico fue confirmado cuando los británicos Martin y Syngé recibieron el Premio Nóbel en 1952 por la invención de la cromatografía de partición en el año 1941. Posteriormente, la utilización de trozos de papel en lugar de las tradicionales columnas, dieron origen a la cromatografía sobre papel descrita por Consden, Gordon y Martin en el año 1944.^[1]

Esta técnica, rápidamente adquirió una gran aplicación en la separación de mezclas complejas puesto que posibilitó al mismo tiempo, la identificación de los componentes por comparación con patrones específicos. El nuevo procedimiento no solo permitió la identificación de sustancias químicas sino además, el estudio y ejemplificación de muchos de los factores que intervienen y condicionan los propios procesos cromatográficos.^[2]

Desde diferentes disciplinas y con objetivos también diferentes, la separación mediante cromatografía sobre papel de los pigmentos fotosintéticos en general, y los de la espinaca



F. D. Torossi

Cátedra de Química Orgánica Ic. Facultad de Bromatología.
Universidad Nacional de Entre Ríos,
Perón N° 64, CP. 2820, Gualeguaychú, Argentina.
C-e: faviotorossi@yahoo.com.ar
Recibido: 28/02/2007. Aceptado: 12/04/2007.

en particular, es una actividad experimental clásica en los laboratorios de ciencias, tanto en los niveles de enseñanza básica como universitaria. Es ampliamente valorada por su utilidad, sencillez y economía. En efecto, los pigmentos contenidos en un extracto vegetal pueden ser separados simplemente depositando una pequeña muestra sobre el extremo de un papel particular, por el cual se hace fluir un disolvente por capilaridad. Pero a pesar de su simpleza, los fundamentos teóricos en los cuales se sustenta suelen prestarse a diferentes interpretaciones conceptuales, motivando explicaciones no siempre acertadas y factibles de generar confusiones y concepciones equivocadas.

El objetivo de este trabajo es intentar esclarecer algunos conceptos relacionados con la separación de estos pigmentos mediante cromatografía sobre papel, y proporcionar fundamentos tanto teóricos como experimentales, que permitan una mayor comprensión de los fenómenos involucrados en esta sencilla, pero al mismo tiempo, compleja experiencia de laboratorio.

El proceso de separación mediante cromatografía sobre papel

La IUPAC define a la cromatografía, como un método físico de separación mediante el cual los componentes de una mezcla se separan por distribución entre dos fases: una estacionaria (FE) y otra móvil (FM).^[3] El proceso de separación de cada sustancia es el resultado de un equilibrio entre dos conjuntos de fuerzas contrapuestas: las de propulsión, promovidas por el flujo de la fase móvil y las fuerzas de retención, originadas por la fase estacionaria.^[4,5] De este modo, cada sustancia migra de forma diferencial, conforme a sus propias características físicas y al tipo de fuerzas intermoleculares que pueda establecer con ambas fases.

Aunque diferentes criterios son utilizados para clasificar a los métodos cromatográficos en los cuales la fase móvil es un líquido, el basado en el tipo de mecanismo de separación que se establece entre las sustancias a separar y las fases involucradas es ampliamente compartido en la bibliografía (Tabla 1).^[4, 6, 7]

Tabla 1. Clasificación general de los métodos cromatográficos según el mecanismo de separación en cromatografía líquida.

<p>Cromatografía de adsorción: Las sustancias se separan por distribución entre una FM líquida y una estacionaria sólida llamada adsorbente, mediante equilibrios de adsorción y desorción.</p> <p>Cromatografía de partición: se efectúa entre una FM líquida y una FE también líquida, retenida en la superficie de un sólido. La separación de las sustancias se basa en las diferentes solubilidades que presenten entre ambas fases.</p> <p>Cromatografía de intercambio iónico: la separación se lleva a cabo mediante equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los contenidos en la superficie de una resina sólida que actúa como FE.</p> <p>Cromatografía de exclusión por tamaño: se basa en la habilidad que posee una FE de porosidad definida, para separar los componentes de una mezcla de acuerdo al tamaño efectivo de las moléculas.</p>
--

Si bien esta clasificación no es categórica, debido a la posible confluencia de diferentes mecanismos en una misma tipología, es oportuna para comenzar a esclarecer algunos conceptos inherentes a la cromatografía sobre papel (CP) convencional, es decir, la que no se realiza con papeles impregnados o químicamente modificados. Mientras que algunos autores la consideran como un proceso de partición,^[8] otros la clasifican como de adsorción,^[6,9] o una combinación entre ambas.^[10] Sin embargo, la primera clasificación es la que prevalece en los guiones de prácticas y manuales de laboratorio, donde usualmente es definida como una técnica cromatográfica mediante la cual, la separación de las sustancias se lleva a cabo por un proceso de partición entre una fase acuosa retenida sobre la superficie de un papel, y una fase móvil constituida por un disolvente o mezcla de disolventes que se desplaza sobre ella.^[11,12]

La cromatografía sobre papel ¿es realmente un proceso de partición?

