



***El color dels
vegetals:
antioxidants i salut***

Treball de Recerca de batxillerat
desembre de 2010

Agraïments

També vull agrair als meus pares per totes les facilitats i ànims que m'han donat, com també l'interés i els ajuts d'última hora.

Finalment voldria agrair al meu tutor de recerca, que m'ha guiat i aconsellat en tot el procés del treball.

Índex

1. Introducció	5
1.1. Els aliments	5
1.2. Objectius	6
1.3. Metodologia i dificultats	7
2. La llum i la visió en color	8
2.1. Naturalesa de la llum	8
2.2. La visió dels colors	9
2.2.1. La influència de l'evolució de l'atmosfera i les radiacions solars	10
2.2.2. La visió	12
2.2.3. Visió en color	12
3. Els aliments i el color	15
3.1. El color dels vegetals	15
3.1.1. Els pigments dels vegetals	16
3.1.2. Altres funcions dels pigments en els vegetals i les plantes	17
3.1.2.1. Fotosíntesi	18
3.1.2.2. Funcions dels pigments en la fotosíntesi	19
3.1.2.3. La pol·linització	19
4. Substàncies responsables del color	20
4.1. Carotenoides	20
4.1.1. Carotens	22
4.1.1.1. Beta carotè	22
4.1.1.2. Alfa carotè	24
4.1.1.3. Licopè	24
4.1.2. Xantofil·les: la luteïna	27
4.2. Flavonoides	28

4.2.1. Antocians.....	29
5. Funció dels pigments en l'organisme	20
5.1. Funció dels pigments en l'organisme.....	30
5.2. Els radicals lliures.....	30
5.2.1. Accions biològiques dels radicals lliures d'oxigen.....	31
5.2.2. Malalties provocades pels radicals lliures.....	32
5.3. Defenses contra els radicals lliures: els antioxidants	35
5.4. Classificació dels antioxidants.....	35
5.4.1. Antioxidants endògens.....	35
5.4.2. Antioxidants exògens	38
5.5. Els antioxidants i les malalties	38
5.5.1. Els antioxidants i el càncer	38
5.5.2. Els antioxidants i les malalties neurodegeneratives	39
6. Funció en l'organisme dels pigments vegetals	20
6.1. Beta carotens	40
6.1.1. Funcions metabòliques de la vitamina A.....	41
6.1.2. Beta carotens i vitamina A.....	42
6.2. Alfa carotens	42
6.3. Licopè	43
7. Procés experimental.....	20
7.1. Introducció i justificació de la part experimental.....	44
7.2. Pla de treball	45
7.3. Experiències realitzades	46
7.3.1. Assaigs previs d'extracció dels pigments en tomàquet.....	46
7.3.2. Assaigs previs per a la separació dels pigments per CCP.....	48

7.3.2.1. Assaig per a determinar el poder d'elució dels dissolvents.....	49
7.3.3. Assaig per a la purificació de l'extracte	52
7.3.4. Extracció de pigments del tomàquet amb dissolvents hidrofòbics. Assaig alternatiu al 7.3.1.	54
7.3.5. Aïllament dels carotens per cromatografia en capa prima.....	55
7.3.6. Obtenció de beta carotè i licopè a macro escala.	60
7.3.7. Aïllament dels pigments per a cromatografia en columna	62
7.3.8. Anàlisi d'espectrofotometria Ultraviolada-Visible de beta carotè i licopè	66
8. Conclusions finals	72
8.1. Conclusions de la part teòrica del treball	72
8.2. Conclusions de la part experimental del treball.....	73
8.3. Opinió personal.....	74
9. Bibliografia	75
Annex A1. Fonaments teòrics en l'anàlisi dels pigments vegetals.....	20
A1.1. Extracció del colorant	79
A1.1.1. Extracció del colorant.....	79
A1.1.2. Decantació	80
A1.2. Determinació dels pigments.....	81
A1.2.1. Cromatografia en capa prima (CCP).....	81
A1.2.2. Cromatografia en columna (líquida)	82
A1.2.3. Espectroscòpia ultraviolada - visible	83
Annex A2. Protocol per a l'extracció i caracterització dels pigments del tomàquet	88
A2.1. Extracció dels pigments vegetals del tomàquet.....	89
A2.2. Anàlisi dels extractes per Cromatografia en capa prima	91
A2.3. Aïllament dels pigments per cromatografia líquida en columna	92
A2.2. Anàlisi dels extractes per espectrofotometria Ultraviolada-Visible	93

1. Introducció

1.1. Els aliments

Escollir el tema del treball de recerca sempre és una elecció molt complicada. Hi ha tants factors a tenir en compte que cap dels temes proposats semblen ser adients. Des del primer moment em vaig decantar per un treball relacionat amb la biologia, i més específicament amb temes relacionats amb la medicina. També m'interessava que fos un treball on la part pràctica hi tingués un paper important per a poder extreure les meves pròpies conclusions i experiència del tema escollit. Finalment, i després de descartar-ne molts d'altres, se'm va proposar un treball basat en el color dels aliments i les funcions que aquests colorants fan en l'organisme.

Al principi, el treball havia de tenir una part teòrica i una petita part experimental, per això a l'estiu vaig començar a fer la recerca d'informació per a la part teòrica. Al començar les pràctiques ens vam trobar amb un seguit de dificultats que ens portarien a fer diversos assaigs per aconseguir els resultats que buscàvem. Per aquest motiu el treball conté una part molt àmplia de laboratori, com també una recerca força extensa.

El cos humà per funcionar necessita consumir una certa quantitat d'energia. El combustible que ens proporciona aquesta energia prové bàsicament dels aliments que ingerim. Tots els productes bàsics que necessita el cos humà s'anomenen nutrients i aquests no es troben en el món físic en l'estat en que el cos els necessita, sinó combinats entre ells i amb altres productes; per tant hi ha d'haver un seguit de transformacions dins de l'organisme per a aconseguir extreure aquests nutrients específics.

Així doncs, els aliments són imprescindibles per al funcionament del cos humà. Analitzar els aliments consisteix en identificar quins nutrients contenen, per saber els efectes que tindran sobre el cos humà.

És en aquest context que s'emmarca el present treball de recerca. ***'El color dels vegetals: antioxidants i salut'*** pretén fer un estudi sobre el color de les fruites i verdures. En aquest estudi s'identificaran els compostos químics que provoquen els determinats colors en els grups d'aliments esmentats, i s'estudiaran els efectes que aquests compostos produeixen en el cos humà quan es prenen com a aliments.

El treball tindrà una part teòrica en la qual es cercaran alguns dels pigments vegetals i el seu efecte en la salut de les persones quan s'ingereixen, i una segona part de laboratori en la qual s'analitzaran diferents aliments per a identificar els pigments que contenen.

1.2. Objectius

El present treball de recerca es divideix en quatre grans blocs. Els tres primers es basen en la recerca i recopilació bibliogràfica. El bloc 4 comporta una recerca experimental.

Bloc 1 – La llum i la visió en color

El primer bloc parla de la llum i els colors. Atès que sense llum no hi ha colors, i que l'òrgan de la vista és el que ens serveix per a detectar-los, l'objectiu d'aquest primer apartat és el de conèixer la naturalesa de la llum, per una banda, i el funcionament de l'òrgan de la vista per l'altra.

Bloc 2 – El color dels vegetals

En el segon bloc s'introdueix el color dels vegetals. L'objectiu, per tant, és el de conèixer diferents pigments vegetals que donen color a les fruites i verdures.

Bloc 3 – Funció en l'organisme dels pigments vegetals

En el tercer bloc l'objectiu és el d'estudiar la funció com a antioxidants dels pigments dels aliments en l'organisme humà.

Bloc 4 – Procés experimental

El quart bloc del treball recull la part experimental, que té com a objectius investigar l'extracció, aïllament i caracterització de pigments vegetals.

1.3. Metodologia i dificultats

El treball s'ha estructurat en base a les pràctiques de laboratori, d'aquesta manera s'han escollit uns límits a estudiar per a poder fer-ne un correcte desenvolupament.

- Bloc 1, 2 i 3: recopilació bibliogràfica.
- Bloc 4: comporta una recerca experimental: s'ha plantejat considerant les següents hipòtesis:
 - 1- S'utilitzaran dissolvents orgànics apolars per extreure pigments vegetals apolars (licopè i beta carotè) i dissolvents orgànics polars per extreure els pigments polars (flavonoides).
 - 2- Un cop extrets i purificats, per analitzar els pigments de cada extracte, s'utilitzaran diferents eluents per a la separació dels components de cada pigment per CCP.¹
 - 3- Els components extrets amb els mateixos dissolvents i RF en CCP, tindran la mateixa estructura. Això es podrà comprovar en base al seu espectre d'absorció UVV-VIS.²

Pel que fa a les dificultats, podríem destacar-ne una: el temps, ja que fer un estudi experimental comporta molta dedicació i constància. Això és degut al fet que si els resultats no són els esperats, s'han de tornar a repetir les experiències. Per qüestions personals durant el mes de juliol no vaig poder realitzar la part experimental, i com que durant el mes d'agost els laboratoris estan tancats, he hagut de combinar els estudis amb llargues hores d'experimentació per a la confecció de la part pràctica durant aquests últims mesos.

¹ CCP: cromatografia en capa prima

² UVV-VIS: ultravioleta visible

2. La llum i la visió en color

2.1. Naturalesa de la llum

En el món físic, tots els cossos que tenen una determinada temperatura estan constituïts per molècules, àtoms i altres partícules que vibren o oscil·len. Quan l'oscil·lació és prou ràpida i prou potent, emeten una certa quantitat d'energia cap a l'exterior del propi cos. Aquesta energia emesa és la llum. Hi ha dues teories que intenten explicar la naturalesa de la llum:

Segons la **teoria corpuscular de la llum**, els cossos calents emeten corpuscles (fotons) a gran velocitat i en totes direccions. Els **fotons** són partícules sense massa i sense càrrega elèctrica que porten associada una certa energia. Així doncs, l'energia associada a la llum no és contínua, sinó que està quantificada.

Segons la **teoria ondulatoria de la llum**, les càrregues accelerades presents en els cossos calents emeten una radiació electromagnètica que es propaga com a resultat de vibracions de l'èter (són ones que es mouen per l'espai com ho fa el so).

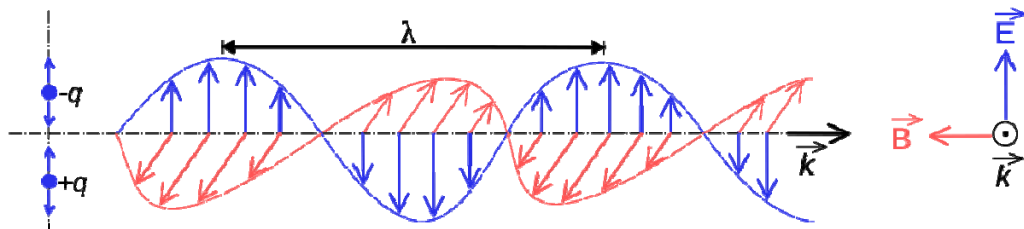


Fig. 2.1. Radiació electromagnètica. (Font 1)

La integració de les dues teories es deu a De Broglie, qui va determinar que tot corpuscle en moviment té associat una ona i, per tant, es pot estudiar la llum bé com a corpuscles, bé com a ones.

La radiació que els cossos emeten es caracteritza per la seva freqüència d'oscil·lació o, pel que és equivalent, per la seva longitud d'ona (la **longitud d'ona** és la inversa de la **freqüència d'oscil·lació de la radiació**, i equival a la distància entre dues crestes o dues valls de l'ona radiada. És la λ de la **Fig. 2.1**). L'energia associada a una determinada radiació és inversament proporcional a la seva longitud d'ona. Així doncs, les radiacions

que tenen longituds d'ona llargues tenen menys energia que les curtes. Per tant, la llum vermella serà menys energètica que la violada.

El conjunt de totes les radiacions electromagnètiques possibles en el món físic s'anomena **espectre electromagnètic**, i està format per radiacions de totes les longituds d'ona.

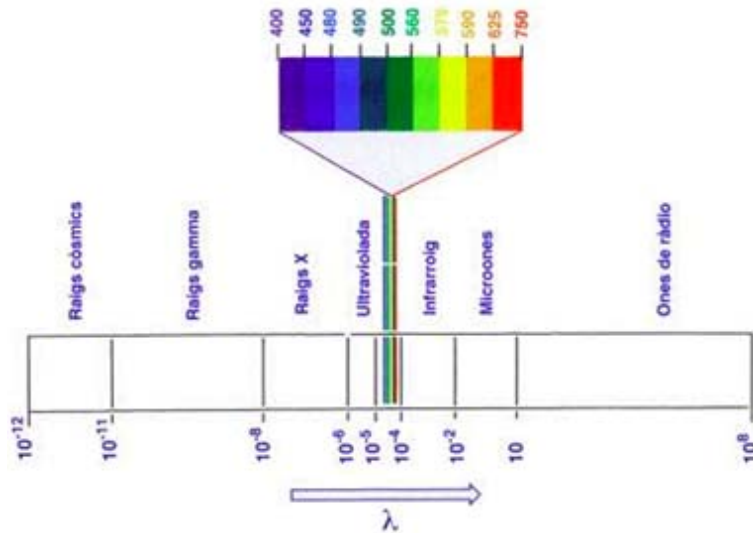


Fig. 2.2. Espectre electromagnètic on es mostren les longituds d'ona corresponents a cada tipus d'ona. (Font 2)

La **llum visible** és la part de l'**espectre electromagnètic** visible per a l'ull humà. L'ull humà és sensible a les radiacions amb longituds d'ona compreses, aproximadament, entre 400nm i 700nm. Per tant, la llum visible és el conjunt de radiacions electromagnètiques de longituds d'ona compreses entre 400nm i 700nm. Com més llarga sigui la longitud d'ona (a prop dels 700nm) el seu color visible estarà més a prop del vermell; en canvi, com més curta sigui més s'acostarà al violeta. Per sobre de la longitud d'ona del vermell s'hi troben els infrarojos, i per sota del violeta hi ha la llum ultraviolada.

2.2. La visió dels colors

Actualment els ulls simples dels vertebrats són capaços d'enfocar i captar escenes amb gran precisió, degut a les seves lents flexibles i als nombrosos receptors de la seva retina. Alguns vertebrats tant terrestres com sobretot aquàtics han desenvolupat ulls a banda i banda del seu cos, aconseguint així un camp de visió lateral molt més ampli per a protegir-se dels depredadors.

Quan els primats van començar a viure sobre els arbres es van trobar amb un nou problema: la visió lateral no ajudava a trobar superfícies estables dins de l'entramat de branques; per això els habitants dels arbres van desenvolupar cares més planes amb els ulls mirant al front. Això els va permetre fondre les dues imatges en una tridimensional i, a més, va requerir un major desenvolupament dels seus cervells. El perfeccionament de la visió i la percepció de profunditat va provocar la reducció de la importància del sentit de l'olfacte i un increment de l'habilitat manual. Els humans moderns som exemples extrems d'aquestes conseqüències.

2.2.1. La influència de l'evolució de l'atmosfera i les radiacions solars

L'Univers emet llum en totes les longituds d'ona de l'espectre electromagnètic, però la majoria d'aquesta llum no arriba a la superfície de la Terra, ja que és bloquejada per l'atmosfera. Això passa amb els rajos X, els rajos gamma i els ultraviolats, que si arribessin a la superfície terrestre hi farien impossible l'existència de vida. L'atmosfera també bloqueja la majoria de la radiació infraroja, així com les ones de ràdio menys energètiques. En la **Fig. 2.3** es mostra el comportament de l'atmosfera pel que fa a les radiacions que deixa passar a través seu.

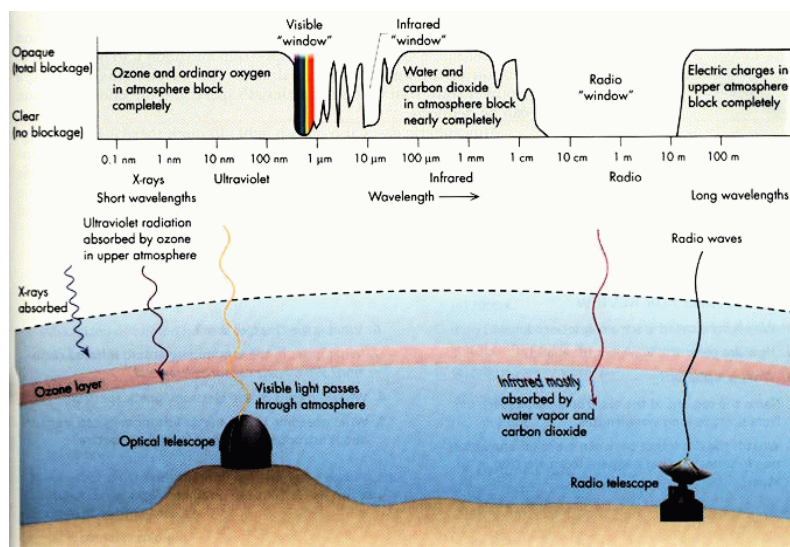


Fig. 2.3. Comportament de l'atmosfera en relació a les longituds d'ona que filtra. (Font 3)

L'atmosfera terrestre es va formar a partir del gas alliberat per la Terra i va evolucionar mitjançant les interaccions entre l'escorça terrestre, l'atmosfera gasosa i la vida

primigènia. El punt més significatiu dins d'aquest desenvolupament fins a l'atmosfera actual va ser l'aparició de plantes verdes fotosintètiques. Les algues verdoses varen ser els primers organismes amb la capacitat de prendre l'energia de la llum solar i desprendre oxigen com a producte de la reacció. A mesura que l'oxigen es va anar acumulant en l'atmosfera, varen proliferar organismes aeròbics eucariotes i varen donar lloc a tota la vida multicel·lular actual.

L'actual capa protectora d'ozó de l'atmosfera filtra pràcticament tota la radiació ultraviolada per sota dels 280nm. D'aquesta manera, l'ozó de l'atmosfera absorbeix la majoria d'aquesta radiació letal emanada pel Sol, permetent la vida a la terra.

Mentre que l'oxigen i la capa d'ozó protegien la vida de les radiacions perjudicials com les ultraviolades, l'aigua i el diòxid de carboni reduïen els nivells de les radiacions infraroges en el nostre entorn. La major intensitat de la radiació del Sol que penetra en la nostra atmosfera està localitzada a la part visible de l'espectre electromagnètic.

Així doncs, es pot afirmar que a causa dels efectes combinats del Sol i de l'atmosfera al llarg de l'evolució dels vertebrats, hem heretat capacitats de visió a la regió de l'espectre electromagnètic on el Sol ofereix la seva major intensitat de radiació.

Però, per què veiem en el rang de 400nm a 700nm?

Tal com s'ha exposat amb anterioritat, diversos gasos atmosfèrics, i principalment el vapor d'aigua, redueixen la intensitat de la radiació solar infraroja que arriba a la superfície de la Terra. Si a aquesta interferència per fonts terrestres, hi afegim que els infrarojos tenen relativament poca energia, i que són emanats en baixes intensitats des del Sol, aleshores la radiació infraroja que arriba als nostres ulls és insuficient per proporcionar les diferents sensacions que percebem amb la vista. Per tant, els nostres ulls s'han adaptat per no veure per sota del vermell.

Per l'altra banda, l'ozó atmosfèric bloqueja les radiacions per sota de 280nm. Aquest rang de l'espectre és clarament inservible per a la visió ja que és inaccessible. La porció de raigs ultraviolats que arriba fins a nosaltres (de 280nm a 400nm) està reduïda en gran part per l'ozó, però arriba en suficient quantitat per causar reaccions biològiques com increments en la producció de melanina i danys genètics com el càncer de pell. Atès el seu potencial destructiu, és lògic en termes evolutius que haguem apartat els nostres ulls de la llum ultraviolada.

2.2.2. La visió

La **visió** és un sentit que consisteix en l'habilitat de detectar la llum i d'interpretar-la. La visió és pròpia dels animals, que hi tenen un sistema dedicat, anomenat sistema visual.

La primera part del sistema visual s'encarrega de formar la imatge òptica de l'estímul visual en la retina (sistema òptic), on les seves cèl·lules són les responsables de processar la informació. Les primeres a intervenir són els fotoreceptors, que capturen la llum que incideix sobre ells. N'hi ha de dos tipus: els cons i els bastons. Altres cèl·lules de la retina s'encarreguen de transformar aquesta llum en impulsos electroquímics i de transportar-los fins al nervi òptic. Des d'allà, es projecten al cervell. En el cervell es realitza el procés de formar els colors i reconstruir les distàncies, moviments i formes dels objectes observats.

Les cèl·lules sensorials de la retina reaccionen de manera diferent a la llum i les seves longituds d'ona. Els bastons s'activen en condicions de poca llum, i només permeten distingir el negre, el blanc i els diferents grisos. Els cons, en canvi, només s'activen quan els nivells d'il·luminació són prou elevats, i capten radiacions electromagnètiques, raigs de llum, que més tard donaran lloc a impressions òptiques. Els cons són acumuladors de quants de llum, que transformen en impulsos elèctrics. Hi ha tres classes de cons, cadascun dels quals té un fotopigment que només detecta unes longituds d'ona concretes, les longituds d'ona que transformades en el cervell es corresponen aproximadament als colors blau, vermell i verd. La resposta dels tres grups de cons barrejats permet formar l'espectre complet de llum visible.

2.2.3. Visió en color

El sistema visual humà és capaç de detectar el rang de l'espectre electromagnètic que va des dels 400nm (violeta) fins als 700nm (vermell), aproximadament. El nostre sistema visual percep aquest rang de longituds d'ona com un continu gradient de colors, que anomenem **espectre visual**.

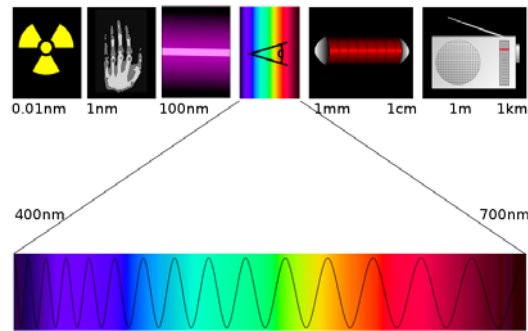


Fig. 2.4. Espectre visual.

L'ull humà té un sistema de lents (còrnia principalment, i cristal·lí) i un diafragma (iris) que el fan assemblar a les funcionalitats d'una càmera fotogràfica.

El sistema de visió en color està desenvolupat principalment com un sistema per a ser usat a la llum del dia, i deixa de treballar bé amb nivells molt baixos d'il·luminació. Els fotoreceptors associats amb aquest sistema de visió en color a alta resolució es troben concentrats en la fòvea.

Els fotoreceptors capaços de treballar amb un ampli rang de nivells d'il·luminació i que proveeixen una ràpida resposta als canvis es denominen *bastons*. La percepció d'imatges en alta resolució en color la proporcionen els *cons*. La *Fig. 2.5* mostra un dibuix dels bastons i dels cons.

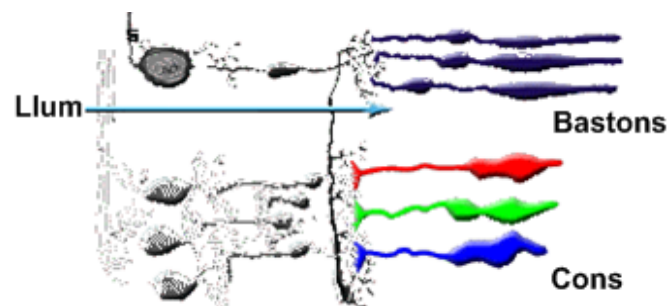


Fig. 2.5. Situació dels cons i dels bastons en l'ull humà.

Els cons dels nostres ulls tenen tres grups de fotoreceptors sensibles al color, amb pics de sensibilitat que corresponen al vermell (564 nm), verd (534 nm) i blau (420 nm). Nosaltres identifiquem aquestes longituds d'ona com el vermell, el verd i el blau, els colors primaris. La llum d'una longitud d'ona qualsevol dins de l'espectre visible (des de 400 a 700nm) excitarà un o més d'un d'aquests tres tipus de fotoreceptors. La nostra percepció

de quin color estem veient està determinada per la combinació de la resposta dels fotoreceptors que són excitats i de quant són excitats cadascun. La següent imatge mostra amb les lletres L, M i S les longituds d'ona d'aquests fotoreceptors.

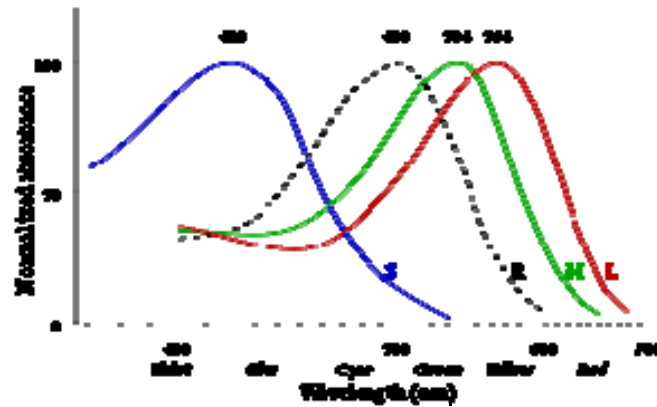


Fig. 2.6. Espectre d'absorció dels cons i dels bastons de l'ull humà. (Font 4)

Per altra banda, tots els bastons tenen la mateixa banda de sensibilitat i només proporcionen informació sobre la luminància. La seva resposta a les radiacions electromagnètiques està indicada per la corba R de la **Fig. 2.6**. Els bastons no poden crear imatges en color. El cervell i el sistema nerviós realitza un extens procés de les sortides ofertes pels bastons i els cons per formar una imatge.

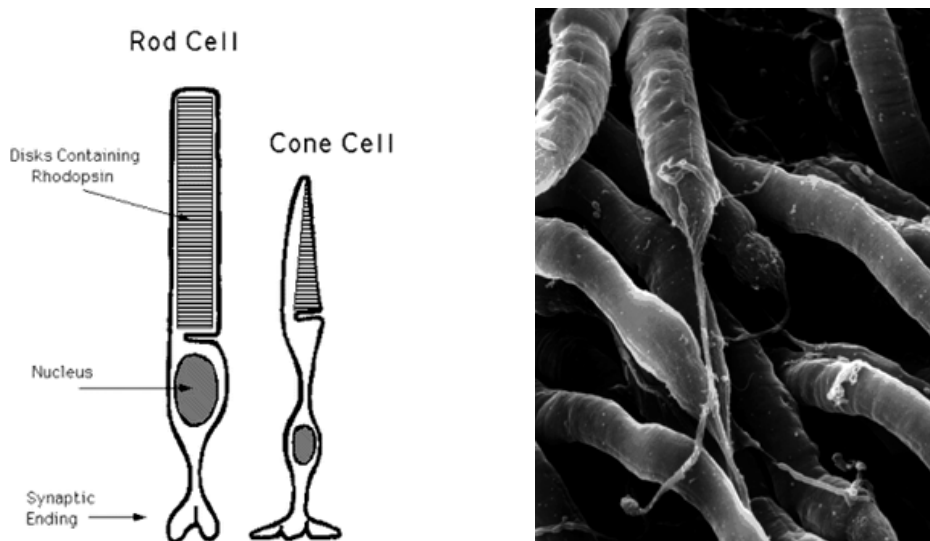


Fig. 2.7. Esquema i fotografia dels cons i dels bastons. (Font 5)

3. Els aliments i el color

Tots els aliments que consumim tenen color. El primer punt de contacte amb un aliment és el seu color, fet pel qual s'utilitzen tants colorants en la indústria alimentaria. El color d'un producte ens pot proporcionar indicacions sobre la seva qualitat i fins i tot pot fer-lo més apetitós. Però, els colors dels aliments són només importants per l'aparença que aquests els donen?

Les fruites i verdures són els aliments que més varietat de colors presenten. En general, a la natura hi ha una gran varietat de colors: és casualitat o són necessaris per a la vida de les plantes?

Els colors dels vegetals, plantes i flors no són per casualitat. En el cas de les flors, una gran quantitat dels pigments que contenen els utilitzen per atreure els diferents pol·linitzadors; per tant, el color ajuda en la reproducció de la planta. També s'utilitzen alguns pigments per altres funcions dels vegetals, com el procés de la fotosíntesi.

Per a la dieta humana, és necessari menjar aliments de tots els colors, ja que cada pigment ens aporta diferents substàncies nutritives. Concretament, els pigments dels vegetals són potents **antioxidants** que ajuden el cos humà en les reaccions químiques que s'hi produeixen.

3.1. El color dels vegetals

El color de les fruites i verdures és degut als pigments. Un **pigment** és un material que té la propietat molt marcada d'absorbir només unes determinades longituds d'ona específiques de la radiació lluminosa que li arriba, i de reflectir la resta de radiacions. Com a resultat d'aquesta propietat, el pigment apareixerà a la nostra vista del color de la radiació reflectida. Per tant, no emet llum pròpia, sinó que reflecteix les radiacions lluminoses que no absorbeix, és a dir, d'un determinat color. Un pigment de color verd, per exemple, absorbeix totes les radiacions de l'espectre visible excepte les verdes, que les reflecteix. D'aquesta manera, els nostres ulls capten la radiació reflectida pel pigment, i ens apareix

de color verd. Un material de color negre absorbeix tot l'espectre visible i no reflecteix cap radiació, mentre que un material blanc no absorbeix cap radiació i les reflecteix totes.

El color que presenta un determinat vegetal depèn del predomini d'un dels pigments que contingui per sobre dels altres, i de la combinació de tots ells. La majoria de plantes són de color verd, degut a la presència predominant d'un pigment molt conegut, la clorofil·la. La clorofil·la es troba pràcticament en tots els vegetals, encara que en alguns estigui emmascarat per altres pigments més forts que li donarien a la planta un color vermellós o groguenc. Aquests pigments de colors ataronjats són els carotenoides i les xantofil·les.

3.1.1. Els pigments dels vegetals

Com s'ha dit abans, un pigment és una substància que absorbeix unes determinades radiacions de l'espectre visible. El color d'un pigment és el resultat de les radiacions reflectides, és a dir, les que no ha absorbit el pigment. És el cas de la clorofil·la, pigment de color verd present en les cèl·lules fotosintètiques, que absorbeix totes les longituds d'ona de la llum visible excepte les de color verd, les quals són reflectides i percebudes pels nostres ulls. Totes les substàncies de color tenen el seu **espectre d'absorció** característic, que és el patró d'absorció d'uns pigments concrets.

Un espectre d'absorció ens mostra la fracció de la radiació electromagnètica que absorbeix un material concret dins del rang de l'espectre visible.

Per exemple, en el cas de la clorofil·la (*Fig. 3.1*) es pot veure que en el seu espectre d'absorció, les longituds d'ona que van dels 400nm fins als 480-490nm, corresponents als colors violetes i blaus, són absorbides en gran quantitat, com també les radiacions de longituds compreses entre els 650nm i els 700nm, que equivalen als colors vermells i taronges. En canvi, les radiacions de longituds que van dels 490nm fins als 650nm, equivalents als colors verds i groguencs, són reflectides pràcticament en la seva totalitat, fet pel qual la clorofil·la té aquest color.

Per contra, a l'espectre d'absorció del licopè les longituds d'ona que no seran absorbides i, per tant, es reflectiran i en veurem el color seran les compreses entre els 550nm i els 700nm, equivalents als colors groguencs i vermelloso (*Fig. 3.2*).

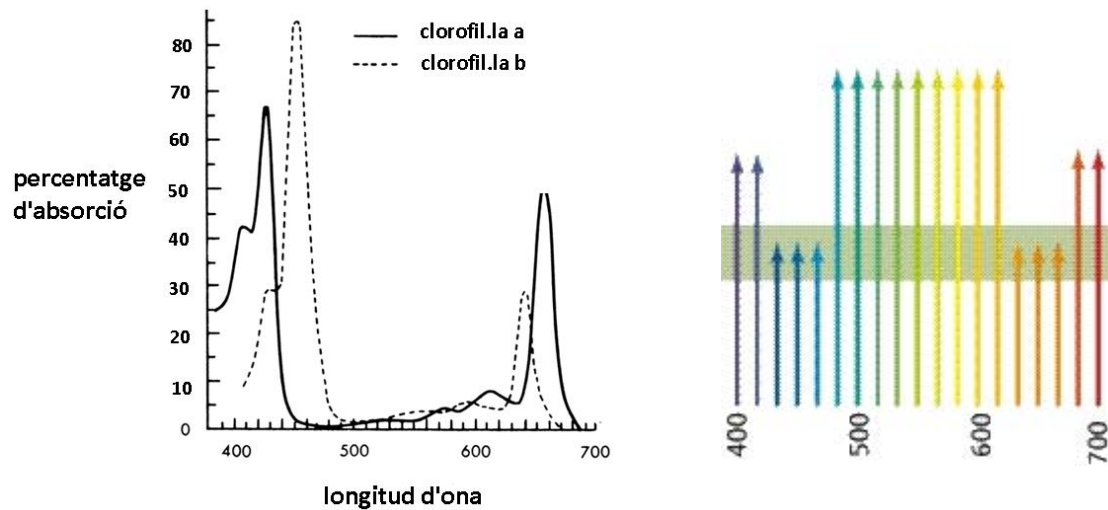


Fig. 3.1. Espectre d'absorció de la clorofil·la a i la clorofil·la b. (Font 6)

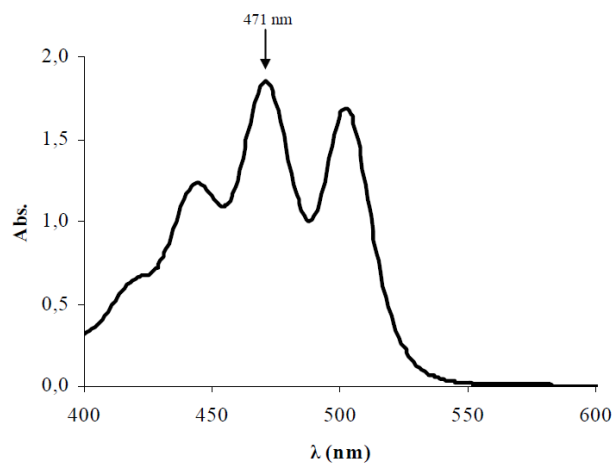


Fig. 3.2. Espectre d'absorció del licopè.

3.1.2. Altres funcions dels pigments en els vegetals i les plantes

A banda de determinar el seu color, alguns pigments també estan lligats a determinades activitats fisiològiques del propi vegetal.

Una de les principals funcions dels pigments és la **fotosíntesis**. La fotosíntesis es porta a terme en els cloroplasts, vesícules que es troben en el citoplasma de la cèl·lula i que contenen clorofil·la i carotenoides.

3.1.2.1. Fotosíntesi

La fotosíntesi té lloc en dues fases: la fase lluminosa i la fase fosca.

- **Fase lluminosa**

Durant el dia es porta a terme la fase lluminosa, en la qual les reaccions són dependents de la llum del sol i la planta en capta l'energia lluminosa transformant-la en energia química. Es produeixen reaccions *redox* que permeten que el poder reductor de l'H₂O es guardi en NADPH + H⁺. També és en aquesta fase que es forma l'ATP, una molècula altament energètica.

L'ATP, o adenina trifosfat és un nucleòtid fonamental per a l'energia cel·lular. La seva estructura es basa en una base nitrogenada, concretament d'adenina, enganxada en el carboni 1 d'una pentosa ribosa, enllaçada en el carboni 5 amb tres fosfats. En el següent esquema es diferencien les tres parts bàsiques del nucleòtid:

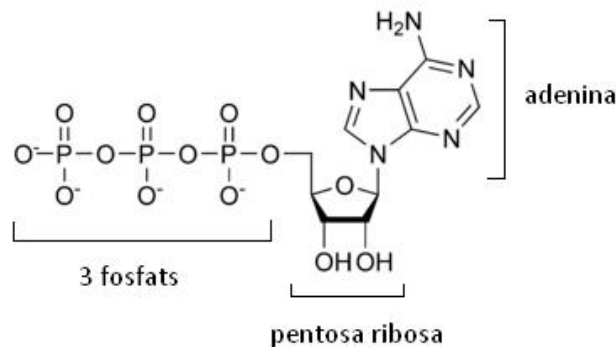


Fig. 3.2. Fórmula molecular de l'ATP (adenina trifosfat). (Font 7)

En la fase lluminosa, quan un fotó és capturat per un pigment fotosintètic, es produeix l'excitació d'un electró, el qual s'eleva a nivells d'energia superior passant a un estat d'excitació. Després d'una sèrie de reaccions d'oxidació-reducció, l'energia d'aquest electró converteix el pigment en ATP i NADPH.

- **Fase fosca**

En la fase fosca, les reaccions independents de la llum utilitzen aquestes molècules amb un alt contingut energètic produïdes a la fase anterior per fixar el diòxid de carboni i produir els precursors de la glucosa.

3.1.2.2. Funcions dels pigments en la fotosíntesi

Els pigments són substàncies capaces d'absorbir llum. En el procés de la fotosíntesi la llum és molt important ja que és la principal font d'energia. En aquest procés els pigments són els responsables de capturar i emmagatzemar l'energia de la llum solar per a després poder-la utilitzar en les diferents reaccions que es portaran a terme.

Els carotenoides actuen com a antioxidants i tenen un paper molt important en la fotosíntesi al capturar la llum solar i transferir la seva energia a les molècules de clorofil·la dins de l'aparell fotosintètic. També realitzen funcions de protecció gràcies a la seva gran capacitat d'extinció de l'energia d'excitació d'altres molècules, transformant-la en energia calorífica no perjudicial per a la planta.

3.1.2.3. La pol·linització

Una altra funció dels pigments és la d'ajudar en la **pol·linització**. La pol·linització és una forma de reproducció de les plantes per la qual el pol·len és transportat, ja sigui pel vent o per l'efecte d'insectes, a la part receptiva de les flors on germina i produeix els fruits.

En el cas de la pol·linització a través d'insectes, el color de la flor a pol·linitzar juga un paper molt important al fer-la més atractiva.

4. Substàncies responsables del color

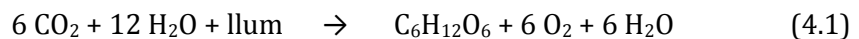
4.1. Carotenoides

Són un grup molt important de pigments orgànics vegetals liposolubles fotosintètics de color intens. Els contenen tots els organismes que depenen del sol per a obtenir energia (és a dir, que fan la fotosíntesis) i es troben a les membranes que embolcallen els cloroplasts.

Els carotenoides es troben en unes vesícules anomenades plastidis, pròpies de les cèl·lules vegetals. Hi ha molts plastidis diferents, depenent de les substàncies que emmagatzemen i de la seva funció en la cèl·lula. Els més importants són els cloroplasts, plastidis que emmagatzemen la clorofil·la, un pigment de color verd responsable de la fotosíntesis. Els plastidis que contenen els carotenoides es diuen cromoplasts, tot i que en els cloroplasts també hi ha diferents carotenoides.

- **Cloroplast:**

Els cloroplasts són els responsables de la fotosíntesis. La *fotosíntesis* és la utilització de la llum solar per a produir glucosa. Una equació simplificada de la fotosíntesis és:



Els cloroplasts es troben al citoplasma de les cèl·lules i la seva estructura és molt semblant a la dels mitocondris. Són òrgans cel·lulars envoltats per una doble membrana i amb un espai intermembranal. La membrana externa és molt permeable, és a dir, que deixa passar fàcilment les substàncies aquoses; en canvi, la membrana interna conté unes proteïnes lipídiques de transport específic, fet que la fan molt més impermeable.

Al seu interior s'hi troben unes membranes anomenades tilacoides, amb forma de sacs aplanats que es disposen apilats i interconnectats entre ells formant una xarxa interna membranosa. Cada un d'aquests apilaments rep el nom de grana i es comuniquen uns amb els altres.

Dins dels tilacoides, a l'espai tilacoïdal, és on es porten a terme tots els processos de la fotosíntesi de la fase lluminosa i on es troben els pigments responsables del seu color verd, la clorofil·la (i també en poques quantitats alguns carotens i xantofil·les).

A l'estroma, espai que queda entre la membrana interna i els tilacoides, s'hi troba una molècula d'ADN circular de doble cadena que conté tota la informació per al funcionament del cloroplast i, per tant, de la fotosíntesi. També és on es duen a terme les reaccions de la fotosíntesi associades a la fase fosca explicada anteriorment.

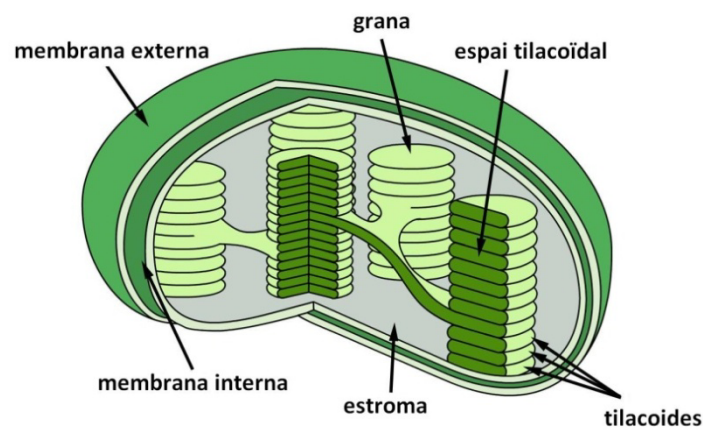


Fig. 4.1. Estructura d'un cloroplast. (Font 8)

- **Cromoplast:**

Els cromoplasts són unes petites vesícules que contenen carotenoides. La seva funció és principalment la d'emmagatzemar els pigments, tot i que es poden especialitzar formant tilacoides i convertir-se en cloroplasts capaços de portar a terme la fotosíntesi.

Químicament, els carotenoides presenten una estructura de tetraterpens, és a dir, que contenen 40 àtoms de carboni. Estructuralment són simètrics i lineals i segons els seus components es divideixen en dos grups:

- Carotens: només contenen carboni i hidrogen: són hidrocarburs.
- Xantofil·les: contenen una o més molècules d'oxigen en la seva estructura.

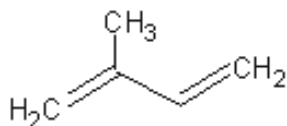
4.1.1. Carotens

4.1.1.1. Beta carotè

És el carotenoide més abundant a la natura i el més important per a la dieta de l'home. Té un color ataronjat i es troba principalment en verdures d'aquest color. La pastanaga és l'aliment que en conté en més quantitat.

El beta carotè és un dels principals precursors de la vitamina A en els humans. Els beta carotens són absorbits per l'intestí prim per difusió passiva, és a dir, el pas d'un costat a l'altre de la membrana produïda per la diferència de concentracions en ambdues. Cada molècula de beta carotè pot ser convertida, gràcies a un enzim intestinal específic, en dues molècules de vitamina A. L'eficàcia d'absorció està mesurada entre un 9% i un 22%, ja que depèn de molts factors (ja sigui la quantitat de beta carotens ingerida, l'estat en que es troben i la pròpia genètica i metabolisme de l'home que els ingereixi en concret). En l'apartat de la salut s'explicarà aquest procés detalladament.

L'estructura dels beta carotens està formada per isoprens, un compost orgànic amb 2 dobles enllaços molt comú a la natura.



La seva fórmula molecular és C_5H_8 i el nom de la IUPAC, és 2-metil-1,3-butadiè.

Fig. 4.2. Estructura d'un isoprè.

Aquests isoprens van polimeritzant i es van enganxant un darrere l'altre fins a formar una cadena amb dobles enllaços conjugats, comuna a tots els carotenoides. En la Fig 4.3. es pot observar que els dos isoprens del mig s'uneixen de manera diferent a la resta (de cap a cap i no pas de cap a cua), ja que aquesta cadena té un centre de simetria.

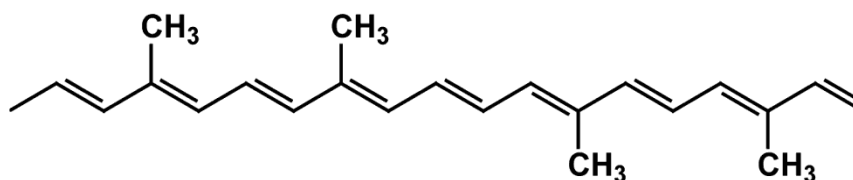


Fig. 4.3. Forma d'enganxar-se els 2 isoprens centrals d'un beta carotè.