Para dar una posible respuesta a esta pregunta es conveniente, en primer lugar, examinar la estructura del papel utilizado normalmente en esta técnica. La celulosa, su principal constituyente, consiste en largas cadenas de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico y estabilizadas paralelamente, a través de fuertes enlaces de hidrógeno. Esta disposición propicia la formación de agregados cristalinos muy ordenados junto a zonas más amorfas (Figura 1). Tanto el agua como otros disolventes hidrofílicos pueden absorberse en las zonas amorfas, quedando una parte enlazada químicamente a la celulosa y la otra, disponible para los procesos de separación cromatográfica.^[4] Así, el papel, que en condiciones de aire seco, contiene alrededor de un 5% de agua, puede absorberla hasta en una proporción del 20%.^[6,13]

En un principio, se creyó que la separación de las sustancias sólo se debía a un reparto entre el disolvente y el agua retenida por el papel, y se acordó darle el nombre de cromatografía de reparto sobre papel.^[13] Sin embargo, trabajos posteriores demostraron que no todos los efectos encontrados podían explicarse por un simple reparto,^[5,8,10,13] y que la existencia de una película de agua recubriendo al papel como un auténtico sistema de partición entre dos fases líquidas inmiscibles no es la forma más adecuada de representar al proceso de separación, puesto que disolventes como el agua o miscibles en ella, también pueden ser utilizados.^[6,8]

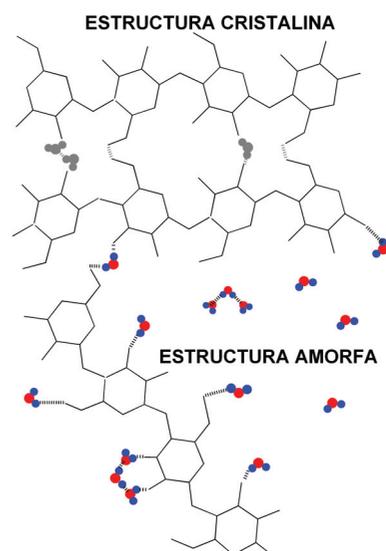


Figura 1. Esquema de la estructura del papel para cromatografía. El agua absorbida en la zona amorfa es la disponible para los procesos de separación. (Adaptado de los trabajos de Consden^[14] y Khan & Pilper.^[15]).

Algunos autores postulan la existencia de una fase estacionaria constituida por pequeñas *células elementales*, en las cuales el reparto de las sustancias se produce entre el agua retenida por ellas y el disolvente que las atraviesa.^[5,19] Otros la interpretan como un *complejo celulosa-agua* o una *solución concentrada de polisacárido*,^[14] y como finísimas capas de moléculas de agua que, sin formar una auténtica interfase, se unen a los grupos hidroxilo libres de la celulosa, constituyendo la fase estacionaria que adsorbe los solutos desde la disolución en movimiento.^[6,8] Dada la complejidad de los fenómenos presentados en CP, muchos modelos, e inclusive, teorías matemáticas han intentado interpretarlos. Pero la información empírica ha dado más explicaciones que la propia discusión teórica, de ahí la pertinencia de la última frase del segundo párrafo de este artículo. No obstante, y considerando el actual estado de la cuestión, es más factible emitir juicios sobre cuales no son los modelos que se corresponden con dicha evidencia experimental, más que dar una teoría inequívoca del mecanismo de separación. Así, debe quedar claro que el papel utilizado en este tipo de cromatografía no es un soporte inerte, como se lo presenta en muchos libros de texto, y que la simpleza misma de esta técnica encierra un complejo entramado de mecanismos que van desde la partición, adsorción y hasta el intercambio iónico, dependiendo del tipo de sustancias a separar, de los disolventes utilizados y de las condiciones operativas de trabajo.^[4,9,10,13,14]

La caracterización general de la CP como proceso de partición puede fundamentarse en el hecho que desde su invención, se concibió como un cambio de soporte para continuar los estudios iniciados por Martin y Syngé en la separación de aminoácidos mediante columnas, operando bajo un principio de partición líquido-líquido,^[1] y que, generalmente, es utilizada para la separación de sustancias hidrosolubles como aminoácidos, azúcares o colorantes por ejemplo, donde el agua retenida en el papel cumple una función primordial. Pero, como se verá en el próximo apartado, no todas las sustancias factibles de ser separadas mediante CP lo hacen a través de un mecanismo basado solo en la partición.