El beta carotè, en concret, està format per 8 unitats d'isoprens, que son cíclics en els seus extrems. La seva fórmula molecular és $C_{40}H_{56}$

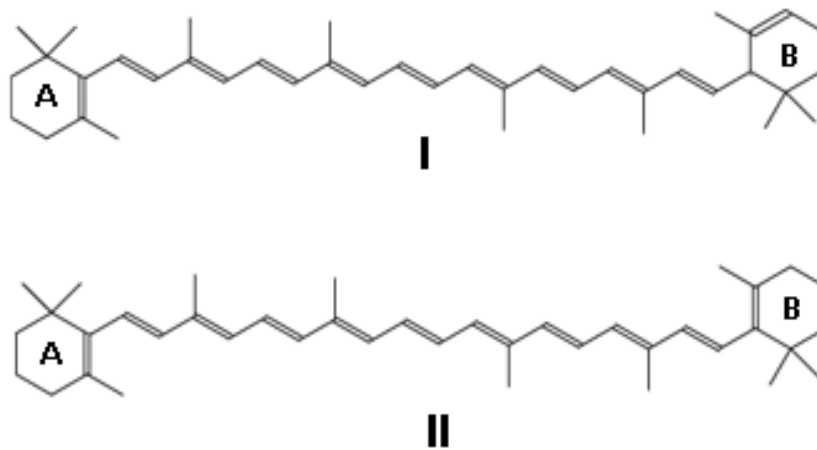


Fig. 4.4. Diferència estructural entre l'alfa (I) i el beta (II) carotè. (Font 9)

El color ataronjat del beta carotè es deu a la seva estructura molecular. És un pigment que reflecteix les longituds d'ona ataronjades. A la Fig. 4.5 es mostra el seu espectre d'absorció:

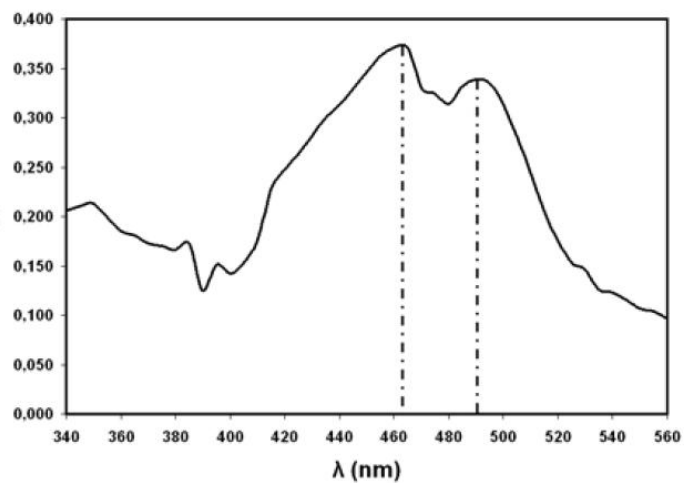


Fig. 4.5. Espectre d'absorció del beta carotè. (Font 10)

4.1.1.2. Alfa carotè

L'alfa carotè és un carotenoide molt abundant en les pastanagues i les carbasses, però sempre en menys quantitat que el beta carotè. Té un color ataronjat i es troba principalment en verdures d'aquest color.

L'alfa carotè, igual que el beta carotè és un dels principals precursors de la vitamina A, però només la meitat d'eficàcia que aquest segon. És absorbit per l'intestí prim per difusió passiva i cada molècula d'alfa carotè pot ser convertida en una molècula de vitamina A gràcies a un enzim intestinal específic.

L'estructura de l'alfa carotè és pràcticament idèntica a la del beta carotè; per això es diu que són isòmers estructurals, és a dir, comparteixen la mateixa fórmula molecular però tenen una estructura una mica diferent en la posició del doble enllaç del cicle B (veure la *Fig. 4.4 I i II*), cosa que els fa variar en algunes de les seves propietats físiques i químiques. Igual que els beta carotens estan formats per isoprens.

L'alfa carotè està format per 8 unitats de isoprens, els quals són cíclics en els seus extrems. La seva fórmula molecular és $C_{40}H_{56}$, igual a la del beta carotè.

L'alfa carotè i el beta carotè es diferencien en el cicle final (B), on en el beta carotè (II) es troba el doble enllaç conjugat, en canvi en l'alfa carotè (I), l'enllaç es troba entre les posicions 1 i 2 del cicle. Aquest petit canvi en la posició del doble enllaç provoca que siguin dues molècules amb la mateixa forma molecular però amb propietats diferenciades (*Fig. 4.4*).

L'alfa carotè, malgrat ser un 50% menys efectiu com a provitamina A, és un 38% més potent com a antioxidant. La manera com actua i pot ajudar a prevenir algunes malalties en els humans s'explicarà detalladament més endavant.

4.1.1.3. Licopè

El licopè és el carotenoide més abundant en el tomàquet. Té un color vermellós i es troba principalment en verdures d'aquests colors. El tomàquet és l'aliment que en conté en més quantitat.

El licopè és un micro nutrient antioxidant, necessari per a la composició dels teixits, com per exemple la sang, la qual en conté en gran quantitat. El licopè s'absorbeix més fàcilment

quan és ingerit amb petites quantitats de grassa, com per exemple l'oli d'oliva. Això és degut a que el licopè és una molècula liposoluble, és a dir que es dissol amb els greixos, però no amb l'aigua. També s'absorbeix 2,5 vegades més si es pren calent.

L'estructura del licopè és molt similar a la del beta carotè, però encara més senzilla. És un tetraterpè format per la síntesi de 8 unitats d'isoprè. És un carotenoide d'estructura senzilla amb una cadena alifàtica formada per 40 àtoms de carboni, sense cap anell cíclic i amb gran quantitat de dobles enllaços conjugats (en total 11), com es veu en la *Fig. 4.7*.

El licopè té isomeria geomètrica. La isomeria geomètrica és un tipus d'estereoisomeria que es produeix en compostos amb dobles enllaços. Es poden distingir dos tipus d'isòmers, el *cis*, en el que els substituents (R) es troben en el mateix costat del doble enllaç de la molècula, i el *trans*, quan els substituents estan en costats oposats del doble enllaç.

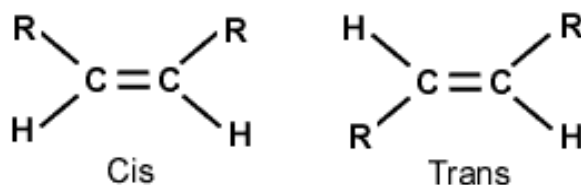


Fig. 4.6. Diferència estructural entre els isòmers Cis i Trans.

El licopè és un dels primers carotenoides que apareixen en la síntesi d'aquests compostos i, per tant, és la base de la qual en surten els altres.

La síntesi comença amb l'**àcid mevalònic**, un compost orgànic molt important en la formació de molècules bioquímiques dels vegetals. A continuació, l'àcid mevalònic es converteix en isoprè, la base de tots els carotenoides. Aquests isoprens, units amb fosfats (pirofosfat dimetilal·lil i pirofosfat d'isopentil) s'uneixen entre ells fins a formar una llarga cadena d'isoprens units, usant els fosfats com a unió. Quan s'arriba a les 8 unitats d'isoprè unides, es descomponen els fosfats i es formen els dobles enllaços: s'ha obtingut el *trans*-licopè, el carotenoide amb l'estructura més simple. A partir del *trans*-licopè, si es formem cicles s'obtenen els beta i alfa carotens, i si s'afegeixen oxígens a aquestes molècules, s'arribaran a obtenir les xantofil·les. Tot aquest procés es pot observar a la *Fig. 4.7*.

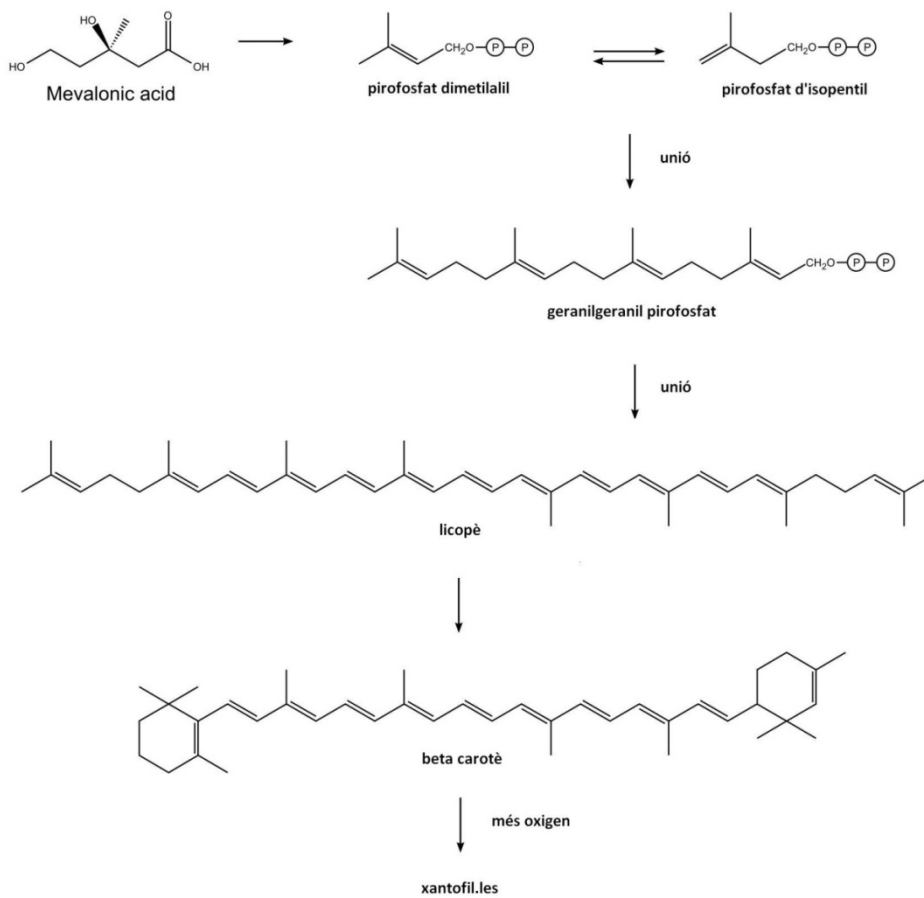


Fig. 4.7. Esquema de la síntesi del licopè i de la transformació en beta caroté. (Font 10)

A continuació s'adjunta l'espectre d'absorció del licopè:

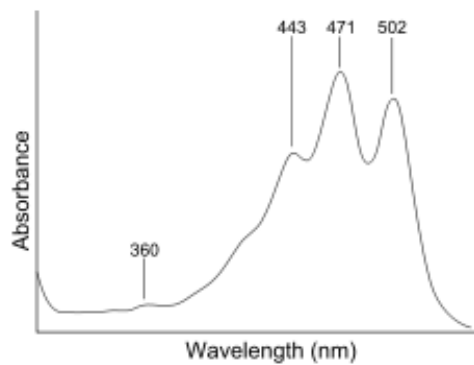


Fig. 4.8. Espectre d'absorció del licopè.

4.1.2. Xantofil·les: la luteïna

La luteïna és la xantofil·la més abundant en els pebrots grocs. Té un color groguenc i es troba principalment en verdures d'aquest color. També es troba en gran quantitat en el blat de moro i en el rovell de l'ou.

La luteïna és un antioxidant que en les plantes ajuda a la fotosíntesis. El seu paper és el de protegir a la planta de les radiacions solars, gràcies a la seva gran capacitat d'absorbir la llum blava, altament nociva per als organismes.

En els homes, la luteïna és troba en grans quantitats en la retina de l'ull, concretament en la màcula, punt on es centralitza la llum solar. La luteïna ajuda a protegir l'ull de les radiacions de color blau, que són molt perjudicials per a la vista. A part de filtrar la llum blava, la luteïna també actua com a antioxidant per a les cèl·lules de la retina. Es creu que consumir la quantitat adequada de luteïna ajuda a prevenir les cataractes i altres malalties que puguin afectar la vista.

L'estructura de la luteïna es deriva de l'alfa carotè. Està caracteritzada per tenir un grup hidroxil en cada un dels cicles de l'alfa carotè. Té 11 enllaços dobles conjugats i 40 àtoms de carboni. És una molècula lineal i la seva fórmula molecular és $C_{40}H_{56}O_2$.

Aquesta molècula té molts isòmers, un dels quals és la xantofil·la. L'única diferència és la posició d'un dels dobles enllaços de l'interior del cicle.

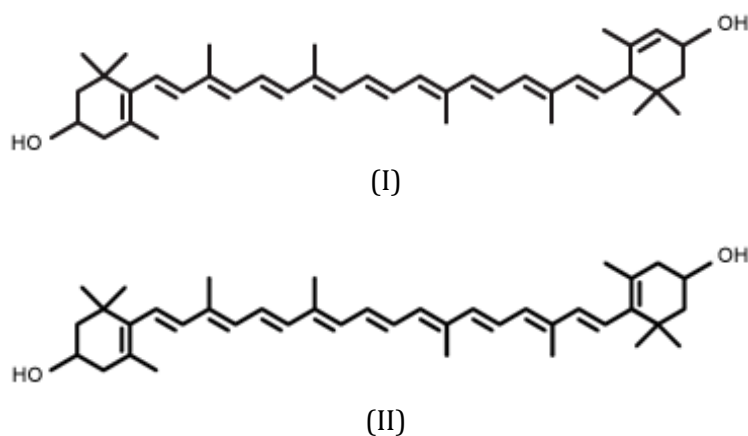


Fig. 4.9. Estructura de la luteïna (I) i les xantofil·les (II).

El color groguenc de la luteïna, com ja s'ha dit abans, és a causa de la seva estructura.

El color de les xantofil·les, que va des del groc pàl·lid fins al vermell intens, passant pel taronja brillant, està directament relacionat amb la seva estructura. Sovint són grogues, d'aquí ve el seu nom de classe. Els dobles enllaços carboni-carboni interactuen uns amb els altres en un procés anomenat conjugació, que permet als electrons de la molècula de moure's lliurement a través d'aquestes àrees de la molècula. Com més augmenta el nombre de dobles enllaços, els electrons associats als sistemes conjugats tenen més espai per moure's, i requereixen menys energia per canviar d'estat. Això fa que el rang d'energies de la llum absorbida per la molècula tendeixi a augmentar. A mesura que més freqüències de la llum s'absorbeixen a longituds d'ona més curtes de l'espectre visible, els compostos adquireixen un aspecte cada cop més vermellós.

4.2. Flavonoides

Són una varietat de compostos fenòlics, és a dir, compostos orgànics que contenen un grup fenol, que és un anell aromàtic unit, com a mínim, a un hidroxil.

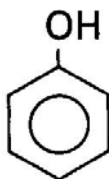


Fig. 4.10. Estructura del fenol.

Intervenien en la formació de pigments i se sintetitzen en les plantes superiors durant la seva maduració o creixement.

La seva estructura bàsica és mostra en la Fig. 4.11. La majoria de flavonoides estan compostos de 3 cicles, un benzè (A) fusionat amb una piranona (C) i la que se li uneix un grup fenil (B) que contindrà hidroxils. Aquesta estructura s'unirà a una molècula de glúcids (Fig. 4.11).

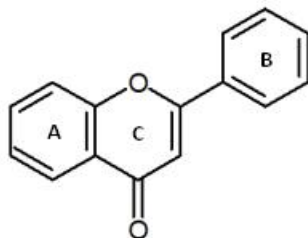


Fig. 4.11. Estructura bàsica d'un flavonoide.

Hi ha molts tipus diferents de flavonoides depenent dels substituents que portin. Aquests són els principals grups:

- Flavanols
- Flavonols
- Flavones
- Antocians

En aquest treball s'estudiaran només els antocians, ja que són el grup de flavonoides que donen el color vermellós a les diferents fruites i verdures.

4.2.1. Antocians

Són uns pigments hidrosolubles pertanyents a la família dels flavonoides que es troben en els vegetals. Tenen un color que pot variar del roig fins al blau i són els principals responsables dels colors de les fulles dels caducifolis a la tardor. Pel que fa a fruites i verdures, en contenen en gran quantitat les albergínies, cireres, mores i maduixes.

Els antocians es troben als vacúols de les plantes. Se'n poden trobar a les fulles dels arbres com a protecció antioxidant per als raigs ultraviolats del sol. En els arbres caducifolis, els flavonols incoloros que contenen les seves fulles es converteixen en antocians vermellosos quan la clorofil·la es degrada. A la tardor, la clorofil·la es descompon, els flavonoides incoloros es veuen mancats d'àtoms d'oxigen units al seu anell central i això els converteix en antocians. Aquesta falta d'oxigen en la molècula del flavonoide és el que produeix el canvi de color de les fulles dels arbres a la tardor.

Químicament, els antocians estan constituïts per una molècula d'antocianidina a la que s'hi uneix un sucre per mitjà d'un enllaç glucòsid. L'estructura bàsica de l'antocianidina està composta per l'ió flavil, també anomenat 2-fenil-benzopirina. Els antocians més coneguts són la pelargonidina, la cianidina i la petunidina. Es diferencien entre sí pels grups hidroxil que contenen i la seva posició en l'estructura molecular.

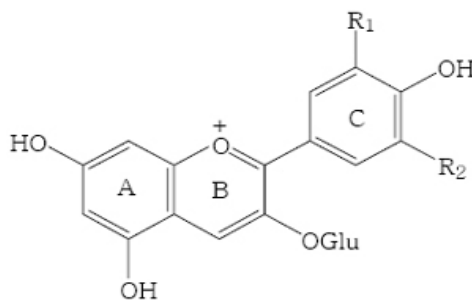


Fig. 4.12. Estructura bàsica d'una antocianidina. (Font 11)

5. Funció dels pigments en l'organisme

5.1. Funció dels pigments en l'organisme

Els pigments actuen, bàsicament, com a **antioxidants** en el cos humà.

Un **antioxidant** és una molècula capaç d'alentir o prevenir l'oxidació d'altres molècules. L'**oxidació** és una reacció química en la qual un ió o àtom perd diversos electrons. Les reaccions d'oxidació poden provocar **radicals lliures**, els quals inicien reaccions en cadena que poden danyar les cèl·lules. Els antioxidants interrompen aquestes reaccions llevant elements intermedis del radical lliure i així descarten altres reaccions d'oxidació, oxidant-se ells mateixos.

Les reaccions d'oxidació són molt importants per a la vida, però també poden ser perjudicials. Tots els organismes vius mantenen complexos sistemes amb múltiples tipus d'antioxidants que ajuden en totes les reaccions químiques. La presència de baixos nivells d'antioxidants causa **estrès oxidatiu** que pot danyar o matar les cèl·lules.

L'**estrès oxidatiu** és causat per un desequilibri entre la producció d'oxigen reactiu i la capacitat del sistema biològic de desintoxicar els reactius intermedis. Si l'organisme no és capaç de mantenir aquest equilibri es poden causar efectes tòxics a través de la producció de peròxids i radicals lliures que danyen les cèl·lules, incloent les proteïnes i l'ADN. En l'ésser humà, l'estrès oxidatiu està involucrat en moltes malalties, com el Parkinson i l'Alzheimer i també pot ser important en l'envelliment.

5.2. Els radicals lliures

Els **radicals lliures** són àtoms, molècules o ions amb electrons desaparellats, per la qual cosa són molt reactius i es combinen fàcilment amb altres àtoms o molècules.

L'oxigen és molt important en la vida dels humans, però a la vegada intervé en la producció de substàncies tòxiques. Aquestes substàncies són els radicals lliures que són molt inestables i reaccionen amb qualsevol tipus de molècula, podent provocar grans danys cel·lulars. Aquests radicals lliures, per estabilitzar-se, uneixen ràpidament l'electró

desaparellat amb un altre radical lliure, o bé capten o cedeixen electrons en una estructura molecular no radical. En aquest últim cas, es formarien molècules no útils per al cos i fins i tot nocives, cancerígenes o degeneratives cerebrals.

Els radicals lliures es poden formar de maneres diferents: a partir de la respiració mitocondrial quan l'oxigen no es redueix totalment formant aigua, i en la fagocitosi, tot i que també poden provenir de factors exteriors com per exemple el fum del tabac, les radiacions o els contaminants.

Les **espècies reactives de l'oxigen** són molècules que es produeixen com a resultants de reaccions de reducció-oxidació incompletes on hi ha intervingut l'oxigen. Aquestes molècules poden ser o bé altament reactives (radicals lliures) o bé altres molècules com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) o l'àcid hipoclorós (HClO) les quals no tenen cap electró desaparellat però sí en tenen algun en una capa molt externa i, per tant, reaccionen més fàcilment. Aquests últims compostos són útils per al cos humà, però la seva toxicitat s'atribueix en que fàcilment creen radicals $\text{OH}\cdot$.



Reacció d'oxidació en que el peròxid d'hidrogen dóna lloc al radical hidroxil.

Els radicals lliures produïts en el cos humà són:

- **El radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$)** és el més reactiu i reacciona ràpidament amb qualsevol molècula biològica. Es forma a partir d'aigua degradada a causa de l'acció de radiacions electromagnètiques molt energètiques. Aquests radicals lliures produeixen danys importants a les cèl·lules, sobretot en els eritròcits (glòbuls vermells) i en els lípids.
- **El radical superòxid ($\text{O}_2\cdot$)** es forma a partir de reaccions de l'oxigen amb altres molècules del cos humà, com també a partir de les cèl·lules fagocitàries en la seva acció de lluitar contra els virus.

5.2.1. Accions biològiques dels radicals lliures d'oxigen

Les espècies radicalàries de l'oxigen són les més reactives, especialment el radical hidroxil. Quan aquests radicals reaccionen amb altres molècules poden donar lloc a substàncies secundàries útils o nocives:

- **Acció sobre els glúcids:** Els monosacàrids i els disacàrids resisteixen l'acció dels radicals lliures d'oxigen. Fins i tot, alguns glúcids com la glucosa són capaços de retenir el radical superòxid. Els polisacàrids, per contra, són fàcilment despolimeritzats pels radicals lliures.
- **Acció sobre els lípids:** L'acció dels radicals lliures sobre els lípids es dona, especialment, sobre els àcids grassos insaturats, provocant pèrdues de flexibilitat i de les seves funcions. Quan un hidroxil s'uneix a un àcid gras, aquest últim es queda amb un electró desaparellat i es converteix en un radical lipídic, que pot reaccionar també amb altres molècules.
- **Acció sobre les proteïnes:** Els radicals lliures actuen sobre els dobles enllaços insaturats fent que sofreixin modificacions estructurals i funcionals. L'efecte dels radicals lliures sobre una determinada proteïna depèn del seu contingut en aminoàcids, de la importància d'aquests aminoàcids en les seves funcions i també de la pròpia capacitat de la proteïna en reparar les lesions. Si la proteïna queda afectada pot tenir repercussions greus en la salut.

5.2.2. Malalties provocades pels radicals lliures

Els radicals lliures provoquen diferents malalties. A continuació s'exposen les més importants.

- **Aterosclerosi:** és la forma més comuna de l'arteriosclerosi, malaltia del sistema vascular produïda pel dipòsit de substàncies lipídiques a les parets de les arteries. Provoca reaccions inflamatòries i l'estreyniment de les parets arterials.

L'aterosclerosi es desenvolupa a partir de l'oxidació de les molècules de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), provocada pels radicals lliures. Les LDL són proteïnes que contenen colesterol i el transporten al llarg dels corrents sanguinis. Quan les LDL s'oxiden a causa dels radicals lliures i entren en contacte amb les parets de l'artèria s'hi enganxen i causen danys. Tot seguit s'inicien una sèrie de reaccions per a reparar la paret. El sistema immunològic del cos envia dos tipus de glòbuls blancs (macròfags i limfòcits T) per absorbir les molècules de LDL oxidades que s'han enganxat a les parets arterials. Aquests glòbuls blancs però, no són capaços de processar les LDL oxidades i en comptes d'això es trenquen, dipositant

una major quantitat de colesterol oxidat a la paret de l'artèria. Això desencadena més glòbuls blancs, continuant el cicle.

A causa d'aquesta acumulació de colesterol l'artèria s'inflama i es provoca el seu estrenyiment, fet que redueix el flux sanguini i augmenta la pressió arterial.

- **Càncer:** des de fa uns anys que és una malaltia molt estesa i difícil de curar. El càncer és una malaltia causada per la proliferació descontrolada de cèl·lules malignes. Les causes del desenvolupament d'aquestes cèl·lules poden ser degudes a tres agents cancerígens: agents químics, biològics i físics. La relació del càncer amb els radicals lliures es trobaria dintre dels agents químics.

L'ADN³ de les cèl·lules està exposat a molts perills. El perill més evident és l'estrès oxidatiu provocat pels radicals lliures. Això és una conseqüència inevitable del metabolisme cel·lular que augmenta juntament amb l'estrès oxidatiu que pateix el cos.

Els radicals lliures provoquen ruptures de les cadenes i modificacions en les bases de nucleòtids, sobretot en aquelles seqüències amb elevades quantitats de guanina, ja que s'oxida amb més facilitat que la resta de bases. Els radicals lliures també reaccionen amb l'ADN oxidant l'esquelet de sucre-fosfat. Les reaccions d'oxidació amb els sucres comporten la fragmentació de la unió amb el fosfat, la pèrdua d'una base i, per tant, el trencament de la cadena. Les reaccions amb les bases comporten la transversió⁴. En el cas de la guanina, durant el procés de duplicació de l'ADN s'aparella normalment amb la citosina. No obstant això durant el procés de la replicació, quan la guanina s'ha transformat en 8-hidroxi-guanina a causa del radical hidroxil, aquesta s'aparella amb una molècula de timina. Això provocarà la formació d'una proteïna defectuosa que si es troba involucrada en mecanismes de control del cicle cel·lular es poden anar reproduint clons d'aquesta cèl·lula mutant i formar-se un tumor.

El radical hidroxil s'enganxa en la guanina en la posició 8 i forma el 8-hidroxi-guanina.

³ L'ADN, o àcid desoxiribonucleic, és un àcid que conté la informació genètica dels éssers vius.

⁴ La transversió és una mutació de l'ADN que consisteix en la substitució d'una purina per una pirina en la duplicació genètica.

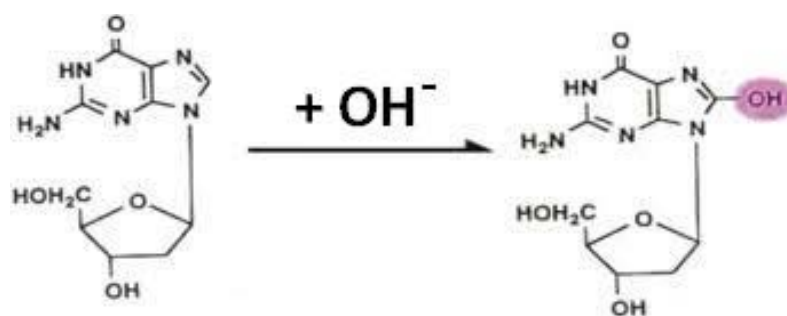


Fig. 5.1. Estructura molecular del 8-hidroxi-guanina. (Font 12)

A l'organisme hi ha sistemes enzimàtics que reparen les alteracions de les bases d'ADN posant la base corresponent al lloc on falta. A vegades, però, quan els danys són molt extensos, aquests enzims no arriben a reparar tot l'ADN, fent que quan aquest es replica, l'ADN polimerasa incorpori bases equivocades en el lloc on aquestes són absents i per tant en manté la mutació. Així, durant el procés de replicació s'alteren les estructures del material genètic, les quals es transmetran a les futures generacions i, en alguns casos, provocaran el creixement incontrolat de masses cel·lulars malignes.

- **Sistema immunitari:** és el conjunt de mecanismes d'un organisme per a protegir-lo de les malalties. En algunes de les operacions que realitza per a suprimir les substàncies nocives es produeixen gran quantitat de radicals lliures, com per exemple en la fagocitosis. Per tant, en tot el complex del sistema immunitari els radicals lliures hi són presents, fet pel qual també s'hi troben els antioxidants en gran quantitat. Els nivells dels radicals lliures i antioxidants han de ser sempre estables ja que les cèl·lules del sistema immunitari contenen gran quantitat d'àcids grassos poliinsaturats a les seves membranes, i per tant són molt sensibles als canvis en aquest balanç. Un augment dels radicals lliures o la falta d'antioxidants pot afectar de manera molt negativa en la funció immunitària i, per tant, afavorir les infeccions.
- **Envelliment:** les arrugues i la pèrdua progressiva de les funcions del cos no es coneixen gaire bé, però els estudis mostren que, en part, els radicals lliures hi contribueixen. Hi ha una teoria de l'envelliment que el relaciona amb l'estrès oxidatiu. Quan l'estrès oxidatiu arriba a uns nivells molt elevats, els radicals lliures superen els sistemes antioxidants i es produeixen danys en les cèl·lules, que fins i

tot els poden provocar la mort. Aquests danys es van acumulant amb el temps fins que arriba un moment en que condicionen la salut.

S'ha detectat que, amb el pas dels anys, augmenten considerablement els efectes produïts al cos pels radicals lliures així com una important disminució d'antioxidants, fet pel qual s'atribueix a l'estrès oxidatiu com una de les principals causes d'envelliment.

5.3. Defenses contra els radicals lliures: els antioxidants

Els antioxidants, com ja s'ha dit, són molècules capaces de prevenir o retardar l'oxidació d'altres molècules causada pels radicals lliures provinents de l'estrès oxidatiu. Per tant, els antioxidants són agents reductors que inhibeixen les funcions oxidatives dels radicals produïts en la respiració de les cèl·lules.

El mecanisme de defensa de l'home davant de les espècies reactives d'oxígens té dues fonts: l'endògena, és a dir, produïda pel mateix organisme, i l'exògena, que l'organisme rep a partir de l'alimentació diària.

Una altra manera de classificar els diferents antioxidants es basa en la seva solubilitat. Hi ha 2 grans grups, els solubles en aigua (hidrofílics) i els que ho són en lípids (hidrofòbics). Els antioxidants solubles en aigua solen reaccionar amb els agents oxidants en el citoplasma i en el plasma sanguini, mentre que els antioxidants liposolubles protegeixen les membranes cel·lulars de la peroxidació de lípids.

Tots els carotenoides són liposolubles. En canvi, tant la catalasa com el superòxid dismutassa són antioxidants solubles en aigua. Els flavonoides, donat que tenen molts grups hidroxil en la molècula, també són solubles en aigua o en dissolvents polars.

5.4. Classificació dels antioxidants

5.4.1. Antioxidants endògens

Són els antioxidants produïts pel mateix organisme, com un mecanisme de defensa. Els antioxidants que es troben dins de les cèl·lules acostumen a ser enzims.

Una paradoxa del metabolisme és que malgrat que la majoria de la vida necessita l'oxigen per a la seva existència, aquesta és un molècula altament reactiva que pot danyar als sers vius produint espècies reactives d'oxigen. Per tant, els organismes posseeixen una gran complexitat d'enzims antioxidants que treballen per prevenir els danys oxidatius. Aquests sistemes d'antioxidants poden o bé evitar que els radicals lliures es formin o bé eliminar-los abans de que puguin danyar la cèl·lula.

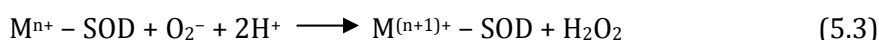
Els principals enzims antioxidants de l'organisme són:

Superòxid dismutassa:

Catalitza el radical superòxid. És l'enzim antioxidant més important. S'han fet diferents estudis per avaluar les funcions del SOD. En un d'aquests estudis es van modificar genèticament uns ratolins perquè no tinguessin aquest enzim, i va succeir que varen morir al cap de pocs dies de néixer per estrès oxidatiu.

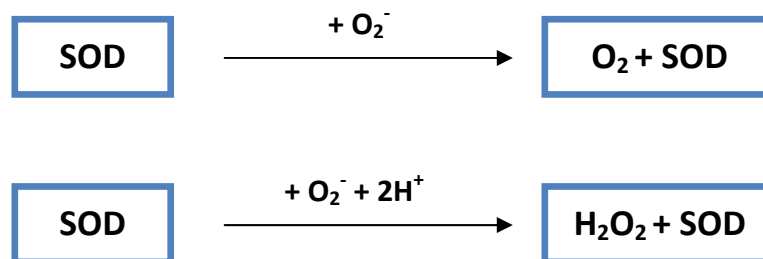
Existeixen varies formes comunes del superòxid dismutassa (SOD). Són proteïnes amb cofactors com el níquel, ferro, magnesi o coure. En els humans els podem trobar de 3 formes diferents.

El SOD reacciona amb el superòxid formant oxigen i peròxid d'hidrogen. Les seves semireaccions són les següents:



M= Cu, Mn, Fe, Ni

Esquematitzades, les semireaccions anteriors es podrien mostrar de la següent manera, sense considerar el canvi de número d'oxidació del metall i els electrons intercanviats:



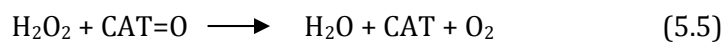
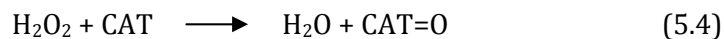
En la segona reacció s'haurà format peròxid d'hidrogen, una molècula que no és altament reactiva però si que fàcilment dóna lloc al superòxid, per tant hi ha d'haver un altre enzim que pugui convertir-la en una molècula neutra. Aquest enzim és la catalasa.

Catalasa:

La catalasa és un enzim que es troba en gairebé tots els organismes vius que s'exposen a l'oxigen, i catalitza el peròxid d'hidrogen en oxigen i aigua. En els humans, és un dels enzims que té les xifres més altes de reacció. Una molècula de CAT pot convertir milions de molècules de peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen en pocs segons.

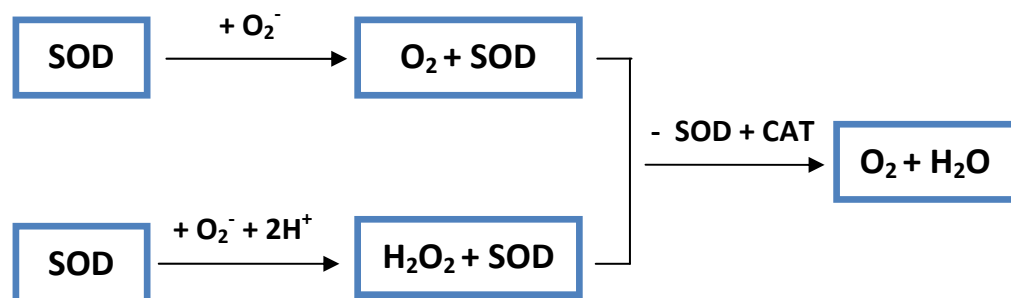
La CAT és un tetràmer amb quatre cadenes polipeptídiques, cadascuna d'aquestes amb més de 500 aminoàcids. Conté quatre estructures hemo-ferro les quals permeten que reaccionin amb el peròxid d'hidrogen.

El mecanisme complet de la CAT en la descomposició del H_2O_2 no es coneix però es creu que es porta a terme en dues etapes.



(on CAT és una representació de la fórmula real de l'enzim catalasa)

Així, si s'ajunten les reaccions produïdes per la catalasa, amb les reaccions que es produeixen quan reacciona el SOD amb el superòxid, s'obté:



La catalasa es troba en un orgànel anomenat peroxisoma, lloc cel·lular on es lluita contra la detoxificació⁵.

5.4.2. Antioxidants exògens

Són els antioxidants introduïts al cos gràcies a l'alimentació diària. Aquestes molècules actuen com unes molècules suïcides ja que s'oxiden al neutralitzar el radical lliure, fet pel qual necessitem la seva reposició continua mitjançant la ingesta dels nutrients que en continguin.

Els principals antioxidants exògens són:

- Carotens
- Flavonoides
- Vitamines A, C, E

En el capítol 6, de funcions en l'organisme dels pigments vegetals, s'explicaran detalladament les funcions d'alguns d'aquests antioxidants.

5.5. Els antioxidants i les malalties

En l'apartat següent s'explica com els diferents pigments ajuden a prevenir el creixement de tumors a causa dels radicals lliures.

5.5.1. Els antioxidants i el càncer

Com s'ha explicat en l'apartat 5.2.2, els radicals lliures afavoreixen l'aparició de tumors cancerígens. Els antioxidants, gràcies al seu poder reductor, poden minimitzar aquests efectes.

Els antioxidants neutralitzen els radicals lliures evitant que aquests es combinin amb biomolècules que podrien ser el principi de masses cancerígenes. Si els radicals lliures són

⁵ Detoxificació: disminuir o eliminar, l'organisme, els efectes de les substàncies tòxiques.

neutralitzats abans de que es puguin combinar amb altres molècules, com per exemple en el cas de l'aparició del càncer per l'alteració de la guanina, s'evitarà la degradació de l'ADN i, per tant, de les mutacions que en el futur podrien conduir al càncer.

Els antioxidants s'uneixen amb l'electró desaparellat del radical lliure, fent que no pugui oxidar altres molècules, i així en deshabiliten la seva toxicitat.

5.5.2. Els antioxidants i les malalties neurodegeneratives

Diferents estudis realitzats els últims anys han mostrat que una dieta rica en antioxidants afavoreix el creixement de noves neurones. Fins a finals dels anys seixanta es pensava que la dotació neuronal dels mamífers disminuïa a mesura que envellien sense que hi hagués cap possibilitat de renovació. Actualment es coneix que sí, que hi ha formació de noves neurones en el cervell adult, encara que el ritme d'aquesta proliferació cel·lular es redueix amb l'edat.

Com ja s'ha explicat anteriorment, l'estrès oxidatiu té una certa importància en l'aparició de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o Parkinson. La ingesta d'antioxidants és capaç d'induir una generació de noves cèl·lules en el cervell, reforçant les xarxes neuronals que podrien estar afectades durant l'envelliment o processos neurodegeneratius i també proporcionant una autoprotecció davant del dany oxidatiu.

6. Funcions en l'organisme dels pigments vegetals

6.1. Beta carotens

A part de ser un potent antioxidant, el beta carotè és el principal carotenoide amb activitat de provitamina A.

La **vitamina A** és una vitamina liposoluble, és a dir, que es dissol només amb greixos. La trobem en els greixos animals en forma d'èsters de retinol. En els vegetals no hi trobem la vitamina A tal i com la coneixem, és a dir en forma de retinol, sinó que la trobem en forma de beta carotens.

Químicament la vitamina A és un isoprenoide. Els isoprenoides són un grup de compostos orgànics que se sintetitzen a través d'unitats d'isoprè. Totes les formes de la vitamina A tenen un anell beta ionona unit a una cadena d'isoprens. En la següent figura es pot observar l'estructura del retinol, el retinal i l'àcid retinoic, les tres molècules biològicament actives de la vitamina A.

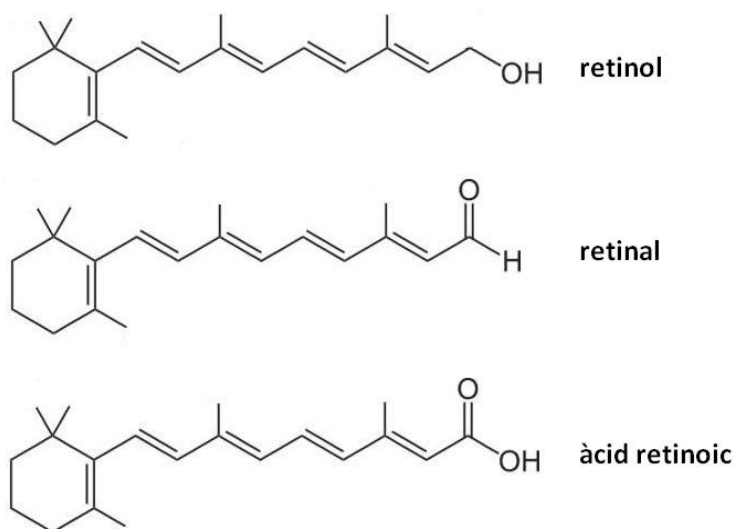


Fig. 6.1. Estructura molecular de les formes biològicament actives de la vitamina A. (Font 13)

Com es pot observar, l'estructura de les tres molècules és pràcticament la mateixa i només canvien els grups funcionals: en el retinol s'hi troba un grup alcohol, en el retinal un aldehid i en l'àcid retinoic hi ha un àcid carboxílic.

6.1.1. Funcions metabòliques de la vitamina A

La vitamina A té un paper molt important en diferents funcions del cos. És indispensable en la visió i en la transcripció dels gens. També actua en el creixement dels ossos i en el desenvolupament de la pell.

- **Visió:** El paper de la vitamina A en la visió es reflecteix específicament en la forma de la retina. Tant els bastons com els cons contenen un pigment fotoreceptor en les seves membranes. Aquest compost fotosensible dels ulls de la majoria dels mamífers és una proteïna anomenada opsina a la qual està unit, de manera covalent, un aldehid de la vitamina A, el retinol. Les cèl·lules d'opsina que es troben en els bastons es diuen scotopsin i els fotoreceptors s'anomenen rodopsina. Aquest compost és la unió entre l'scotopsin i l'11-cis-retinal (una forma de la vitamina A). Quan la llum entra a l'ull, la molècula d'11-cis-retinal s'isomeritza a la forma de trans-retinal. Aquest canvi indueix un senyal nerviós al llarg del nervi òptic fins al centre visual del cervell. La rodopsina és necessària per a veure en blanc i negre, és a dir, de nit. Per tant, una deficiència en la vitamina A pot provocar ceguera nocturna.
- **Transcripció dels gens:** La vitamina A, en forma d'àcid retinoic també té un paper molt important en la transcripció de gens. Una vegada una cèl·lula ha absorbit el retinol, aquest pot ser oxidat a retinal i després el retinal es pot oxidar a àcid retinoic. Aquest pas de retinol a àcid retinoic és irreversible, fet pel qual la seva producció és molt regulada perquè actua com a lligand pels receptors nuclears. Un lligand és una espècie rica en electrons i que permet enllaçar-se formant enllaços covalents coordinats amb altres molècules. L'àcid retinoic es pot unir a dos receptors nuclears diferents per iniciar la transcripció de gens.
- **Dermatologia:** la vitamina A intervé de forma important en la salut de la pell. Des de fa anys que s'utilitza el retinol com a tractament de l'acne reduint dràsticament la mida i la secreció de les glàndules sebàcies. Últimament és un producte que s'ha posat molt de moda ja que el retinol té la propietat d'exfoliar la pell de manera

continuada i formant col·lagen, fent que la pell es vegi més saludable i sense arrugues. Actualment la majoria de cremes per al tractament de les arrugues porten retinol. Però el retinol fa que la pell quedi molt sensible a la llum provocant l'aparició de taques o fins i tot cremades importants a la pell, si es combina el seu ús amb el sol. Per evitar això, els tractaments amb retinol s'han de combinar amb fortes proteccions solars.

6.1.2. Beta carotens i vitamina A

Els beta carotens es poden convertir en vitamina A i per tant hi ha una equivalència directa entre la quantitat de beta carotens ingerits i la quantitat de retinol que aquests generaran. Segons l'institut de medicina dels EUA, 1 µg de retinol correspon a 2 µg de beta carotè en oli o 12 µg de beta carotè ingerits amb l'alimentació normal.

La producció de retinol a partir de les provitamines està regulat per la quantitat de retinol que l'organisme té a disposició. Aquestes conversions anteriors, per tant, serien només aplicables a les persones que tinguessin deficiència de vitamina A. L'absorció de les provitamines també depèn de manera important de la quantitat de lípids que s'ingereixen amb els beta carotens. Com més lípids, millor és la captació de la vitamina A.

Els beta carotens també són uns potents antioxidants. S'explicarà el seu metabolisme i importància en l'organisme en l'apartat següent, dels alfa carotens, ja que aquets tenen un poder antioxidant més gran que no pas els beta carotens.

6.2. Alfa carotens

Igual que el beta carotè, l'alfa carotè és un potent antioxidant i també actua com a provitamina A, però no és tant efectiu. El seu metabolisme és molt semblant al del beta carotè, però amb un rendiment més baix.

Els alfa carotens són uns potents antioxidants que actuen contra els radicals lliures produïts en l'oxidació de molècules actives de l'organisme per l'oxigen. En aquest aspecte, l'alfa carotè és més efectiu en la reducció dels radicals que el beta carotè.

Els alfa carotens, igual a la resta de carotenoides són molt efectius desactivant molècules excitades electrònicament, és a dir, de radicals lliures. La neutralització del superòxid es porta a terme a partir d'una reducció física i química. La interacció dels carotenoides depèn principalment de la reducció física, la qual implica la transferència directa d'energia entre les dues molècules. L'energia del superòxid es transfereix al carotenoide produint oxigen en el seu estat normal, i carotè triplet excitat. El carotenoide torna al seu estat original dissipant aquesta energia en forma de calor. Ja que els carotenoides queden intactes durant la reducció del superòxid poden actuar varies vegades en aquests cicles. La seva activitat com a neutralitzadors està relacionada amb el nombre de dobles enllaços que contingui la molècula. Com més dobles enllaços, més eficaç és el carotenoide com a antioxidant.

6.3. Licopè

El licopè és un carotenoide que també actua com a antioxidant. És conegut per la seva utilització en la medicina per a la prevenció del càncer de pròstata.

El licopè és l'antioxidant més efectiu en la reducció del radical superòxid. Molts estudis demostren que el seu consum pot prevenir el càncer de pròstata i algunes malalties cardiovasculars com l'aterosclerosi. A causa del seu alt nombre de dobles enllaços conjugats, el licopè és molt més eficient que el beta carotè en inactivar el superòxid i el peròxid d'hidrogen.

Un estudi realitzat pels investigadors de la Universitat de Harvard, portat a terme en una població de 48000 persones que en la seva dieta hi constaven més de 10 racions de tomàquet i subproductes d'aquest a la setmana, ha revelat que el consum del licopè redueix en un 45% les possibilitats de desenvolupar càncer de pròstata.

D'aquesta manera, com ja s'ha explicat en l'apartat 5.5, el licopè actua com a neutralitzador dels radicals lliures unint-se amb ells i d'aquesta manera evitar que puguin aparèixer molècules nocives per a la salut.

7. Procés experimental

7.1. Introducció i justificació de la part experimental

Al tractar-se d'un treball de recerca, va semblar interessant buscar-li una part pràctica. En el nostre cas, la part experimental hi té un pes molt important. Abans de començar amb l'experimentació es proposen un seguit de preguntes a les que, durant els següents apartats, s'intentarà trobar-ne les respostes.

- a. *Què són els antioxidants? Quina estructura tenen?*
- b. *On es troben?*
- c. *Les coloracions iguals son produïdes pel mateix pigment?*
- d. *Com es poden extreure dels productes naturals que els contenen?*
- e. *Amb quins productes es pot treballar per portar a terme l'experiència?*
- f. *Quin són els dissolvents més adients?*
- g. *Com es pot saber si s'han extret els compostos que es buscaven?*
- h. *Quins dissolvents/eluents seran més idonis per fer una separació dels compostos extrets?*
- i. *Com es podrà plantejar una extracció a escala més gran?*
- j. *Quines tècniques d'extracció es podran utilitzar?*
- k. *Quin equipament es necessitarà? i quin procediment caldrà tenir en compte?*
- l. *Com es purificarà l'extracte?*
- m. *Quines tècniques es podran fer servir per separar i per identificar els compostos extrets?*

Seguint aquesta pauta, i considerant les hipòtesis que s'indiquen en l'introducció del treball, els objectius de l'experimentació són els següents:

- Avaluar on estan localitzats els antioxidants
- Optimitzar els processos d'extracció i purificació dels pigments vegetals
- Posar a punt les condicions de la CCP per a la caracterització dels pigments
- Caracterització espectrofotomètrica dels pigments extrets.