Separación de los pigmentos fotosintéticos mediante cromatografía sobre papel

Los pigmentos fotosintéticos de las plantas superiores están representados por las clorofilas *a* y *b*, y un amplio grupo de sustancias denominadas carotenoides, que se dividen en carotenos y xantófilas.^[17] Las moléculas de clorofila poseen un átomo central de Mg contenido en un anillo de porfirina junto a un alcohol insaturado llamado fitol (Figura 2). Ambas estructuras sólo difieren en el sustituyente del carbono C-3. Mientras que la clorofila *a*, posee un grupo metilo (-CH₃), la *b* dispone de un grupo aldehído (-CHO). Esta sutil diferencia no solo se traduce en cambios de coloración, un verde azulado para la clorofila *a* y verde amarillento para la *b*, sino además, en una mayor polaridad de esta última con respecto a la primera.^[17,18]

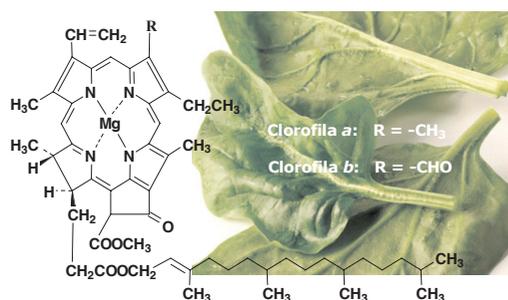


Figura 2. Estructura de las clorofilas *a* y *b*. La diferencia entre ambas radica en el sustituyente (R) del carbono C-3. La polaridad de la molécula está dada por el núcleo tetrapirrólico mientras que su naturaleza hidrofóbica, está originada por la presencia de la larga cadena de fitol.

Los carotenos son hidrocarburos que contienen únicamente hidrógeno y carbono, son solubles en disolventes no polares, poseen coloraciones que van desde el amarillo hasta el anaranjado y los más abundantes son el β -caroteno y el α -caroteno. Las xantófilas en cambio, son derivados oxigenados de los anteriores, solubles en alcohol, con coloraciones generalmente amarillas y las más abundantes son la luteína y violaxantina. (Figura 3).^[2,17]

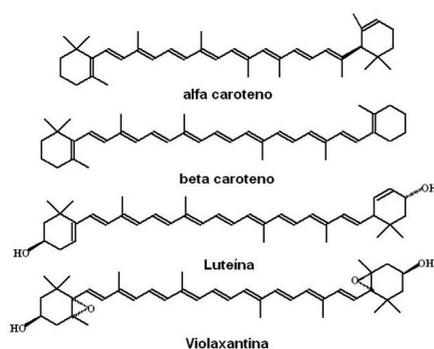


Figura 3. Principales carotenos y xantófilas presentes en los pigmentos fotosintéticos de las plantas superiores.

Debido a las diferentes solubilidades que presentan estos pigmentos en los disolventes orgánicos, es muy usual que en los guiones de prácticas y en algunos textos se tome como parámetro esa diferencia para explicar su separación mediante cromatografía sobre papel, lo cual es un error.^[16] En efecto, esta idea, asociada a la concepción de un proceso de sepa-

ración como una auténtica y pura partición, dónde la diferencia de solubilidad de una sustancia con respecto a las dos fases líquidas condiciona su retención o su movilidad, no es correcta para el caso de la separación de estos pigmentos, puesto que de ser así, ninguno se podría separar, dado que todos son hidrofóbicos y con solubilidades semejantes entre miembros de una misma clase.^[16,17]

La separación de los pigmentos fotosintéticos mediante cromatografía sobre papel transcurre fundamentalmente, a través de un mecanismo de adsorción física (fenómeno superficial diferente al de absorción), dónde se establecen una serie de equilibrios de adsorción-desorción que dependen de la polaridad de cada pigmento y del tipo de fuerzas intermoleculares que puedan establecer con los hidroxilos libres de la celulosa del papel y con la estructura del disolvente de la fase móvil. Así, la clorofila *b*, más polar que la *a*, se adsorbe más intensamente y presenta, en consecuencia, un factor de retardo (R_f) menor. Los carotenos en cambio, son hidrocarburos, y aunque la deslocalización de los electrones pi de sus estructuras le otorguen una mayor preponderancia de fuerzas del tipo van der Waals,^[12] no son lo suficientemente fuertes como para interactuar con la estructura del papel, por lo que quedan disueltos en la fase móvil y arrastrados por ella, presentando en consecuencia, un factor de retardo mayor.

El disolvente o eluyente (como también suele nombrarse a la fase móvil en cromatografía) no solo actúa como fuerza propulsora sino que, además, su propia estructura química contribuye a que los pigmentos puedan separarse mediante sucesivos equilibrios de adsorción-desorción. Si el mismo sólo estuviese constituido por un disolvente no polar como el hexano o el éter de petróleo, las clorofilas no se podrían separar puesto que quedarían adsorbidas en el punto de aplicación. La adición de una pequeña proporción de un disolvente polar como la acetona, por ejemplo, en el cual ellas son solubles, posibilitará el establecimiento de esa serie de equilibrios y, por ende, su separación. Como puede apreciarse, la solubilidad de cada pigmento en la fase móvil tiene importancia, pero ella, por si sola, no explica su separación. La polaridad del eluyente es un factor clave en la separación cromatográfica y además, causa de una confusión semántica que se abordará en el próximo apartado.

Diferentes acepciones para el término polaridad

Los procesos de separación llevados a cabo mediante cromatografía líquida en general, y sobre papel en particular, requieren de un adecuado equilibrio de fuerzas intermoleculares entre soluto, fase móvil y fase estacionaria. Estas fuerzas se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa a cada uno de ellos.^[7] Es decir, el término "polar" se utiliza tanto para describir las sustancias a cromatografiar, como a las fases estacionarias y a los disolventes utilizados como fase móvil. En el caso de estos últimos, se los caracteriza en términos de polaridad, a pesar de que no todos posean un momento dipolar. Esto puede ser fuente de confusión,^[13] y no siempre es debidamente aclarado. Recordemos que una sustancia es polar cuando posee un momento dipolar.^[20] En cromatografía, la polaridad de los disolventes se describe mediante ciertos índices, como el de Polaridad P' de Snyder (para cromatografía de partición) o la fuerza eluyente ϵ^0 (para cromatografía de adsorción), que son parámetros relativos de

polaridades y fuerzas eluyentes,^[7] pero que no tienen que ver con la polaridad en términos de momento dipolar. Así, es usual presentarles a los alumnos los disolventes más utilizados en CP, ordenados conforme a su polaridad relativa, mediante la denominada serie eluotrópica (Tabla 2).^[7,10] En esta serie, por ejemplo, el tetracloruro de carbono es más polar que el hexano en términos cromatográficos, aunque ninguno de los dos posea un momento dipolar. Los disolventes utilizados en cromatografía como fase móvil, usualmente son denominados como eluyentes, término mediante el cual se referirá a ellos, a partir de esta sección.

Tabla 2. Serie eluotrópica de disolventes ordenados de acuerdo a su polaridad relativa creciente, según Skoog et. al.^[7] y Miller.^[10]

Disolvente	Índice de polaridad P'
Pentano	0,0
Éter de petróleo	0,01
Ciclohexano	0,04
Hexano	0,1
Tetracloruro de carbono	1,6
Tolueno	2,4
Benceno	2,7
Cloruro de metileno	3,1
n-propanol	4,0
Tetrahidrofurano	4,0
Cloroformo	4,1
Étanol	4,3
Acetato de etilo	4,4
Dioxano	4,8
Acetona	5,1
Metanol	5,1
Agua	10,2

Algunas consideraciones experimentales

Aunque la cromatografía sobre papel es una técnica extremadamente sencilla, es frecuente observar en la bibliografía, procedimientos que minimizan la importancia de variables fundamentales en la separación de los pigmentos, o que priorizan en otros casos, cuestiones irrelevantes, dando como resultado, cromatogramas con separaciones muy imprecisas que desvirtúan claramente, la potencialidad práctica, conceptual y didáctica que posee la técnica. A continuación, se exponen algunas consideraciones experimentales, con la finalidad de fundamentar y optimizar los procedimientos para después, al finalizar este apartado, presentar un protocolo experimental muy sencillo y con excelentes resultados, que puede implementarse en los laboratorios de docencia de cualquier nivel educativo.

La muestra de ensayo

¿Qué tiene de particular la espinaca para que siempre se la utilice en cromatografía sobre papel? La respuesta puede ser decepcionante, nada en especial que la diferencie, al menos en cuanto al tipo de pigmentos, de un perejil por ejemplo. Todas las plantas superiores poseen clorofilas *a* y *b* y carotenoides, siendo estos últimos susceptibles de presentar diferentes composiciones según el tipo de planta de la cual se trate.^[2] En cuanto a la concentración de los pigmentos fotosintéticos, no sólo varía entre especies, sino que depende entre otros fac-

tores, del estado nutricional de la planta, edad, factores medioambientales y de su historia lumínica previa.^[18,21] La utilización de la espinaca (*Spinacea oleracea L.*) se ha transformado en una costumbre, quizás, sostenida en el hecho que se trata de un alimento de consumo frecuente, de hojas tiernas y color verde muy intenso.

Extracción de los pigmentos

Si bien se han descrito múltiples procedimientos y disolventes, la extracción directa con acetona es muy utilizada debido a su polaridad, escasa selectividad y amplio margen de solubilización.^[22] El proceso de extracción debe ser rápido, en un ambiente fresco, con luz tenue y evitando disgregar la muestra con el disolvente, para no propiciar la formación de compuestos de degradación.^[5,18,22,23] Mientras que los carotenoides son bastante estables y sólo se han descrito oxidaciones e isomerizaciones posteriores al desarrollo de la cromatografía,^[2] las clorofilas, son muy lábiles, se degradan por el calor, los ácidos y por acción de la enzima clorofilasa del propio tejido vegetal. En medio débilmente ácido, se transforman fácilmente en *feofitinas a* y *b*, sustancias de color pardo oliva en las cuales se ha sustituido el magnesio por dos átomos de hidrógeno.^[2,5,18,23] La aparición de estos compuestos durante el desarrollo de la cromatografía (Figura 4) suele ser objeto de confusión, puesto que interfieren en el cromatograma y no son representativos del contenido pigmentario. Son compuestos de degradación que se forman fundamentalmente durante la cocción y el procesado de los alimentos,^[18] y en el caso de las prácticas de laboratorio, especialmente en el transcurso de la extracción.^[18,23] En efecto, al disgregar la muestra, los ácidos presentes en el vegetal catalizan su formación. Por ello, es muy importante que el procedimiento de extracción sea rápido y que la muestra se disgregue en presencia de sales magnésicas como el $MgCO_3$ ^[22] o $MgSO_4$,^[23] las cuales protegen electrostáticamente a la molécula de clorofila y absorben, al mismo tiempo, el agua presente en las hojas, optimizando así el proceso de extracción de los pigmentos.^[23]