7.2. Pla de treball

Per portar a terme les experiències de manera rigorosa cal, en primer lloc, elaborar un esquema amb l'ordre a seguir per a obtenir uns bons resultats:

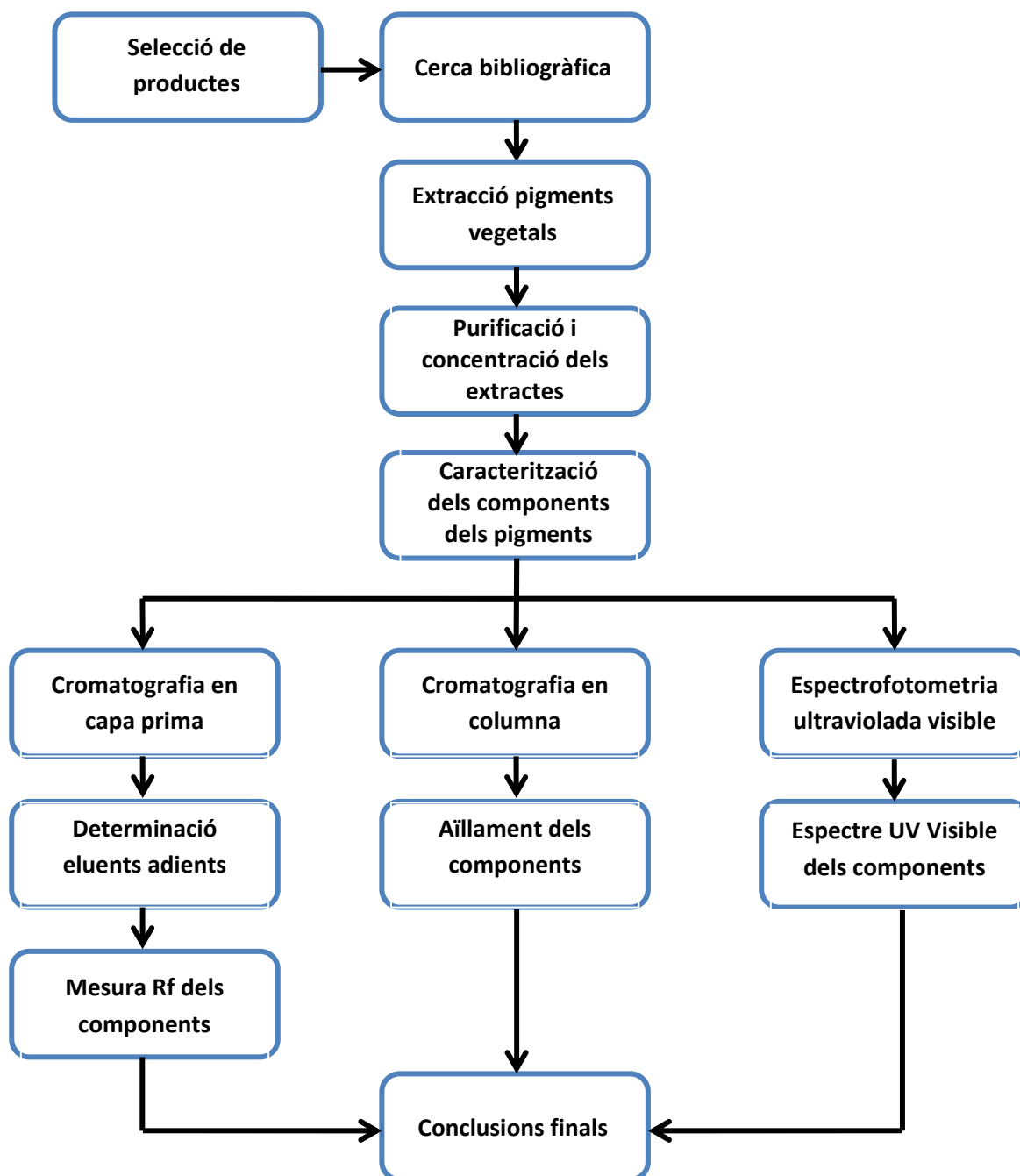


Fig. 7.1. Diagrama del pla de treball.

7.3. Experiències realitzades

A continuació s'exposen les experiències que es van programar per tal de portar a terme el pla de treball exposat.

7.3.1. Assaigs previs d'extracció dels pigments en tomàquet

En aquesta primera experiència es busca una resposta al primer objectiu:

- Avaluar on estan localitzats els antioxidants, és a dir els pigments, en els vegetals.

Fonament

Es pretén extreure els pigments vegetals utilitzant dissolvents orgànics. Aquest és el procés general per a la detecció dels diferents colorants. L'idea original era la de fer aquest experiment amb diferents aliments per a detectar-ne els seus components, però la dificultat i el relatiu poc temps del qual es disposava va obligar a fer-ho, només, amb el tomàquet.

Material

En l'annex hi ha tot el material i reactius utilitzats al llarg de les experiències realitzades.

Preparació de les mostres:

En primer lloc cal agafar la verdura que es vol analitzar i se'n treuen les parts que no s'aprofiten, com les fulles, tiges o nerviacions grosses. A continuació es talla utilitzant el ganivet o les tisores fins a aconseguir trossets petits del producte. Com que no va ser possible realitzar totes les extraccions en un sol dia, i tampoc es podia saber com d'eficient seria l'extracció dels pigments, es van haver de guardar les mostres en pots pirex i es van mantenir refrigerats durant uns dies.

Tomàquet:

Atès que a les preguntes inicials que es mostren en el **punt 7.1** s'ha plantejat on es troben els pigments, a l'hora de preparar les mostres de tomàquet s'hauran de tallar diferenciant-ne les parts. Es prepara una mostra només amb les peles del tomàquet (TPE), una altra mostra només amb la polpa (TPO) i una última amb ambdues parts, la pela i la polpa (TS). És important no afegir-hi les llavors i la polpa blanca.

Procediment: extracció dels pigments

Pesada

- Primerament es pesen (en una balança electrònica) 10 grams de la mostra preparada, i a continuació s'hi afegeixen 5 grams de sorra de platja estèril que s'utilitzarà com a agent abrasiu a l'hora de triturar-ho en el morter.



Fig. 7.2. Balança electrònica



Fig. 7.3. Morter amb la mostra i el dissolvent

Trituració

- Es mesuren 25ml d'etanol (*segons Índex Merck*) en una proveta i s'aboquen juntament amb la mostra en un morter. Es tritura tot amb força fins a aconseguir un líquid de color (aprox. 15 min).

Filtració

- A continuació es prepara una filtració. Cal doblegar el paper de filtre i adherir-lo a les parets de l'embut. Ha d'encaixar perfectament, sense sobrar-ne pels extrems. Veure el fonament de la filtració a l'apartat A1.1.1 de l'annex.

Un cop obtingut l'extracte, s'aboca sobre el paper de filtre en tubs d'assaig. El filtrat conté els pigments que es volen detectar.

Resultat

S'han obtingut 3 diferents extractes a partir del tomàquet. A simple vista no s'hi pot veure cap diferència, ni es pot saber si realment s'han extret els carotens que es pretenia.

Conclusions

Per saber si s'ha fet una bona extracció dels pigments s'ha programat un assaig previ de separació dels components per CCP, i per tant no es podran treure conclusions de l'extracció fins després de realitzar les experiències de la CCP.

7.3.2. Assaigs previs per a la separació dels pigments per CCP

Fonament

Tenint en compte els fonaments de la CCP (apartat A1.1.2 de l'annex), aquesta tècnica es basa en el mateix principi que l'extracció, però amb una fase que es manté fixa en la placa, mentre que l'altra, el dissolvent, circula al llarg de la primera. La mostra es diposita a la part inferior de la placa i la mescla de components se separa d'acord amb la seva diferent velocitat de migració al llarg de la fase estacionària quan és arrossegada per la fase mòbil. (GEC, VI5, 766, 1976).

Amb aquest assaig es vol comprovar si els extractes dels pigments obtinguts en l'experiència anterior contenen un o diversos components. Això ens permetrà respondre a les preguntes c-f de l'apartat 7.1.

Procediment

- Es posen 5 ml d'hexà (dissolvent) en una proveta de 250 ml i a continuació es talla una tira de paper de filtre amb amplada suficient perquè passi per la proveta.
- Amb un capil·lar s'apliquen unes gotetes de l'extracte que es vol comprovar a 2 dits d'un extrem del paper de filtre. A continuació es posa el paper de filtre dins de la proveta amb l'hexà, sense que la taca d'extracte toqui en contacte directe el dissolvent, sinó només la punta del paper perquè pugui pujar i emportar-se els pigments. S'espera uns 5 minuts perquè el dissolvent pugui pujar pel paper de filtre i separi els pigments de l'extracte.

Resultats

Els extractes no van ser arrossegats per l'eluent. El recorregut dels components de l'extracte va ser nul.

Conclusions

Un cop finalitzada aquesta pràctica es va observar que l'eluent no havia arrossegat gens els components que s'hi havien posat. Això demostra que o bé el dissolvent no és l'adequat, o que l'extracció dels pigments no era prou concentrada.

Per tant, es va programar un assaig per a la cerca del millor eluent per a fer les CCP.

7.3.2.1. Assaig per a determinar el poder d'elució dels dissolvents

Fonament

Considerant el fonament exposat en l'assaig 7.3.2, per investigar quin és el millor eluent per a la separació dels pigments de l'extracte, després de veure que l'hexà no era eficient, es va portar a terme la següent experiència, emprant una sèrie de dissolvents. Veure annex, apartat A1.2.

En aquesta pràctica es va utilitzar l'extracte diluït en etanol que s'havia aconseguit extreure amb l'experiència 7.3.1.

Reactius i mostres utilitzades

a. Mostres

S'han treballat 2 extractes:

- tomàquet amb etanol (obtingut en assaigs previs d'extracció dels pigments).
- maduixa en aigua.

b. Dissolvents

- Hexà
- Clorur de metilè
- Acetona
- Èter dietílic
- Acetat d'etil
- Etanol

Procediment

Assaig 1

- S'agafa paper de filtre i es talla una tira allargada d'uns 10 cm d'amplada. Es separa en 6 parts diferents, on es posaran mostres problema de l'extracte i es provarà amb quin dels dissolvents s'escampa més.
- Un cop obtinguda la tira amb les 6 mostres problema de l'extracte que prèviament s'han posat amb el capil·lar, es pren el primer eluent i s'apliquen unes 20 gotes amb la micropipeta just sobre la taca de l'extracte. Es repeteix l'operació per les 6 mostres problema i els diferents eluents.

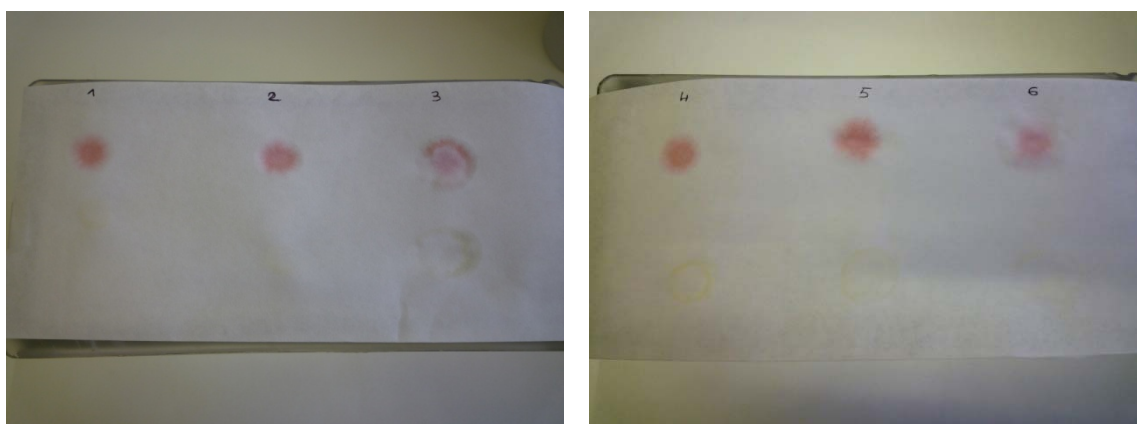


Fig. 7.4. Assaig de la capacitat eluent dels dissolvents

Assaig 2

Amb el mateix objectiu de l'assaig 1 es va preparar l'assaig 2, en el que es va repetir el procediment d'una manera més exacta per a obtenir el resultat més bo possible.

- S'agafen 6 papers de filtre circulars i es tallen des d'un extrem fins al centre per aconseguir un petit ble, que es posa plegat cap a la part posterior del paper. Amb un capil·lar s'aplica l'extracte just al centre, a tocar del tall que se li ha fet.
- Es preparen 6 càpsules de petri numerades i amb els diferents eluents en cada una d'elles.
- Es posa cada paper de filtre amb les mostres problema en una càpsula de petri diferent, de manera que el ble quedi en contacte amb l'eluent i permetent-li que pugui i escampi l'extracte, tot realitzant una cromatografia circular sobre la mostra.

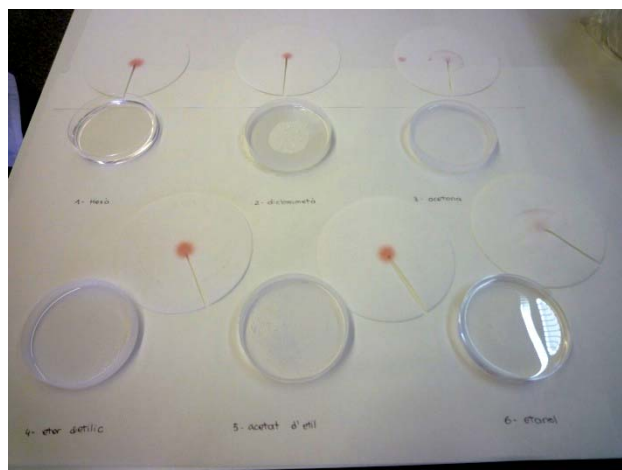


Fig. 7.5. Assaig del poder eluent dels dissolvents mitjançant una cromatografia en paper amb desenvolupament circular.

Resultats

En les figures 7.4 i 7.5 on es mostren els resultats de tots els eluents es pot observar:

1. L'eluent és l'hexà. Els components de l'extracte no s'han desplaçat.
2. L'eluent és el clorur de metilè. Els components de l'extracte no s'han desplaçat.
3. L'eluent és l'acetona. Els components de l'extracte s'han desplaçat formant un cercol al voltant del punt on s'havia situat la mostra.

4. L'eluent és l'èter dietílic. Els components de l'extracte no s'han desplaçat.
5. L'eluent és l'acetat d'etil. Els components de l'extracte s'han expandit, però no s'han separat de la taca inicial.
6. L'eluent és l'etanol. Els components de l'extracte s'han desplaçat formant un cercol al voltant del punt inicial, però de manera molt borrosa.

Conclusions

Després d'observar els resultats es comprova que el millor eluent per a la separació dels pigments és l'acetona. Per tant, en les pròximes experiències s'utilitzarà l'acetona com a eluent. La Fig 7.6. esquerra és una elució continua i la dreta és una elució manual i discontinua.



Fig. 7.6. Desenvolupament dels components de l'extracte de tomàquet en cromatografia en paper. Eluent: acetona

7.3.3. Assaig per a la purificació de l'extracte

A partir dels resultats obtinguts en els assaigs previs i d'acord amb les conclusions descrites a les experiències 7.3.1 i 7.3.2 es va planificar una extracció líquid - líquid per tal d'extreure amb dissolvent hexà els pigments que inicialment s'havien extret amb etanol, dissolvent que no havia resultat òptim.

Fonament

Tenint en compte els fonaments de l'extracció líquid – líquid (*veure annex apartat 1.1.2.*), amb aquest assaig es vol aconseguir un extracte més concentrat a partir de l'extracte obtingut en l'experiència 3.1.

- L'extracció i separació dels pigments pot realitzar-se en funció de la seva solubilitat diferencial en dissolvents tal com l'etanol (dissolvent polar) i l'hexà (hidrofòbic).

Procediment

- S'aboca l'extracte filtrat en un embut de decantació i s'hi afegeix 15 ml d'hexà. S'agita amb força durant mig minut i es deixa reposar fins que es formin dues fases ben diferenciades. En la fase superior hi haurà l'hexà amb els pigments liposolubles (carotens), i a la part inferior hi haurà l'etanol amb els pigments hidrosolubles (xantofil·les).
- Un cop obtingudes les dues fases ben diferenciades s'obre la clau de pas i s'extreu la fase etanòlica, que és la que es troba en la part inferior. A continuació es recull en un erlenmeyer sec la fase orgànica i es tapa. Finalment es passa la fase etanòlica a l'embut de decantació i es repeteix l'operació anterior dues vegades més, per assegurar-nos d'haver extret el màxim possible dels pigments hidrofòbics.



Fig. 7.7. Embut de decantació amb la fase orgànica separada

- Es recullen les fraccions orgàniques separades, a l'embut novament i es renten amb 20 ml de solució saturada de clorur de sodi, per tal d'eliminar restes d'aigua de l'extracte alcohòlic. Es procedeix com en la resta d'extraccions anteriors. S'agita, es deixa en repòs i, un cop separades les dues fases, s'obre la clau i s'elimina la fase aquosa.
- Es recull la fase orgànica en un erlenmeyer i s'hi afegeix dues puntes d'espàtula de sulfat de sodi anhidre per eliminar les restes d'aigua (la que contenia la polpa del tomàquet).
- Es filtren els sòlids i la fase orgànica i es posen en un evaporador rotatiu per a evaporar-ne tot el dissolvent i quedar-nos només amb l'extracte concentrat. El punt d'evaporació de l'hexà és de 69°C. Per tant és necessari deixar-lo a l'evaporador rotatiu una bona estona per a obtenir un extracte molt concentrat.

Resultats

Els extractes obtinguts van resultar molt concentrats, amb fortes coloracions.

Conclusió

Amb aquesta experiència s'han obtingut uns extractes molt concentrats que s'utilitzaran en l'experiència de la CCP. També es va decidir preparar nous extractes directament amb dissolvents hidrofòbics (hexà, acetat d'etil, acetona) per tal de comparar la seva capacitat d'extracció dels pigments.

7.3.4. Extracció de pigments del tomàquet amb dissolvents hidrofòbics. Assaig alternatiu al 7.3.1.

En aquest assaig s'intentarà aconseguir un extracte més efectiu utilitzant els dissolvent que van donar més bon resultat en l'experiència 7.3.2.

- S'agafa el tomàquet un cop tallat i es pesen 3 parts iguals de 5 grams cada una. Cada part del tomàquet es barreja dins d'un erlenmeyer amb un dissolvent diferent, per saber quin és el més efectiu. Una mostra es prepara amb 5 ml d'hexà

(Thexà), una altra amb 5 ml d'acetona (Tacetona) i l'última amb 5 ml d'acetat d'etil (Tacetat).

- Es deixen reposar les mostres i es filtren a continuació, seguint el mateix procediment que en l'experiència 7.3.1, amb el paper de filtre. Es recull el filtrat en un tub d'assaig i se separa la fase orgànica sobrenedant en el filtrat. S'asseca sobre sulfat de sodi anhidre i es conserva per a la seva anàlisi per CCP.

7.3.5. Aïllament dels carotens per cromatografia en capa prima.

Fonament

La cromatografia en capa prima (CCP) és un mètode de separació cromatogràfica per elució, en el qual l'eluent (un dissolvent o bé una barreja de dissolvents) passa a través de la fase estacionària, on s'hi ha dipositat unes gotes de la mostra problema. En aquest cas la fase estacionària és una capa adsorbent (SiO_2 o bé Al_2O_3) distribuïda sobre un suport, per exemple, una placa de vidre o d'alumini. El mecanisme de separació es basa principalment en les diferències d'afinitat d'adsorbir-se les substàncies sobre la superfície de la fase estacionària i posteriorment passar dissoltes a la fase mòbil. Veure ampliació del fonament en l'annex, apartat A1.2.

Procediment

- En primer lloc es prepara la cubeta d'elució. L'eluent utilitzat serà una mescla d'hexà i acetona ja que van ser els dissolvents més eficaços en la prova que es va realitzar (assaig 2 de l'experiència 7.3.2). Es posen 15 ml d'hexà i 15 ml d'acetona dins de la cubeta, de manera que impregni totes les parets, per a obtenir una cromatografia més eficient. Es tapa perquè els gasos quedin retinguts dins de la cubeta.
- S'agafen 2 plaques de cromatografia (silica gel) i s'hi posen les mostres dels diferents extractes amb un capil·lar. En total hi han 8 mostres que es reparteixen de 4 en 4 en cada placa. Les mostres s'han d'aplicar a 1,5 cm de l'extrem inferior i més o menys a 1 cm de la vora lateral.

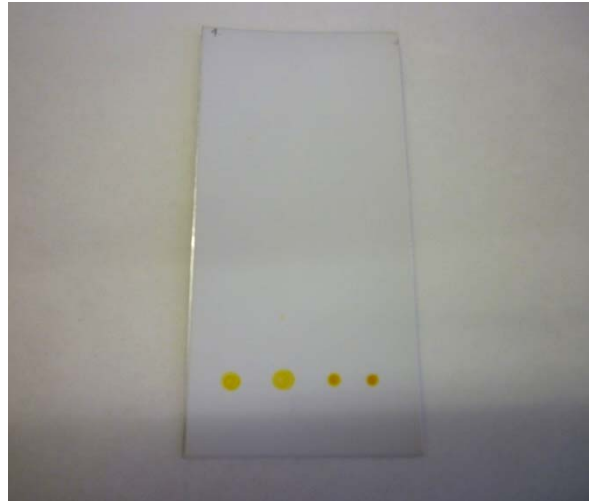


Fig. 7.8. Mostres en la placa

- Es col·loquen les plaques dins de la cubeta d'elució, en posició vertical. Cal que el front de l'eluent ascendeixi horitzontalment
- Es deixa eluir fins que el front de l'eluent es trobi a uns 9 cm de la base. És recomanable no obrir i tancar la tapa durant el procés d'elució per evitar l'entrada d'aire que faci disminuir la concentració dels vapors de l'eluent dins de la cubeta.
- A continuació es treuen les plaques de la cambra i es mesuren els Rf sota el focus de llum ultraviolada.