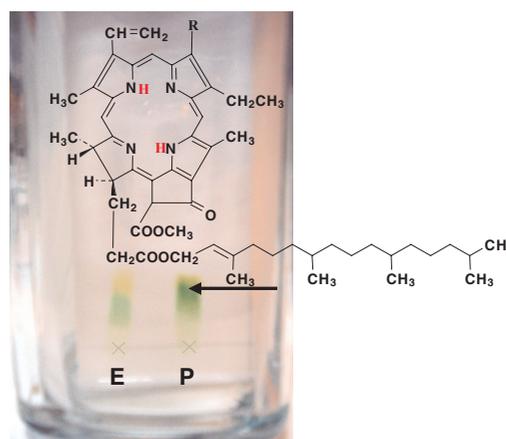


Figura 4. Desarrollo inicial de una cromatografía en la cual se ha aplicado una muestra de espinaca fresca (E) y una de perejil deshidratado (P). En este último, se observa la presencia de feofitinas originadas en el proceso de deshidratación. Las estructuras de las feofitinas no contienen Mg de ahí su menor polaridad que las clorofilas. Al igual que éstas, se diferencian solo por el sustituyente R. La *feofitina a* contiene un grupo metilo y la *feofitina b* un grupo aldehído.

Saturación de la cubeta, equilibrado del papel y condiciones de desarrollo

Bajo la concepción de un proceso regido por la partición, en un principio, se consideró muy importante el proceso de equilibrado, es decir, establecer un verdadero equilibrio termodinámico en el sistema cromatográfico antes de efectuar la experiencia.^[5] Así, los eluyentes se saturaban con agua, y las tiras de papel con las muestras aplicadas se colocaban horas antes dentro de las cubetas para que se saturaran con los vapores del eluyente. Estudios posteriores demostraron que se obtenían cromatogramas idénticos con distintos tiempos de equilibrado, y que dicho procedimiento solo era justificable cuando se utilizaban fases móviles muy complejas con mezclas de cuatro o más componentes.^[5] Actualmente, las cubetas deben saturarse con el eluyente durante unos 30 minutos, a fin de evitar que el mismo se evapore del papel durante el proceso de desarrollo. Si esto ocurriese, el aporte de FM al frente del eluyente puede ser insuficiente para la separación de las sustancias.^[6]

Como las alteraciones fotoquímicas se aceleran cuando los pigmentos están adsorbidos en las superficies cromatográficas,^[5,22] es una condición fundamental para el desarrollo, que la cubeta se proteja de la luz mediante papel de aluminio o una funda oscura.

Elección del eluyente

Aunque es una de las variables más importantes,^[4] nunca ha podido ser descrito un único eluyente que pueda separar de forma óptima a todos los pigmentos fotosintéticos, debido a sus diferentes polaridades.^[24] No obstante, con mezclas que contengan uno o varios disolventes no polares con una pequeña proporción de uno polar, se pueden separar e identificar los más representativos.^[24] Aunque las combinaciones pueden ser múltiples, los criterios de toxicidad, inflamabilidad y economía deben primar en la selección. Como se ha expresado anteriormente, no es necesario que el eluyente se sature con agua.

Tipos de papeles para cromatografía

La elección es importante puesto que del grosor y de la porosidad del papel dependerá la velocidad de desarrollo y la resolución. Aunque los papeles de filtro estándar son muy utilizados, son recomendable los de calidad controlada como los Whatman® N°1 o similar para fines analíticos y los 3MM para fines preparativos. Estos últimos, al ser más gruesos, permiten aplicar una mayor cantidad de muestra y aunque el tiempo de desarrollo es mayor, posibilitan una mejor resolución. Deben cortarse en lo posible, en el sentido de formación de la hoja (usualmente viene marcado), ya que la velocidad de desplazamiento del eluyente es distinta en la dirección de la fibra que perpendicularmente a ella.^[13]

Valores R_f: reproducibilidad e identificación de los pigmentos fotosintéticos

La identificación de los pigmentos a partir del cromatograma, suele llevarse a cabo mediante el parámetro R_f, factor de retardo o de retención, que representa la relación entre la dis-

tancia recorrida por cada pigmento y la del eluyente (Ecuación 1).^[4,5,13,19]

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el pigmento}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}}$$

Ecuación 1. El valor R_f oscila entre 0 y 1, los pigmentos más polares como las clorofilas tendrán un factor de retardo menor que los carotenos, por ejemplo, menos polares.

Este valor, en condiciones invariantes y específicas de trabajo puede ser utilizado para identificar a una sustancia, pero está condicionado por múltiples factores como la temperatura, características del papel, cantidad de muestra aplicada, dimensión y saturación de la cubeta, volumen, volatilidad y composición del eluyente, etc.^[4,5] Por lo que, para darlo como una característica propia de cada pigmento, es imprescindible especificar todas las condiciones en las que se ha realizado la experiencia, lo que obviamente no es sencillo. Por ello, como los valores R_f de compuestos lábiles como los pigmentos vegetales no suelen ser reproducibles, para identificarlos es habitual aplicar junto a la muestra problema, sustancias patrones de los pigmentos en estudio y desarrollar la cromatografía en paralelo.^[4,5] Debido a que estos pigmentos han sido ampliamente estudiados y que por medio de un eluyente con las características ya señaladas, su orden relativo de separación siempre es el mismo,^[5] pueden identificarse sin inconvenientes consultando la bibliografía.^[24] En el caso de los pigmentos fotosintéticos, la mayor utilidad del valor R_f no radica tanto como criterio de identificación, sino más bien, como indicador de la adsorción relativa de cada uno de ellos y para seleccionar, entre diferentes eluyentes, el que proporciona una mayor y mejor separación de los mismos.^[4]

Tanto las clorofilas como las feofitinas pueden detectarse por fluorescencia cuando son irradiadas con luz UV (254 nm) apareciendo, en consecuencia, una coloración rojo rosada sobre el cromatograma. Pero como esto puede acelerar la degradación de los pigmentos, debe hacerse después de haber marcado con lápiz cada una de las manchas.^[5,22]

Cantidad de muestra y aplicación sobre el papel

Una de las mayores causas de error y de resoluciones deficientes e indefinidas es la cantidad de muestra aplicada.^[2,4] Cuando se hace en exceso y/o no se tiene la precaución de dejar evaporar el disolvente entre cada aplicación, se obtienen separaciones con manchas superpuestas y, generalmente, con grandes colas difusas. Para papeles con fines analíticos, como los de filtro estándar, Whatman® N°1 o similar, la cantidad de muestra más adecuada es de 2 µL,^[2,4] pudiendo ser mayor en el caso de papeles más gruesos o de uso preparativo como el Whatman® 3MM. Un error frecuente en los guiones de práctica es recomendar la utilización de un secador de cabello con aire caliente para evaporar el disolvente entre cada aplicación. Usualmente no es necesario debido a la volatilidad de los mismos, pero si se utiliza, debe hacerse siempre con aire frío para evitar la degradación de los pigmentos.

Protocolo de experimentación

La experiencia se plantea a partir de la extracción de los pigmentos fotosintéticos de muestras de espinaca fresca (*Spinacea oleracea L.*) y de perejil deshidratado comercial

(*Petroselinum sativum L.*), para comprobar, en este último caso, la presencia de feofitinas originadas en el proceso de deshidratación. El método de extracción es directo^[23] y el desarrollo se efectúa mediante la modalidad ascendente con una mezcla de hexano-acetona (8,5:1,5 v/v) como eluyente.

Materiales y reactivos

- Hojas de espinaca fresca y perejil deshidratado comercial.
- MgSO₄ y arena de mar
- Disolvente de extracción: acetona
- Eluyente: 40 mL de una mezcla de hexano-acetona (8,5:1,5 v/v)
- Papel de filtro de calidad, Whatman® N°1 o similar de 5 x 21 cm
- Cubetas: pots de cristal de café de 20,5 cm de alto por 7 cm de diámetro, adaptados con una pequeña varilla de madera a presión para suspender el papel.
- Capilares de vidrio o micropipetas, mortero con pilón y material de vidrio de uso general.

Seguridad química



Tanto el hexano como la acetona son disolventes altamente inflamables por lo que se deberá trabajar lejos de llamas y/o fuentes de calor.

Procedimiento experimental

Se trituran en mortero 2 g de hojas de espinaca fresca, previamente secadas con papel absorbente, exentas de nervaduras y cortadas con tijera, junto a 2 g de MgSO₄ y 4 g de arena de mar durante pocos minutos. La pasta obtenida se transfiere a un tubo de ensayo y se añaden 8 mL de acetona, se tapa, se envuelve con papel aluminio y se agita de forma intermitente durante 10 minutos. Una vez obtenido el extracto, se trasvasa a un tubo de centrifuga para eliminar los sólidos en suspensión por centrifugación o bien se transfiere, mediante pipeta, a un tubo de ensayo pequeño para sembrar directamente. Con el perejil deshidratado se procede de la misma forma.

Antes de aplicar los extractos, se traza con lápiz una línea recta a 1,5 cm del borde inferior del papel, sobre la que se marcan dos pequeñas cruces separadas 1 cm entre sí y de los extremos de la tira para depositar las muestras sobre ellas, mediante capilares o micropipeta (2 µL o tres toques con capilares de diámetro interno no mayor a 2 mm), hasta formar una mancha nítida de 0,5 cm de diámetro, dejando evaporar el eluyente entre cada aplicación.