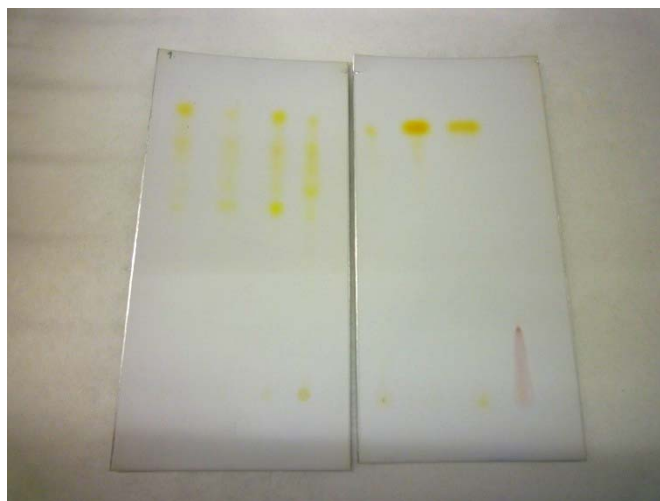


Fig. 7.9. Plaques amb la cromatografia feta

- 1: TPE en acetat d'etil
- 2: TS en acetat d'etil
- 3: TPO en acetat d'etil
- 4: T en acetat d'etil
- 5: Tacetona, obtingut en apartat 3.4.
- 6: Thexà, obtingut en apartat 3.4.
- 7: Tacetat d'etil, obtingut en apartat 3.4.
- 8: Maduixa en aigua

- Per a una visió més detallada del resultat es posen les plaques sota la làmpada ultraviolada

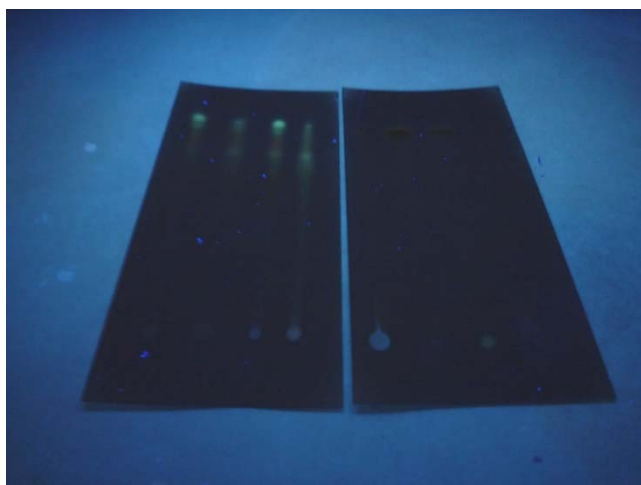


Fig. 7.10. Placa visualitzada a la làmpada ultraviolada

Resultats

Els extractes TPE, TS, TPO, T han pujat de manera similar i fins molt amunt. Els extractes Tacetona, Thexà i Tacetat han pujat una mica menys, però també de manera molt semblant. En canvi l'extracte M no s'ha desplaçat gairebé gens.

Taula 7.1. Taula dels extractes utilitzats i RF aconseguits

mostra	Contingut	X	Y	RF	Observacions
1	TPE	8,5	7	0,8235	Amb 360 nm donen taca fosforescent
2	TS	8,5	6,9 6,6	0,8117 0,7765	
3	TPO	8,5	7 5,6 4,2*	0,8235 0,6588 0,4941	
4	T	8,5	6,9 5,6	0,8117 0,6588	
5	T acetona	8,4	7	0,8333	
6	T hexà	8,4	7	0,8333	
7	T acetat d'etil	8,4	7	0,8333	
8	Maduixa	8,4	0,5*	0,0595	Molt polar, es queda retinguda en l'origen

X: recorregut eluent (en cm)

Y: recorregut components (en cm)

A partir d'aquest primer resultat ja es pot deduir que l'extracte M correspon a un component molt polar i per tant l'hexà i l'acetona que són uns dissolvents molt polars no l'han pogut desplaçar. També es pot deduir que es tracta d'un compost molt diferent a la resta. Serà un pigment que no té l'estructura del carotenoides. Atès que els antocians i flavonoides presenten grups hidroxil en la seva estructura (veure apartat 4.2.1), això fa que siguin solubles en dissolvents polars. També és sabut que aquests compostos poden canviar d'estructura segons en el medi en què es troben (àcid o base), és a dir, que poden actuar com indicadors d'acidesa.

Per a poder comprovar aquesta hipòtesi es fa l'experiment següent:

Es pren una solució de HCl i s'hi tiren unes gotes de l'extracte 7, tomàquet amb acetat d'etil. S'observa que l'extracte es dilueix ràpidament sense afectar al color de la solució. A continuació es repeteix aquesta operació, però ara amb l'extracte 8, maduixa en aigua.

Quan aquest extracte entra en contacte amb l'àcid canvia de color. Passa de color vermell a taronja intens.

Per a acabar de comprovar que no es tracta del mateix compost que la resta es repeteix el mateix experiment, però ara amb una base. Es posen unes gotes de l'extracte 7 en una solució de NaOH i s'observa que no passa res. Es fa el mateix amb l'extracte 8, i es veu com la solució es torna de color lila.

A partir d'aquesta experimentació es pot concloure que l'extracte 8 té un comportament semblant a un indicador àcid - base. Això confirma la hipòtesi que el component 8 no és de la mateixa família que la resta (en aquest cas el 7) ja que té un comportament molt diferent en contacte amb medis àcids i bàsics.



Fig. 7.11. *Extracte 8 en HCl i NaOH*

Conclusions

En l'anàlisi per cromatografia de capa prima, utilitzant plaques de sílica gel (5 x 10 cm) s'han utilitzat com a eluents dels carotens, l'acetona i l'hexà, dissolvents que havíem trobat òptims en l'assaig 7.3.2.

En la CCP d'un extracte de tomàquet, com s'observa en la Fig. 7.9, apareix més d'un isòmer del beta carotè de Rf entre 0.4941 i 0,6588. El licopè presenta un Rf 0,8235 - 0,8333.

En la CCP d'un extracte de maduixa en aigua, per les mateixes condicions cromatogràfiques, s'ha trobat un Rf de 0,0595, això confirma que els pigments de la maduixa són polars i no s'elueixen amb l'hexà. En l'extracte aquós de la maduixa s'ha identificat que té grups sensibles en el pH donat que hem vist que l'extracte canviava de

color al posar-lo en medi àcid o medi bàsic; Això fa pensar que l'estructura no és d'un carotè sinó que podria ser un antocià (flavonoide). Fent una recerca bibliogràfica s'ha trobat que el component majoritari del pigment de la maduixa és la pelargonidina

7.3.6. Obtenció de beta carotè i licopè a macro escala.

Una vegada s'ha experimentat amb els diferents dissolvents per a l'obtenció dels carotens, i amb diferents mètodes per a la purificació de l'extracte, a continuació es comença una nova experiència, des del principi, per a intentar obtenir els millors resultats possibles a partir de les experiències anteriors i les seves conclusions. Amb aquesta experiència es buscarà resposta a les qüestions g-k de la justificació de la part experimental.

Procediment

1. S'agafa 1kg de tomàquet i es talla traient les granes i la polpa blanca. A continuació es tritura fins a quedar una massa homogènia. S'agafa 1 pastanaga bullida i es tritura fins a aconseguir una massa homogènia.
2. Amb una balança electrònica es pesen les mostres que s'utilitzaran, a continuació, per a l'extracció dels carotens amb dissolvents diferents.

Taula 7.2. Preparació de les mostres.

Extracte	Mostra	grams	dissolvent	volum
1	tomàquet	300g	Acetat d'etil	100ml
2	tomàquet	300g	Acetat d'etil	100ml
3	tomàquet	20g	Acetat d'etil	10ml
4	tomàquet	20g	Hexà	10ml
5	tomàquet	20g	Etanol	10ml
6	tomàquet	20g	Acetona	10ml
7	pastanaga	10g	Acetat d'etil	10ml
8	pastanaga	10g	Hexà	10ml

3. A continuació es posen les mostres 1 i 2 en agitació en un bany maria orbital a temperatura ambient i s'hi deixen tota la nit perquè el dissolvent entri en contacte amb el tomàquet. La resta de mostres es posen en un agitador magnètic durant mitja hora.
4. Mentrestant es preparen les columnes de separació per a filtrar la mostra. S'agafa una columna de cromatografia i s'hi posa una capa de llana de vidre per a retenir les substàncies sòlides i deixar passar només el líquids.



Fig. 7.12. Columnes per a la filtració



Fig. 7.13. Mostra 3 filtrada

5. Es filtren les mostres 3 a la 8 amb les columnes, i es guarda el filtrat en tubs d'assaig. Es pot veure que s'obtenen dues fases, la inferior amb tota l'aigua que portava el tomàquet, i la superior, formada pel dissolvent amb tots els carotens.
6. Purificació de l'extracte: Comportarà la separació de les dues fases i l'assecat de la fase orgànica:

A continuació se separen les dues fases. Es recull la fase orgànica (superior) amb una pipeta i es guarda en un vial.

7. Per fer l'assecat es prenen micropipetes i s'hi posa un tap de llana de vidre. Un cop fet el filtre amb la llana, s'omple de sulfat de sodi anhidre (Na_2SO_4). Veure Fig. 7.14. Aquest compost, al ser anhidre, absorirà l'aigua que pot portar la fase orgànica de l'extracte. Es fa passar la fase orgànica (de les mostres 1 a 6) separada en el punt 6 per la microcolumna. Aquesta purificació es fa, només, amb 2 ml de cada extracte.
8. Un cop processades totes les mostres, es numerem i ja estan a punt per a l'espectrografia Ultraviolada-Visible.

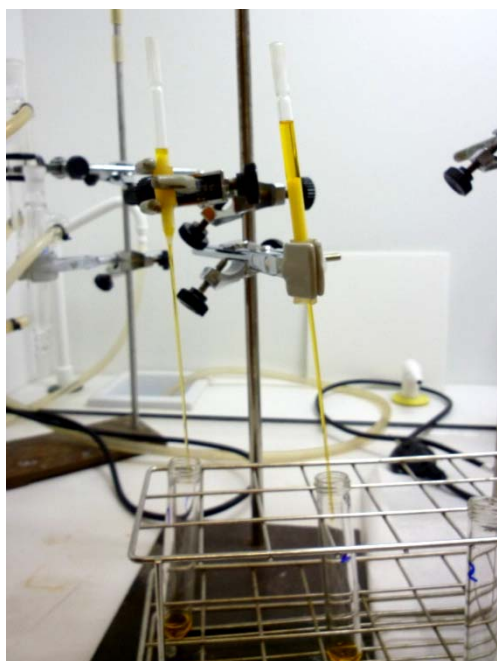


Fig. 7.14. Microcolumnes de Na_2SO_4 preparats per a l'anàlisi UVV-VIS

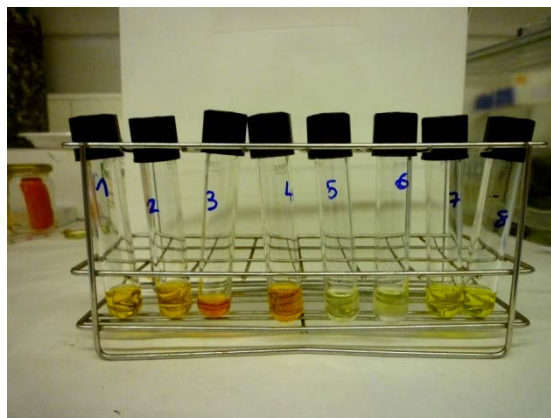


Fig. 7.15. extractes assecats

7.3.7. Aïllament dels pigments per a cromatografia en columna

Amb aquesta experiència es buscarà resposta a la qüestió *m* de la justificació de la part experimental.

Fonament

El fonament de la cromatografia en columna és similar al de la cromatografia en capa prima. En aquest cas, la fase estacionària (sílica o alumina) es troba dintre una columna (que pot ser una bureta) i la fase mòbil, l'eluent (que pot ser un dissolvent o una barreja de

dissolvents) s'addiciona per la part superior de la bureta, un cop s'ha dipositat la mostra en la part superior de la fase estacionària de la columna.

Procediment

Preparació de la columna

1. S'agafa una bureta de 25 ml i s'hi posen 5 ml d'hexà. A continuació s'hi col·loca llana de vidre i es prem fort perquè quedi ben atapeïda a la part inferior per tal de fer de filtre. També s'hi posa una mica de sorra perquè quedi una base plana.
2. Es prepara una pasta d'alúmina per a la separació. Es pesen 10g d'alúmina (Al_2O_3) i es barreja amb 15 ml d'hexà. S'agita amb força i s'aboca dins de la bureta amb la clau tancada. S'obre la clau i es recull l'hexà en una proveta. Es repeteix l'acció fins que tota l'alúmina estigui dins de la bureta. S'afegeix una mica de sorra a la part superior per obtenir una base plana.

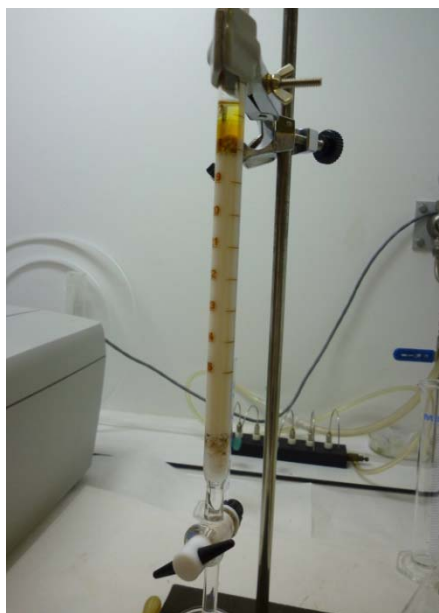


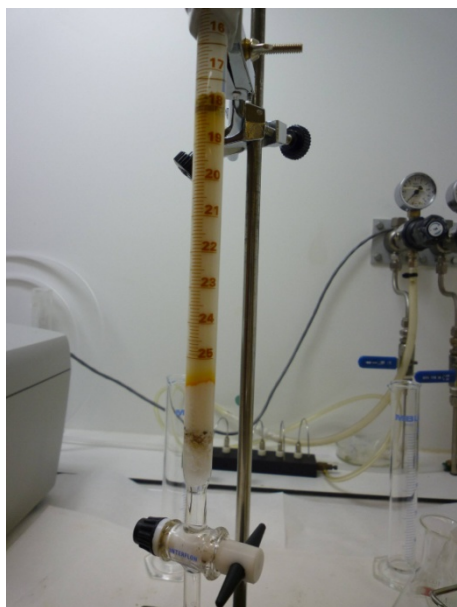
Fig. 7.16. Columna per a cromatografia líquida

3. A continuació s'obre la clau de pas i es recull en una proveta l'hexà sobrant. La resta d'hexà (l'inicial menys l'hexà recollit) serà l'hexà que queda retingut en l'alúmina i, per tant, el volum de retenció de la fase estacionària. Aquest serà el volum d'eluent que s'haurà de posar a la bureta per a recollir els components de l'extracte separat. En la nostra experiència, aquest volum era de 10 ml.

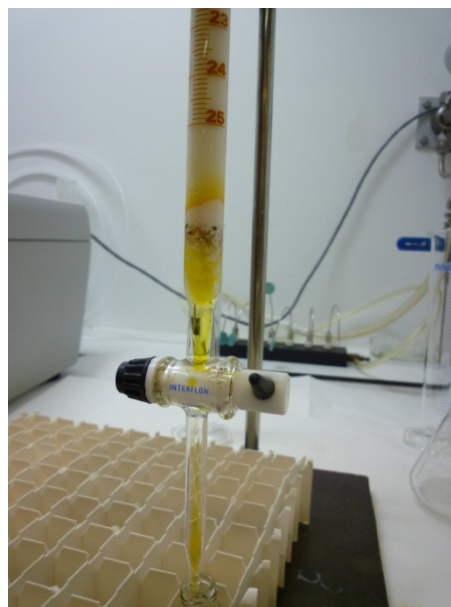
Elució dels components de l'extracte.

Amb la descripció de com es duu a terme l'elució dels components a través de la columna, s'indiquen també les fraccions que es van obtenir en la nostra experiència:

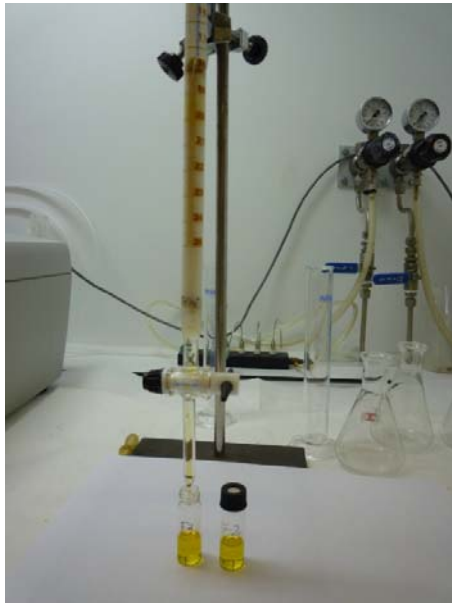
4. Seguidament s'introdueix 1 ml de la fase orgànica purificada (mostra 3, obtinguda en l'apartat 7.3.4) a la columna.
5. S'afegeixen 10 ml d'eluent, en el nostre cas hexà, i s'obre la clau de pas per a recollir la fracció 1 (F1). S'observa que els components de l'extracte es van separant i quan la banda s'acosta al final de la bureta es tanca la clau de pas i es recull en un altre vial. Aquesta és la fracció 2 (F2). *Fig. 7.17 (a).*
6. A continuació s'hi afegeixen 10 ml d'una solució 1:1 d'hexà:acetona. Es recullen 3 fraccions més, una amb els components més vermellosos (F3), una altra amb només eluent (F4) i l'última amb els components més polars, de coloració grogosa (F5). *Fig. 7.17 i 7.18.*



a)



b)



c)



d)

Fig. 7.17. detalls del procés d'elució per la columna dels components dels pigments de l'extracte 3.

- a)** F1 elució amb acetat d'etil **c)** F3 elució amb acetat d'etil
b) F2 elució amb acetat d'etil **d)** F4 elució amb acetat d'etil

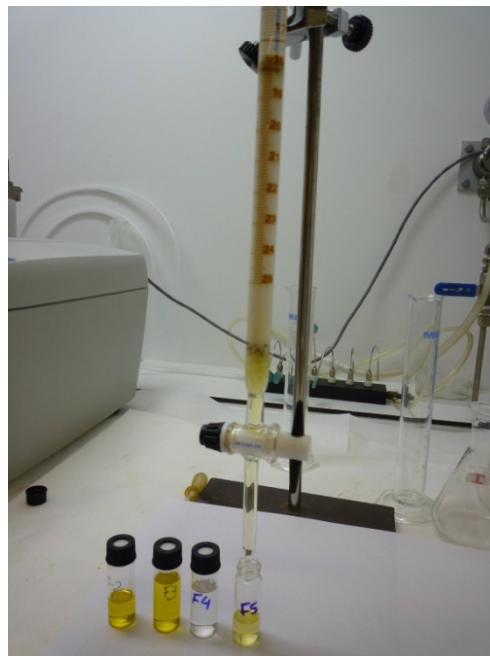


Fig. 7.18. Detall final de les fraccions recollides en la cromatografia en columna de l'extracte de la mostra 3.

Resultats

S'han obtingut 5 mostres diferents dels components de l'extracte. L'alúmina (fase estacionària) ha quedat finalment impregnada amb els 10ml d'hexà:acetona:

F1: 6 ml d'hexà sol, no s'utilitzarà en l'anàlisi per UVV-VIS. *Fig. 7.17 (a)*

F2: 3 ml d'hexà, possiblement amb beta carotè i una mica de licopè. De color grogosa. *Fig. 7.17 (b)*

F3: 3 ml d'hexà, possiblement amb licopè. De color grogosa més intensa que la F2. *Fig. 7.17 (c)*

F4: 3 ml d'hexà, aparentment amb cap component de l'extracte. Incolora. *Fig. 7.17 (d)*

F5: 3 ml d'hexà amb pigments més polars. De coloració grogosa poc intensa. *Fig. 7.18*

Aquestes fraccions seran analitzades posteriorment mitjançant espectroscòpia UV-VIS.

Conclusions

S'han pogut aïllar els components dels pigments, per tal de confirmar l'efectivitat de la tècnica de separació utilitzada i determinar quina pertany al beta carotè i quina al licopè.

Per aconseguir una millor separació es podria fer una nova experiència utilitzant més quantitat de fase estacionària. Es proposa fer una nova cromatografia en columna amb 25g d'alúmina (Al_2O_3) per a la cromatografia líquida en columna

7.3.8. Anàlisi d'espectrofotometria Ultraviolada-Visible de beta carotè i licopè

En aquesta experiència es comprovarà de manera definitiva si l'extracte aïllat en les mostres de l'experiència 3.6 i 3.7 contenen licopè, obtenint l'espectre d'absorció de les mostres.

Fonament

Com s'explica en l'apartat A1.2.3 de l'annex, amb l'espectrofotòmetre es pot identificar la substància que s'analitza comparant els espectres d'absorció que ens surten amb la recerca feta en els primers capítols d'aquest treball. Farem l'espectre per l'interval de $\lambda=400$ nm a $\lambda=600$ nm.

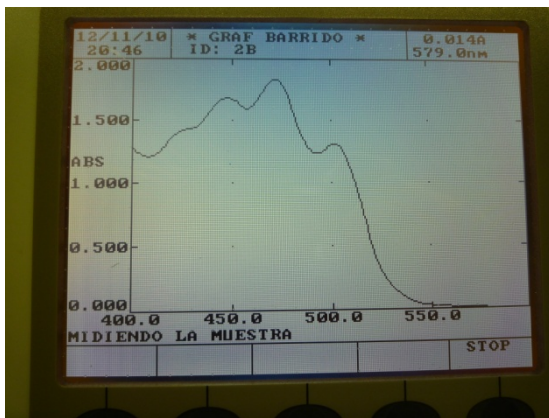
Mostres

S'analitzaran els extractes orgànics purificats obtinguts en l'assaig 3.6 i les fraccions aïllades en la cromatografia en columna de l'experiència 3.7.

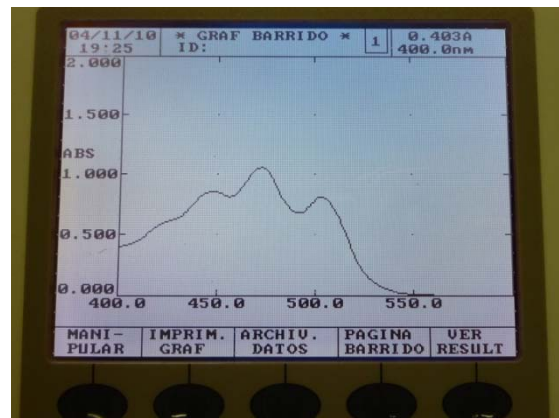
Procediment

1. S'utilitza un espectrofotòmetre de doble feix. Per a cada mostra es realitzarà l'espectre fent un escombrat de $\lambda=400$ nm a $\lambda=600$ nm.
2. Abans de cada lectura cal ajustar el blanc utilitzant les dues cubetes plenes (la de referència i la de mesura) amb el mateix dissolvent que conté cada extracte o fracció a analitzar, d'acord amb la Taula 7.2. En aquesta anàlisi del blanc es fa també l'escombrat de $\lambda=400$ nm a $\lambda=600$ nm. (veure l'explicació teòrica en l'annex, apartat A1.2.3).
3. Cal deixar al seu lloc la cubeta de referència amb el dissolvent. La cubeta de la posició de mesura de la mostra es buida del dissolvent, s'esbandeix bé amb la solució a analitzar i finalment s'omple amb la solució i es retorna ben seca al lloc de mesura.
4. Es farà la mesura de l'espectre ordenant a l'equip (RUN) per començar l'escombrat.
5. Precaucions:
Cal agafar sempre les cubetes per la part esmerilada i evitar ditades o gotes de líquid en les parets transparents. Cal reunir les restes de dissolvent i solucions orgàniques per tal d'abocar-les després als col·lectors de residus orgànics no halogenats o halogenats segons convingui.
6. Es repetiran aquests passos (seqüència 2 a 5) per a tots els extractes i fraccions.
7. Si els resultats surten d'escala caldrà diluir els extractes segons convingui. Si no s'observa senyal, caldrà concentrar l'extracte per confirmar si la solució estava molt diluïda o bé si efectivament no hi ha havia cap compost desitjat en la mostra analitzada.

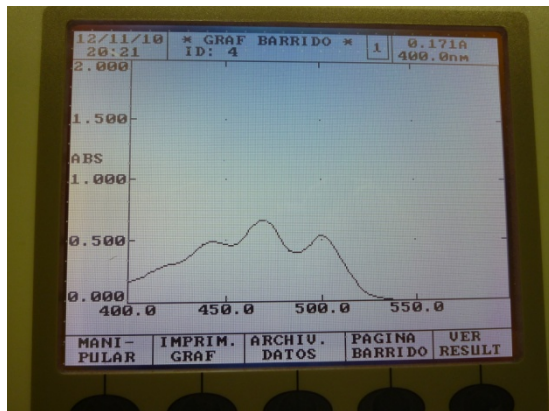
Resultats



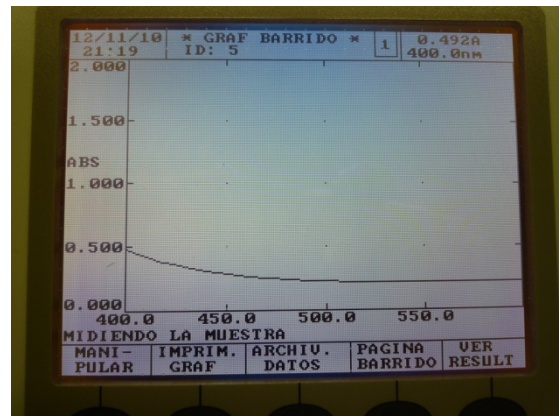
a)



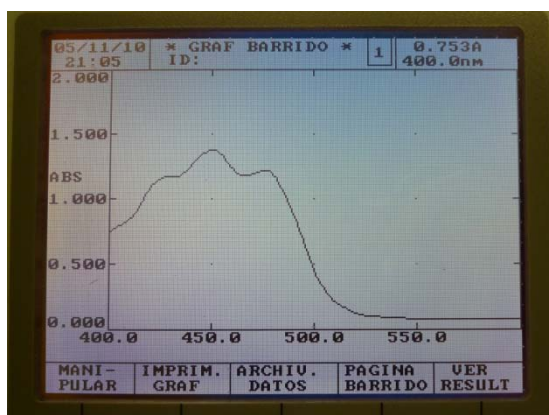
b)



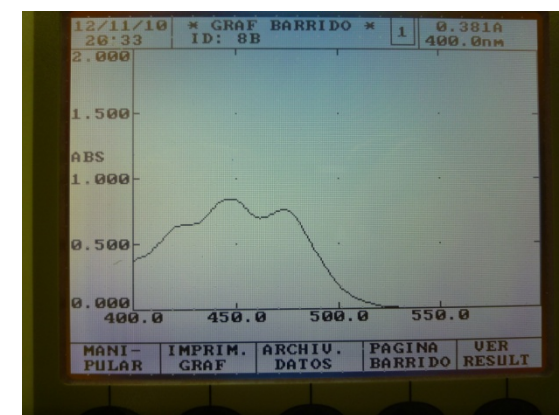
c)



d)



e)



f)

Fig. 7.19. Espectres UV-VIS dels extractes més significatius

A la Fig. 7.19 es presenta una selecció dels espectres de les mostres analitzades. S'han omès la 1 i la 6 perquè presentaven el mateix resultat que la 2 i la 5, respectivament.

Resultats

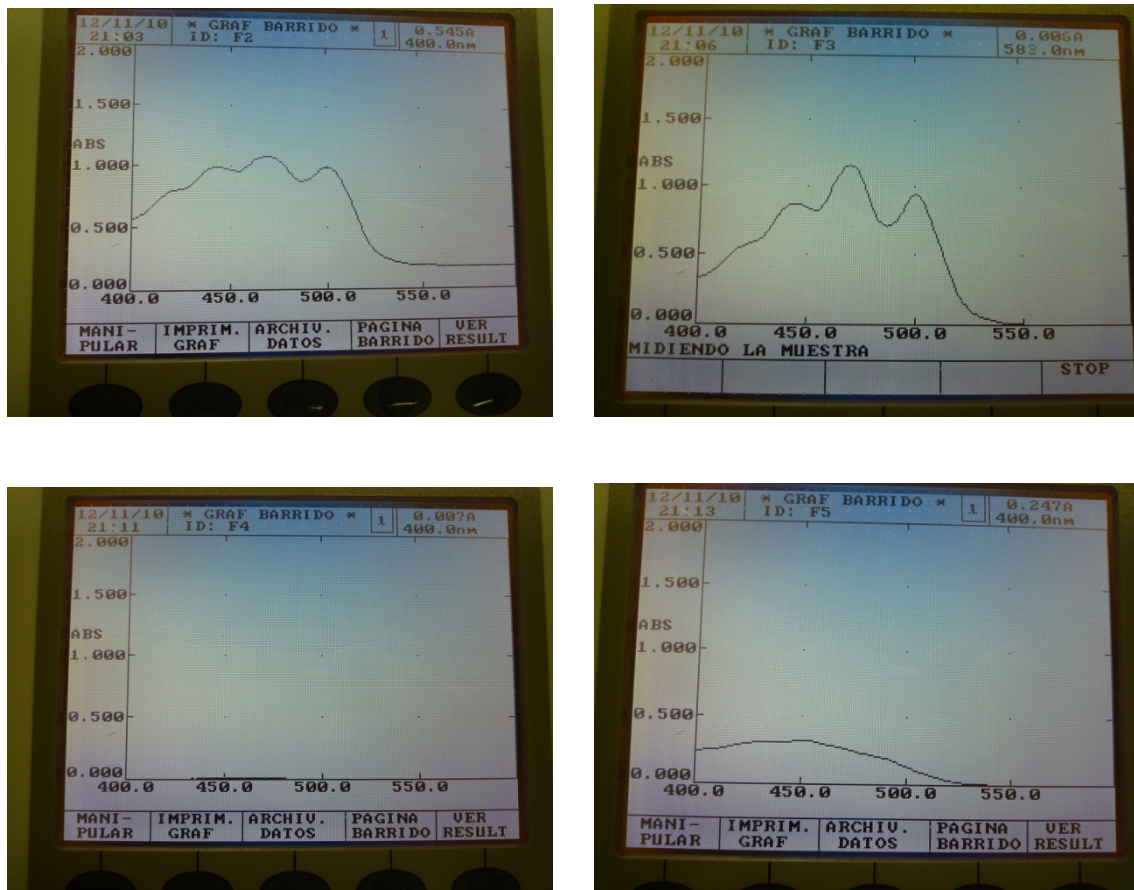


Fig. 7.19. Espectres UV-VIS dels extractes més significatius

Taula 7.3. Dades teòriques de l'espectrofotometria Visible dels carotens.

Pigment	Màxim d'absorbància λ en nm
Alfa carotè	422, 444, 473
Beta carotè	425, 451, 482
Gamma carotè	437, 462, 494
Licopè	446, 472, 505

Taula 7.4. Resultat de l'espectrofotometria.

Mostra	Producte	Dissolvent	Màx absorbància	licopè	β carotè	Observacions
2	Tomàquet	Acetat d'etil	445, 472, 505	si	no	Dilució més concentrada amb 1,5 ml d'extracte i 1,5 ml de dissolvent. Veure Fig 7.18 a)
3	Tomàquet	Acetat d'etil	448, 477, 506	si	no	Veure Fig 7.18 b)
4	Tomàquet	Hexà	446, 476, 503	si	no	Veure Fig 7.18 c)
5	Tomàquet	Etanol	-----	no	no	Veure Fig 7.18 d)
7	Pastanaga	Acetat d'etil	422, 450, 478	no	si	Veure Fig 7.18 e)
8	Pastanaga	Hexà	421, 448, 473	no	si	Veure Fig 7.18 f)
F2	Tomàquet	Acetat d'etil	448, 468, 506	si	si	Espectre d'absorció semblant al del beta carotè però una mica desplaçat cap a la dreta a causa del lycopè que també hi havia a la mostra. Veure Fig 7.19 g)
F3	Tomàquet	Acetat d'etil	445, 471, 504	si	no	Veure Fig 7.19 h)
F4	Tomàquet	Acetat d'etil	-----	no	no	Aquesta fase només conté l'eluent Veure Fig 7.19 i)
F5	Tomàquet	Acetat d'etil	-----	no	no	Components no identificats Veure Fig 7.19 j)

Conclusions

Segons els resultats anterior es pot arribar a les conclusions següents:

Les mostres 1 i 2 contenen licopè ja que els màxims d'absorbància de les mostres coincideixen amb els del licopè, però com que en el procés de l'extracció es varen barrejar suaument no estan gaire concentrades i, per tant, s'han hagut d'utilitzar unes dilucions 1:1 per aconseguir uns resultats visibles a l'espectrofotòmetre..

La mostra 3 també conté licopè i en aquest cas, com que el procés d'extracció es va barrejar de manera més intensa, s'ha aconseguit un extracte molt concentrat que s'ha hagut de diluir molt (0,5ml d'extracte en 10ml de dissolvent) per a obtenir uns resultats visibles a l'espectrofotòmetre.

La mostra 4 també conté licopè, però com que l'hexà és un dissolvent menys eficaç que l'acetat d'etil utilitzat en les mostres 1,2 i 3, l'extracte no és tant concentrat i per això l'espectre ha quedat amb el mateix perfil, però amb menys absorbància.

Les mostres 5 i 6 no contenen carotens ja que els dissolvents utilitzats per a la seva extracció són massa polars i no extreuen els components apolars com són els carotenoides que són liposolubles (veure annex, apartat A1.2.3)

La mostra 7 conté majoritàriament beta carotè i és un extracte molt concentrat en el que es va utilitzar l'acetat d'etil per a extreure els carotens de la pastanaga.

La mostra 8 també conté beta carotè però l'extracte no és tant concentrat perquè en l'extracció dels pigments es va utilitzar hexà.

Per tant, com a conclusió general es pot afirmar que l'acetat d'etil és el millor dissolvent per aïllar tant el licopè com el beta carotè de les fruites i verdures. També es pot afirmar que les pastanagues contenen beta carotens mentre que el tomàquet conté licopè en gran part.

Pel que fa a les fraccions, podem veure que la cromatografia líquida en columna emprant alumina com a fase estacionària pot ser una tècnica molt adient per a aïllar licopè, que s'ha recollit en la fracció 3.

8. Conclusions finals

8.1. Conclusions de la part teòrica del treball

Per poder explicar detalladament el color dels vegetals, primer ens hem centrat en la visió, ja que ens permet poder observar-los. La visió és l'adaptació del sentit de la vista a la regió de l'espectre electromagnètic on el sol ens ofereix la seva major intensitat de radiació, el rang de 400nm a 700nm. L'ull humà per tant és un complex sistema visual que ens permet captar la informació de tot allò que ens envolta a partir dels colors.

Tots els vegetals que consumim tenen color. Aquests colors són deguts als pigments, que tenen la capacitat d'absorbir només unes determinades longituds d'ona i reflectir la resta, que seran captades per als nostres ulls. Els pigments que donen color als vegetals són principalment els carotens, les xantofil·les i els flavonoides. Dins el grup de carotens hi ha el beta i l'alfa carotè, dos isòmers formats per 8 unitats d'isoprè cíclics en els seus extrems, de color ataronjat i que podem trobar en les pastanagues. El licopè, també del grup dels carotens, té una estructura més senzilla sense cap anell cíclic, és de color vermellós i el trobem en els tomàquets. La luteïna la trobem dins el grups de les xantofil·les, diferenciades dels carotens en que contenen molècules d'oxigen. Pel que fa als flavonoides són uns compostos orgànics que contenen un grup fenol i a diferencia dels carotens i les xantofil·les són uns pigments hidrosolubles, és a dir, es dissolen en aigua.

Aquests pigments actuen com a antioxidants en el cos humà, és a dir, són molècules capaces d'alentir o prevenir l'oxidació d'altres molècules. En el cos humà s'hi porten a terme milions de reaccions, algunes de les quals provoquen l'oxidació de les molècules, que pot provocar greus danys a les cèl·lules i fins i tot degenerar en malalties com el càncer i l'alzheimer. Els pigments vegetals, com el beta carotè, gràcies al seu poder reductor, són capaços de neutralitzar els radicals lliures produïts en l'oxidació, i d'aquesta manera ajudar a prevenir diverses malalties.

Per tant, es pot dir que la ingesta d'aliments de diferents colors és una bona manera de fer salut, ja que els pigments són unes molècules necessàries per al funcionament del nostre cos i que ens poden ajudar a prevenir moltes malalties en un futur.

8.2. Conclusions de la part experimental del treball

D'acord amb les conclusions parcials que s'exposaven en cadascuna de les experiències realitzades i les hipòtesis plantejades a l'inici del treball, s'ha trobat que:

- L'etanol no és un bon dissolvent per a l'extracció dels carotenoides del tomàquet, degut a la polaritat de l'etanol i el caràcter hidrofòbic dels carotens.
- L'acetat d'etil i l'hexà han resultat ser els millors extractants dels carotens.
- S'ha desenvolupat un mètode per tal de preparar extractes concentrats en beta carotè i en licopè a macro escala per extreure els pigments de la pastanaga i el tomàquet, utilitzant diversos dissolvents (acetat d'etil, acetona, hexà, etanol). Els extractes es van separar de la polpa mitjançant un filtració, seguida d'una decantació de la fase aquosa, i assecat posterior de la fase orgànica sobre sulfat de sodi anhidre. A partir de l'extracte etanòlic es va realitzar una extracció líquid-líquid amb hexà; es va separar i purificar la fase hexànica amb posterior evaporació del dissolvent per tal de obtenir un extracte concentrat dels pigments extrets per l'etanol.
- S'ha comprovat en els assaigs previs a la cromatografia de capa prima (CCP) que els millors dissolvents per a utilitzar com a eluents dels carotens, són l'acetona i l'hexà.
- En la CCP d'un extracte de tomàquet, utilitzant plaques de sílica gel (5 x 10cm), s'ha constatat que el millor eluent és hexà:acetona 1:1 (v/v).
- En la CCP d'un extracte de tomàquet, com s'observa en la Fig. 7.9, apareix més d'un isòmer del beta carotè de Rf entre 0,4941 i 0,6588. El licopè presenta un Rf 0,8235 - 0,8333.
- En la CCP d'un extracte de maduixa en aigua, per les mateixes condicions cromatogràfiques, s'ha trobat un Rf de 0,0595, això confirma que els pigments de la maduixa són polars i no s'elueixen amb l'hexà. En l'extracte aquós de la maduixa s'ha identificat que té grups sensibles en el pH donat que hem vist que l'extracte canviava de color al posar-lo en medi àcid o medi bàsic; Això fa pensar que l'estructura no és d'un carotè sinó que podria ser un antocià (flavonoide). Fent un recerca bibliogràfica s'ha trobat que el component majoritari del pigment de la maduixa és la pelargonidina.

- De l'extracte purificat de tomàquet amb acetat d'etil, s'han aïllat les fraccions dels pigments beta carotè i licopè mitjançant una cromatografia en columna (FE: alumina, FM: hexà i hexà:acetona 1:1 (v/v))
- S'han caracteritzat mitjançant l'espectrofotometria UV-Vis (λ 400-600 nm):
 - les fraccions de beta carotè i licopè aïllades en la cromatografia en columna de l'extracte del tomàquet. S'observen uns màxims d'absorbància experimentals a 448, 476 i 505.
 - els extractes de beta carotè de la pastanaga en hexà, els quals han servit per a confirmar l'espectre del beta carotè amb màxims d'absorbància experimentals a 421, 448 i 473.
 - els extractes de tomàquet aïllats en l'experiència 7.3.6 també van ser analitzats i vam poder comprovar que, malgrat que s'obtenen els espectres conjunts de licopè i beta carotè, es pot observar la intensitat de les bandes que està amb correspondència directe amb la solubilitat dels carotens en els dissolvents emprats. Això ens confirma el caràcter liposoluble dels carotenoides donada la característica estructura d'aquests compostos que són hidrocarburs insaturats.

Com a síntesi del treball experimental s'ha realitzat un protocol per a l'extracció i caracterització dels pigments del tomàquet. Aquest protocol sencer es recull en l'annex 2, al final d'aquest treball.

8.3. Opinió personal

Fer aquest treball de recerca m'ha agradat molt. He tingut la sort de poder anar als laboratoris de XXXXX durant 3 mesos a fer les experiències, on he après el funcionament del mètode científic, fent recerca i aplicant diverses hipòtesis que hem anat comprovant. Durant la meua estada als laboratoris he seguit tots els protocols de recerca i he obtingut coneixements en els diferents mètodes d'extracció, filtració i purificació de mostres. També he après a fer anàlisis quantitatives i qualitatives dels extractes a partir de diferents tècniques, com la cromatografia de capa prima o l'espectrofotometria. Pel que fa a la part teòrica del treball, m'ha ajudat per aprendre com ordenar i classificar la informació, així com fer una recerca bibliogràfica.

9. Bibliografia

Pàgines Web:

- [1] American Cancer Society, treatment, lycopene. [en línia]. www.cancer.org (última consulta: setembre 2010).
- [2] BILL Blair. *The Basics of Light*. [en línia].
<http://violet.pha.jhu.edu/~wpb/spectroscopy/basics.html>
(última consulta: octubre 2010)
- [3] Botanical, vegetable. [en línia]. www.botanical-online.com (última consulta: setembre 2010).
- [4] CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY. [en línia].
<http://legacy.spitzer.caltech.edu/espanol/edu/ir/> (última consulta setembre 2010)
- [5] Espectre del beta-carotè en benzè. [en línia]
http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_colourings.html
www.masazumifujiwara.net/pdfs/2009/pssc_sugi.pdf
www.masazumifujiwara.net/pdfs/PR08.pdf
(última consulta: octubre 2010)
- [6] GOOGLE. *Carotene*. [en línia]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Carotene> (última consulta: octubre 2010)
- [7] GOOGLE. *Lycopene*. [en línia]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lycopene> (última consulta: octubre 2010).
- [8] HERNÁNDEZ GIL, Rubén PHD. *LibroBotánicaOnLine: Fotosíntesis. (Espectre clorofila)*. [en línia]. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/fotosintesis/> (última consulta: octubre 2010)
- [9] NASA (Phil Newman). *NASA's Imagine The Universe*. [en línia].
<http://imagine.gsfc.nasa.gov/docs/introduction/emspectrum.html>
(última consulta: octubre 2010)

- [10] NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION. *The electromagnetic Spectrum*. [en línia]. <http://science.hq.nasa.gov/kids/images/ems/index.html> (última consulta: octubre 2010)
- [11] NATIONAL CANCER INSTITUT. [en línia]. www.cancer.gov (última consulta: setembre 2010)
- [12] NIST, chemistry webBook. [en línia]. <http://webbook.nist.gov> (última consulta: octubre 2010).
- [13] PETER V. Sengbusch. *Isoprenoids / Terpenes*. [en línia]. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e20/20b.htm> . (última consulta: octubre 2010).
- [14] RESTREPO GALLEGO, Mauricio et al. *Sustitución de tartrazina por betacaroteno en la elaboración de bebidas no alcohólicas. (espectre d'absorció del beta carotè)*. [en línia]. http://www.alfa-editores.com/web/index.php?option=com_content&task=view&id=1209&Itemid=66 (última consulta: setembre 2010)
- [15] Universitat Autònoma de Barcelona, revista de divulgació científica, avenços. [en línia]. www.uab.es (última consulta: setembre 2010).
- [16] USDA, nutrient data laboratory. [en línia]. www.nal.usda.gov (última consulta: octubre 2010).

Llibres:

- [17] BELITZ, H.D GROSH, W. *Química de los alimentos*. Saragossa, Acribia, S.A, 1985.
- [18] IES Vic, Coordinació de Batxillerat. *Treball de Recerca: Normes de presentació*. Vic: IES Vic, 2010.
- [19] OTT, Dana B. *Manual de laboratorio de ciencia de los alimentos*. Saragossa, Acribia, S.A, 1992.
- [20] SALFIELD, R. *Prácticas de ciencia de los alimentos*. Saragossa, Acribia, S.A, 1977.

Fonts de les imatges:

- (1) http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation
- (2) http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation
- (3) <http://legacy.spitzer.caltech.edu/espanol/edu/ir/windows/irwindows.html>
- (4) <http://www.celiasanchezramos.com/archivos/investigacion/segunda-tesis-CeliaSanchezRamosRoda.pdf> pàg. 32
- (5) <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/neuro/rodcells.gif>
- (6) <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/fotosintesis/>
- (7) <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/ATP>
- (8) http://www.xtec.es/~mbadia17/imatgesmicroscopielectronic/imatge_3.htm
- (9) <http://en.wikipedia.org/wiki/Carotene>
- (10) http://www.alfaeditores.com/web/index.php?option=com_content&task=view&id=1209&Itemid=66
- (11) <http://en.wikipedia.org/wiki/Anthocyanin>
- (12) <http://es.wikipedia.org/wiki/Aciclovir>
- (13) http://www.meta-synthesis.com/webbook/17_photo/photo.html

Annexes

El color dels vegetals: antioxidants i salut

A1. Fonaments teòrics en l'anàlisi dels pigments vegetals

El procediment experimental utilitzat per a la determinació dels diferents pigments en fruites i verdures consta de dues fases.

1. L'extracció dels colorants vegetals a partir d'una fruita o verdura.
2. Determinació del pigment mitjançant una cromatografia en capa prima i/o una espectrografia.

A1.1. Extracció del colorant

S'utilitzen els següents procediments:

A1.1.1. Extracció del colorant

Procediment que consisteix en filtrar una substància heterogènia, és a dir, la part que no es troba dissolta. El filtre reté el sòlid però deixa passar el líquid.



Fig. A1.1. Paper de filtre

Per realitzar una filtració s'ha de preparar el paper de filtre correctament perquè el procés sigui vàlid. Per aconseguir un filtrat òptim s'ha de doblegar de manera que obtinguem el màxim de superfície de paper possible. La manera més corrent és doblegar-lo en forma de plecs com es mostra en la figura (A1.1.) i a continuació col·locar-lo a l'interior d'un embut. Per a assegurar-nos de que el paper no es mourà el mullem una mica amb aigua destil·lada i així s'adhereix a les parets de l'embut.