El papel se suspende dentro de la cubeta con la precaución de que el eluyente sólo alcance el punto de aplicación por capilaridad. Se cierra, se cubre con papel de aluminio o una funda oscura para evitar la fotodescomposición de los pigmentos y se deja desarrollar por espacio de 20 minutos hasta que el eluyente alcance una altura inferior a un cm del borde superior del doblez del papel. Una vez retirado, se traza la línea de máxima altura del eluyente, se seca con corriente de aire, se marcan las manchas de los diferentes pigmentos para determinar su orden de separación y se miden los correspondientes valores R_F para analizar la adsorción relativa de cada uno de ellos.

Evaluación del cromatograma e interpretación de resultados

Se presentan los resultados obtenidos a partir de la cromatografía efectuada a muestras de dos extractos diferentes: uno de espinaca fresca (E) y otro de perejil deshidratado (P).

Ambas muestras fueron aplicadas por duplicado sobre papel Whatman® 3MM de 10 x 19 cm el cual se dobló posteriormente en forma de V y se colocó dentro de la cubeta. Como eluyente se utilizó una mezcla de hexano-acetona (8,5:1,5 v/v) y el tiempo de desarrollo fue de 35 minutos. La identificación de cada uno de los pigmentos se efectuó conforme a su orden relativo de separación contrastado con los datos bibliográficos.^[2,4,24]

Como puede observarse en la Figura 5, el orden en que se eluyen los pigmentos es de forma inversa a su polaridad, es decir, los más polares quedan retenidos cerca de la línea de aplicación mientras que los menos polares, cerca de la línea de máxima altura del eluyente.

Generalmente, los β-caroteno y el α-caroteno se mueven con el frente del eluyente formando una sola mancha (5). Las xantófilas más comunes: luteína (4) y violaxantina (3), usualmente se distinguen debajo de los carotenos y su orden está en relación al número de átomos de oxígeno que posee la molécula. Algunas de las xantófilas más oxidadas como la neoxantina, suele quedar superpuesta con la clorofila *b* o quedar retenida cerca del punto de aplicación.^[24] Las feofitinas se pueden observar como una o dos manchas situadas usualmente entre los carotenos y la luteína (6). La clorofila *a* menos polar (2) siempre se localiza por encima de la clorofila *b*, más polar (1).

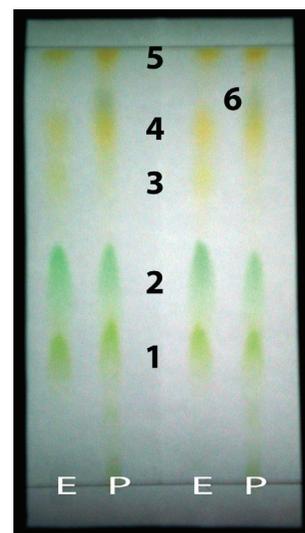


Figura 5. Cromatograma en papel Whatman® 3MM en el cual se han aplicado, por duplicado, una muestra de un extracto de espinaca fresca (E) junto a uno de perejil deshidratado (P). Los diferentes pigmentos se han identificado mediante los números: 1) clorofila *b*; 2) clorofila *a*; 3) violaxantina; 4)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

La presencia de feofitinas solo se observa en la muestra del extracto de perejil deshidratado. La aparición de estos productos de degradación en los alimentos procesados se debe fundamentalmente a la acción del calor, donde los cloroplastos se retraen y agrupan formando una masa de protoplasma coagulado. Así, la clorofila queda expuesta a la acción de la savia celular ácida, que propicia su degradación a feofitinas.^[25] En relación a las xantófilas del perejil, se observa un cierto grado de alteración con respecto a la espinaca. Esto es debido a que el alto grado de instauración de los carotenoides en general les hace susceptibles a la oxidación, dando lugar a la pérdida de color tras la deshidratación de los alimentos que los contienen.^[25]

Implicaciones didácticas

A partir del marco conceptual y experimental analizado en el presente artículo, las siguientes consideraciones deben ser tenidas en cuenta al momento de proporcionar explicaciones y fundamentos sobre la propia cromatografía en papel y sobre la separación de los pigmentos fotosintéticos mediante su aplicación.