Un cop preparat el paper de filtre de plecs, es munta el procediment per a la filtració. En un suport s'hi collen unes pinces mitjançant una doble nou. Aquestes subjecten un anell on s'hi introduirà l'embut. Tal com indica la figura (A1.2.) a sota de l'embut s'hi col·locarà un vas receptor, on el que es recollirà l'extracte filtrat.

Croquis de l'equip necessari per a la filtració:

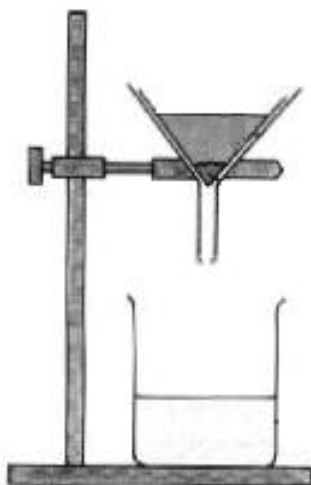


Fig. A1.2. Filtració

A1.1.2. Decantació

Aquest mètode s'utilitza per separar dos líquids amb diferents densitats. La mescla s'ha de deixar un temps en repòs a l'interior de l'embut de decantació per a que les substàncies es separin. A la part inferior de l'embut trobarem la fase més densa mentre que la que té un pes molecular més baix es trobarà a la part superior.

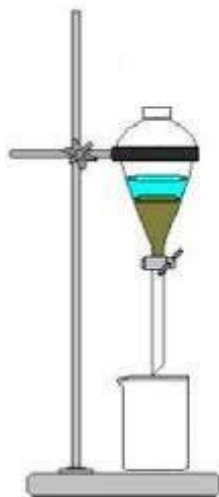


Fig. A1.3. Decantació

A la *Fig. A1.3* es pot veure clarament com, en repòs, les dues substàncies de la mescla queden ben diferenciades. Separar-les un cop arribat en aquest punt és senzill. S'ha d'obrir la clau de pas i tancar-la quan s'acosti a la línia diferenciadora.

Per fer una extracció més precisa és recomanable tancar la clau un tros abans d'arribar a l'altre substància menys densa, per evitar que se'ns barregin les dues mescles.

A1.2. Determinació dels pigments

A1.2.1. Cromatografia en capa prima (CCP)

Es tracta d'un procediment que s'utilitza en mescles de substàncies en poca quantitat, per determinar quines són. Aquesta tècnica es basa en la diferent velocitat d'absorció de cada component de la mescla en un fluid anomenat eluent. Consta de dues fases:

Fase estacionària:

Formada per un sòlid o gel que actuen com a suport per a la retenció diferencial dels diferents components de la mescla problema.

Fase mòbil:

Fluid que fa la funció de portador a la mescla a separar. És l'anomenat eluent.

Els eluents que es poden utilitzar per arrossegar mescles són l'aigua, l'alcohol o bé aquells líquids que segons les seves característiques puguin fer córrer els diferents compostos al llarg d'un paper de filtre o d'un cromatògraf més sofisticat. A mesura que avancen els components hi ha partícules que es fixen i deixen marques de color, que queden enregistrades al cromatograma.

Es disposa una gota de la dissolució obtinguda de l'extracció sobre una placa fina mitjançant una micropipeta. Seguidament es col·loca la placa cromatogràfica a la cambra d'elució. D'aquesta manera la placa es posa en contacte amb l'eluent que ascendeix arrossegant la nostra mostra.

Un cop la placa s'ha assecat es mesura la situació de cada pigment segons la posició d'on trobem la taca. Els pigments iguals han d'arribar a la mateixa altura.

Per detectar els pigments que estan presents a la nostra mostra s'utilitzen els paràmetres R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distància recorreguda pel compost (a)}}{\text{Distància recorreguda pel dissolvent (b)}}$$

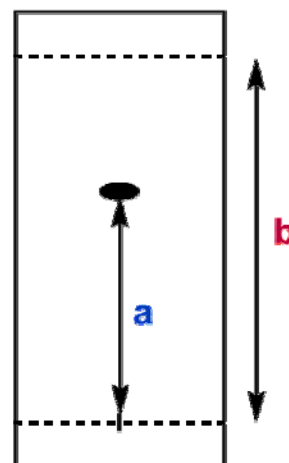


Fig. A1.4. Mesura de R_f

A1.2.2. Cromatografia en columna (líquida)

La cromatografia líquida és una tècnica de separació. És molt utilitzada ja que permet separar físicament els diferents components d'una solució a través de l'absorció selectiva dels constituents d'una mescla.

Com en totes les cromatografies, hi ha un contacte amb les dues fases, una de fixa (estacionària) i una fase mòbil que flueix durant l'anàlisi i que en el cas de la cromatografia líquida està composta per una mescla de líquids. La fase estacionària pot ser d'alúmina o sílica depenent de les característiques de l'extracte que volem separar i els seus components.

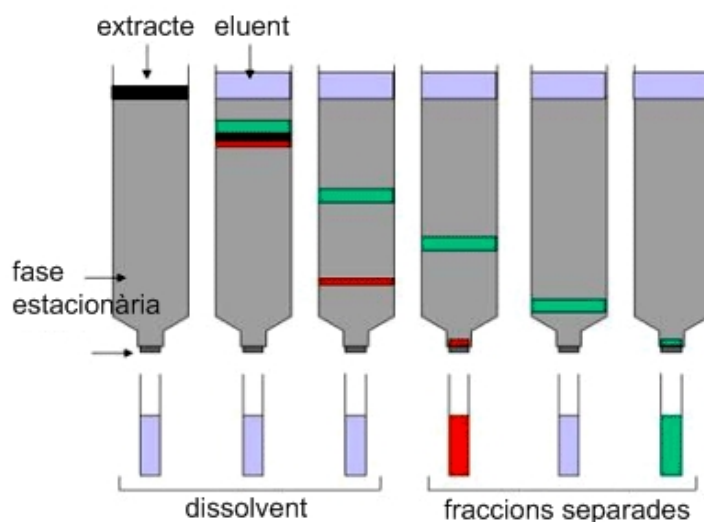


Fig. A1.5. Mesura de RF

Els components que estan més temps a la fase mòbil són els que avancen més ràpidament amb el seu mateix fluid, en canvi les que queden més unides (retingudes) a la fase estacionària no avancen tant i per tant són les que quedaran més enrere i seran les últimes en sortir.

Com es veu a la *Fig. A1.5.* en primer lloc sortirà tot l'eluent que contenia la columna, el qual recollirem en uns pots apart. Aquest volum és el volum de retenció de la columna. A continuació aniran arribant a la part baixa de la columna els diferents components de l'extracte, els quals anirem recollint per separat i amb molt de compte.

A1.2.3. Espectroscòpia ultraviolada - visible

Es tracta d'una tècnica analítica experimental molt utilitzada per a l'anàlisi quantitatiu i qualitatiu d'una enorme quantitat de substàncies. En concret, aquesta espectroscòpia

utilitza les radiacions electromagnètiques de les regions visibles, ultraviolada i infraroja. Es basa en que la radiació que és absorbida per les molècules d'aquestes regions de l'espectre provoca transicions electròniques que poden ser quantificades.

Aquesta espectroscòpia es regeix per una llei molt important, la llei de Beer-Lambert.

La llei de Beer-Lambert relaciona la intensitat de la llum entrant al medi amb la intensitat de llum que en surt després de que aquesta substància hagi produït absorció. La relació es pot expressar amb la relació següent:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-\alpha lc} = e^{-A}$$

I_1, I_0 , són les intensitats entrant i sortint respectivament.

$A = \alpha lc$, és l'absorbància, que també es pot calcular com: $A = -\ln \frac{I_1}{I_0}$

l és la longitud que travessa la llum en el medi

c és la concentració del component absorbent en el medi

$\alpha = \frac{4\pi k_\lambda}{\lambda}$ és el coeficient d'absorció

És a dir, l'espectrofotòmetre es basa en la quantitat de llum que absorbeix la mostra fent una resta de la intensitat inicial menys la intensitat de llum final, després de que la mostra n'hagi absorbit. El resultat d'aquesta resta és l'absorbància.

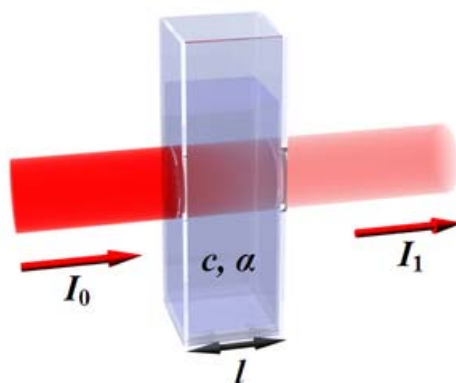


Fig. A1.6. Esquema de l'absorbància d'una mostra

Per aconseguir l'absorbància de la mostra, com que aquesta no es troba sola, sinó que està continguda en un dissolvent, la resta es complica en la qual, primer s'haurà de restar a la intensitat de la llum emesa per l'espectrofotòmetre la que és absorbida per aquest dissolvent, i a continuació, en aquesta intensitat de llum se li restarà l'absorbida pels components que volem analitzar. Per tant, necessitem preparar una cubeta amb el dissolvent que conté la mostra, la qual en direm blanc.

Abans d'iniciar l'espectroscòpia hem de mesurar el blanc de l'anàlisi. Per a fer-ho haurem d'omplir les dues cubetes amb el dissolvent que conté la mostra i posar-les al cromatògraf, una en el lloc del blanc, i l'altre en el lloc de la mostra.

Un cop tinguem el blanc mesurat, traiem la cubeta del lloc de la mostra i l'omplim amb l'extracte que volem analitzar. La cubeta del blanc no l'hem de treure.

La cubeta ha d'estar completament neta per evitar errors en la lectura de la intensitat de llum absorbida per l'espectrofotòmetre.

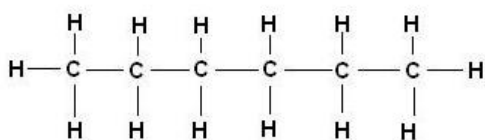


Fig. A1.7. Vista de l'interior de l'espectrofotòmetre

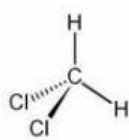
Dissolvents i polaritat

La polaritat és una propietat de les molècules que representa la desigualtat de les càrregues elèctriques en aquestes. Els dissolvents que provarem en l'experiència són:

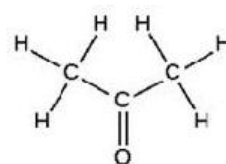
1. **Hexà:** És un hidrocarbur alifàtic. La seva estructura amb enllaços de carboni i hidrogen la fa molt apolar.
2. **Clorur de metilè:** És un compost covalent amb els enllaços molt polars.
3. **Acetona:** És un compost químic del grup de les cetones. Gràcies a la seva estructura molecular amb enllaços molt electronegatius és molt polar i per tant, soluble en aigua.
4. **Èter dietílic:** És un compost molt volàtil. Igual que en l'hexà, la seva estructura amb enllaços de carboni i hidrogen el fa molt apolar, però no tant perquè té una molècula d'oxigen.
5. **Acetat d'etil:** És un ester poc soluble en aigua, per tant apolar.
6. **Etanol:** És un compost químic del grup dels alcohols. És el compost més polar de tots els anteriors.



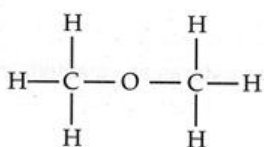
1



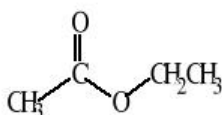
2



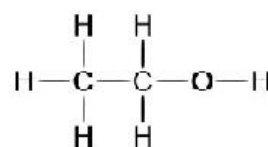
3



4



5



6

Taula. (A1). Orde dels dissolvents de més a menys polars.

1	Etanol	4	Acetat d'etil
2	Acetona	5	Èter dietílic
3	Clorur de metilè	6	Hexà

Reactius i materials utilitzats

L'utilitatge necessari per a la realització de la part experimental es relacions a continuació:

- Utilitatge de la part experimental
 - Ganivet
 - Espàtula
 - Morter
 - Micropipetes, pipetes
 - Capil·lars
 - Balança analítica
 - Pots pirex de plàstic amb tap de rosca
 - Provetes de 25, 10 ml
 - Paper de filtre
 - Suport, nous, cèrcol i pinces
 - Embut de decantació de 250 ml
 - Erlenmeyer de 100 ml
 - Tubs d'assaig amb rosca
 - Buretes de 100, 25 ml
 - Evaporador rotatiu
 - Làmpada ultraviolada
 - Espectrofotòmetre
- Reactius i productes utilitzats en la part experimental
 - Etanol
 - Acetat d'etil
 - Hexà
 - Èter dietílic
 - Acetona
 - Clorur de metilè
 - Sorra
 - Llana de vidre
 - Sulfat de sodi anhidre (Na_2SO_4)
 - Alúmina

A2. Protocol per a l'extracció i caracterització dels pigments del tomàquet

Objectiu:

Avaluar quins pigments vegetals conté el tomàquet, aconseguir-ne la seva extracció i purificació, i la caracterització per cromatografia en capa prima i espectrofotometria dels pigments extrets.

Fonament:

Partim de les hipòtesis següents:

- S'utilitzaran dissolvents orgànics apolars per extreure pigments vegetals apolars i a l'inrevés.
- Per analitzar els pigments, s'utilitzaran diferents eluents per a la separació dels components de cada pigment per CCP.
- Els components extrets amb els mateixos dissolvents i RF en CCP, tindran la mateixa estructura. Això es podrà comprovar en base al seu espectre d'absorció UVV-VIS.

Material i reactius:

- Material i aparells:
 - Ganivet
 - Morter
 - Micropipetes, pipetes
 - Balança analítica
 - Provetes de 25, 10 ml

Suport, nous, cèrcol i pinces
Embut de decantació de 250 ml
Tubs d'assaig amb rosca
Buretets de 100, 25 ml
Làmpada ultraviolada
Espectrofotòmetre

- Reactius:

Acetat d'etil
Hexà
Acetona
Sorra
Llana de vidre
Sulfat de sodi anhidre (Na_2SO_4)
Alúmina

Procediment:

A2.1. Extracció dels pigments vegetals del tomàquet

1.1. Preparació de les mostres:

- En primer lloc cal agafar els tomàquets que es volen analitzar i se'n treuen les parts que no s'aprofiten, com les fulles, tiges o nerviacions grosses. A continuació es talla utilitzant el ganivet o les tisores fins a aconseguir trossets petits del producte.

1.2. Pesada:

- Primerament es pesen (en una balança electrònica) 10 grams de la mostra preparada, i a continuació s'hi afegeixen 5 grams de sorra de platja estèril que s'utilitzarà com a agent abrasiu a l'hora de triturar-ho en el morter.

1.3. Trituració:

- Es mesuren 25ml d'acetat d'etil o hexà en una proveta i s'aboquen juntament amb la mostra en un morter. Es tritura tot amb força fins a aconseguir un líquid de color (aprox. 15 min).

1.4. Filtració:

- A continuació es prepara una filtració. Per a preparar les columnes de filtració, s'agafa una columna de cromatografia o una bureta i s'hi posa una capa de llana de vidre per a retenir les substàncies sòlides i deixar passar només la fase líquida.

S'aconsella fer-ho amb la columna perquè amb paper de filtre és molt lent.

- Filtrar l'extracte contingut en acetat d'etil i guardar-lo en tubs d'assaig.

1.5. Decantació:

- A continuació fem una decantació per a separar l'aigua de l'extracte. Aboquem amb molta cura l'extracte orgànic que es troba a la fase superior en un tub d'assaig, vigilant de no deixar-hi caure gens d'aigua. Acabem de separar-ho amb una pipeta pasteur, per a fer-ho més exacte.

1.6. Purificació:

- Seguidament preparem una columna per a l'assecat de cada mostra. Agafem micropipetes i hi posem un tap de llana de vidre. Un cop fet el filtre amb la llana, s'omple fins a la meitat de Na_2SO_4 anhidre. Aquest compost anhidre, absorbirà l'aigua que pot contenir l'extracte.

Un cop tenim les columnes preparades procedim a la purificació amb només 2 ml de cada mostra. Rentem finalment amb 2 ml d'acetat d'etil o hexà, segons el dissolvent en que s'hagi preparat l'extracte.

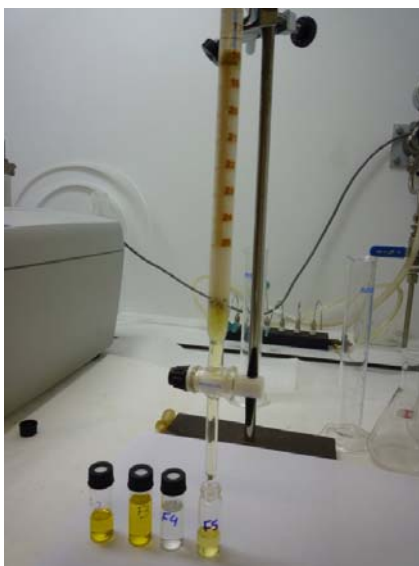
A2.2. Anàlisi dels extractes per Cromatografia en capa prima

- 2.1. En primer lloc es prepara la cubeta d'elució. L'eluent utilitzat serà una mescla d'hexà i acetona. Es posen 15 ml d'hexà i 15 ml d'acetona dins de la cubeta, de manera que impregni totes les parets, per a obtenir una cromatografia més eficient. Es tapa perquè els gasos quedin retinguts dins de la cubeta.
- 2.2. S'agafen 2 plaques de cromatografia (silica gel de 5 X 10) i s'hi posen les mostres dels diferents extractes amb un capil·lar. Les mostres s'han d'aplicar a 1,5 cm de l'extrem inferior i més o menys a 1 cm de la vora lateral. Es dipositen 5 gotes de cada extracte, esperant que s'evapori el dissolvent abans de la gota següent.
- 2.3. Es col·loquen les plaques dins de la cubeta d'elució, en posició vertical. Cal que el front de l'eluent ascendeixi horitzontalment
- 2.4. Es deixa eluir fins que el front de l'eluent es trobi a uns 9 cm de la base. És recomanable no obrir i tancar la tapa durant el procés d'elució per evitar l'entrada d'aire que faci disminuir la concentració dels vapors de l'eluent dins de la cubeta.
- 2.5. A continuació es treuen les plaques de la cambra i es mesuren els Rf sota el focus de llum ultraviolada. Per a mesurar els Rf s'ha de dividir el recorregut de cada component de la mostra per el recorregut total de l'eluent.
- 2.6. Per a saber si hem pogut aïllar els carotens o el licopè, haurem de comparar els nostres Rf trobats experimentalment amb els Rf de la bibliografia mostrats en la següent taula

Mostra	Rf
Licopè	0,8235 - 0,8333
Beta carotè	0,4941 - 0,6588

A2.3. Aïllament dels pigments per cromatografia líquida en columna:

- 3.1. S'agafa una bureta de 25 ml i s'hi posen 5 ml d'hexà. A continuació s'hi col·loca llana de vidre i es prem fort perquè quedi ben atapeïda a la part inferior per tal de fer de filtre. També s'hi posa una mica de sorra perquè quedi una base plana.
- 3.2. Es prepara una pasta d'alúmina per a la separació. Es pesen 10g d'alúmina (Al_2O_3) i es barreja amb 15 ml d'hexà. S'agita amb força i s'aboca dins de la bureta amb la clau tancada. S'obre la clau i es recull l'hexà en una proveta. Es repeteix l'acció fins que tota l'alúmina estigui dins de la bureta. S'afegeix una mica de sorra a la part superior per obtenir una base plana.
- 3.3. A continuació s'obre la clau de pas i es recull en una proveta l'hexà sobrant. La resta d'hexà (l'inicial menys l'hexà recollit) serà l'hexà que queda retingut en l'alúmina i, per tant, el *volum de retenció* de la fase estacionària. Aquest serà, com a mínima, el volum d'eluent que s'haurà de posar a la bureta per a recollir els components de l'extracte separat. En el nostre cas, el volum de retenció és de 10ml.
- 3.4. Seguidament s'introdueix 1 ml de la fase orgànica de l'extracte purificada a la columna de sulfat de sodi anhidre, obtingut en 1.6.
- 3.5. S'afegeixen 10 ml d'eluent, en el nostre cas hexà, i s'obre la clau de pas per a recollir la fracció 1 (F1). S'observa que els components de l'extracte es van separant i quan la banda s'acosta al final de la bureta es tanca la clau de pas i es recull en un altre vial. Aquesta serà la fracció 2 (F2).
- 3.6. A continuació s'hi afegeixen 10 ml d'una solució 1:1 d'hexà:acetona. Es recullen 3 fraccions més, una amb els components més vermellosos (F3), una altra amb només eluent (F4) i l'última amb els components més polars, de coloració grogosa (F5).



Fraccions de la columna líquida

A2.4. Anàlisi dels extractes per espectrofotometria Ultraviolada-Visible:

- 4.1. S'utilitza un espectrofotòmetre de doble feix. Per a cada mostra es realitzarà l'espectre fent un escombrat de $\lambda=400$ nm a $\lambda=600$ nm.
- 4.2. Abans de cada lectura cal ajustar el blanc utilitzant les dues cubetes plenes (la de referència i la de mesura) amb el mateix dissolvent que conté cada extracte a analitzar. En aquesta anàlisi del blanc es fa també l'escombrat de $\lambda=400$ nm a $\lambda=600$ nm.
- 4.3. Cal deixar al seu lloc la cubeta de referència amb el dissolvent. La cubeta de la posició de mesura de la mostra es buida del dissolvent, s'esbandeix bé amb la solució a analitzar i finalment s'omple amb la solució i es retorna ben seca al lloc de mesura.
- 4.4. Es farà la mesura de l'espectre ordenant a l'equip (RUN) per començar l'escombrat.

4.5. Precaucions:

Cal agafar sempre les cubetes per la part esmerilada i evitar ditades o gotes de líquid en les parets transparents. Cal reunir les restes de dissolvent i solucions orgàniques per tal d'abocar-les després als col·lectors de residus orgànics no halogenats o halogenats segons convingui.

4.6. Si els resultats surten d'escala caldrà diluir els extractes segons convingui. Si no s'observa senyal, caldrà concentrar l'extracte per confirmar si la solució estava molt diluïda o be si efectivament no hi ha havia cap compost desitjat en la mostra analitzada.

4.7. Per a confirmar si hem pogut aïllar els carotens i el licopè, haurem de comparar els nostres màxims d'absorbància trobats experimentalment en els espectres amb els màxims d'absorbància de la bibliografia de la taula següent:

Mostra	Màx. d'absorbància en λ	Màx. d'absorbància en λ	Màx. d'absorbància en λ
Licopè	446	472	505
Beta carotè	425	451	482
Alfa carotè	421	444	473

Qüestionari:

Com es pot saber si s'han extret els compostos que es buscaven?

Com es purificarà l'extracte? Explica'n els fonaments teòrics.

Quines tècniques es podran fer servir per separar i per identificar els compostos extrets? Explica'n els fonaments teòrics.