- Al igual que otros polisacáridos como el almidón y el azúcar pulverizado, el papel no es un soporte inerte y puede actuar como un sólido con actividad superficial de diferentes formas: a) adsorbiendo sustancias mediante enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo; b) absorbiendo y adsorbiendo cantidades variables de agua donde las sustancias hidrosolubles pueden quedar retenidas; o c) propiciando procesos de intercambio iónico a través de los grupos carboxilos derivados de impurezas u oxidaciones de la propia celulosa.
- Dada la posibilidad de actuar mediante diferentes mecanismos, no siempre diferenciados y dependientes de múltiples factores operativos, sería más adecuado clasificar a la cromatografía sobre papel en función del tipo de soporte empleado para la fase estacionaria. Así, el término de cromatografía plana,^[6] que hace alusión a una fase estacionaria sólida extendida en contacto con una fase móvil líquida, se alejaría del condicionamiento que supone el mecanismo de separación y evitaría generar preconceptos y confusiones en los alumnos.
- La separación mediante cromatografía sobre papel de los pigmentos fotosintéticos en general, y de los de la espinaca en particular, transcurre fundamentalmente a través de un mecanismo de adsorción, donde se establecen una serie de equilibrios de adsorción-desorción que dependen de la polaridad de cada pigmento y del tipo de fuerzas intermoleculares que puedan establecer con la estructura del papel y la del eluyente.
- Las diferencias de solubilidad que presentan los pigmentos fotosintéticos con respecto a un eluyente determinado, por sí sola, no explica su separación, puesto que poseen solubilidades semejantes entre miembros de una misma clase. La solubilidad es una propiedad diferencial que posibilita los equilibrios de adsorción-desorción de acuerdo a la intensidad de las fuerzas intermoleculares que cada pigmento pueda establecer con la fase móvil y estacionaria. Al ser todos hidrofóbicos, las diferencias de solubilidad entre el eluyente y el agua contenida en el papel, tampoco es una explicación correcta para describir su separación.
- La percepción de una cromatografía sobre papel como una auténtica y pura partición entre dos fases líquidas inmiscibles y bien diferenciadas no es correcta puesto que el agua misma puede ser utilizada como eluyente. Los procesos de partición prevalecen en la separación de sustancias hidrofílicas, siempre que la fase móvil no sea agua o la contenga en gran proporción, puesto que de ser así, los procesos de adsorción regirían la separación.^[18]
- En cromatografía, el término polaridad posee una doble acepción que es necesario explicitar para que no se confunda con la polaridad en términos de momento dipolar.

Agradecimientos

A la Dra. Paulina Bermejo Benito de la Facultad de Farmacia. UCM y a la Dra. Manuela Martín Sánchez de la Facultad de Educación. UCM, por el apoyo y la posibilidad de disponer de los laboratorios para la puesta a punto de esta experiencia, y a la Agencia Española de Cooperación Internacional por la beca otorgada para realizar el Programa de Doctorado en el Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales de la Facultad de Educación. UCM.

Bibliografía

- [1] G. López Cueto. *Lección inaugural ciclo lectivo 2004/5*. Universidad de Alicante. España. **2004**
- [2] H. Strain, J. Sherma. *J. Chem. Educ.* **1969**, *46* (8), 476–483.
- [3] IUPAC. *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 819–872.
- [4] J. Sherma, G. Zweig, *Handbook of Chromatography. Volume II*. CRC Press. USA. **1972**
- [5] I. Smith, J. G. Feinberg. *Cromatografía sobre papel y capa fina*. Alambra. España. **1979**
- [6] A. Braithwaite, F. Smith, *Chromatographic Methods. 5th Ed.* Kluwer Academic Publisher. **2001**
- [7] D. Skoog, F. Holler, T. Nieman. *Principios de Análisis Instrumental. 5ª Ed.* Mc. Graw. Hill. España. **2003**
- [8] R. Stock, C. Rice. *Chromatographic Methods. 3rd Ed.* Chapman and Hall Ltd. London. **1974**.
- [9] P. Sewell, B. Clarke. *Chromatographic Separations*. John Wiley & Sons. Great Britain. **1987**
- [10] J. M. Miller, *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley & Sons. USA. **1988**
- [11] M. J. Insausti, P. Redondo, E. Charro. *Manual de experimentación básica en química*. UVA Universidad de Valladolid. España. **1999**.
- [12] D. Pavia, G. Lampman, G. Kriz, R. Engel. *Microscale and Macroscale Techniques in the Organic Laboratory*. Harcourt Collage Publishers. USA. **2002**.
- [13] D. R. Browning. *Cromatografía*. Toray Masson. Barcelona. **1971**.
- [14] R. Conden, The cellulose water complex. *Stationary phase in paper and thin layer chromatography*. Edit by K. Macek and I. Hais. Elsevier Pub. Co. The Netherlands. **1965**.
- [15] F. Khan, N. Pilper, *Powder Technol.* **1987**, *50*, 237–241.
- [16] P. Maitland, D. Maitland. *J. Biol. Educ.* **2002**, *37* (1), 6–8.
- [17] H. Curtis, S. Barnes, *Biología*, Médica Panamericana. Buenos Aires. **2005**
- [18] S. J. Schawartz, T. V. Lorenzo. *Food Sci. Nutr.* **1990**, *29* (1), 1–17
- [19] D. Abbott, R. S. Andrews. *Introducción a la cromatografía. 3ra Ed.* Alambra. España. **1973**
- [20] F. Carey. *Química Orgánica. 6ª Edición*. Mc Graw Hill. México. **2006**.
- [21] E. Manrique. *Ecosistemas*. **2003**, Año XII, 1
- [22] M. C. Rodríguez Doderó, I. Moreno Garrido. *An. Quím.* **2002**, *3*, 34–39.
- [23] H. Quach, R. Steeper, W. Griffin. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*(3), 385–387.
- [24] Z. Sestak. *Chromatographic Reviews*. **1959**, 65–97.
- [25] D. B. Ott, *Manual de laboratorio de ciencias de los alimentos*. Acribia. España. **1992**.