

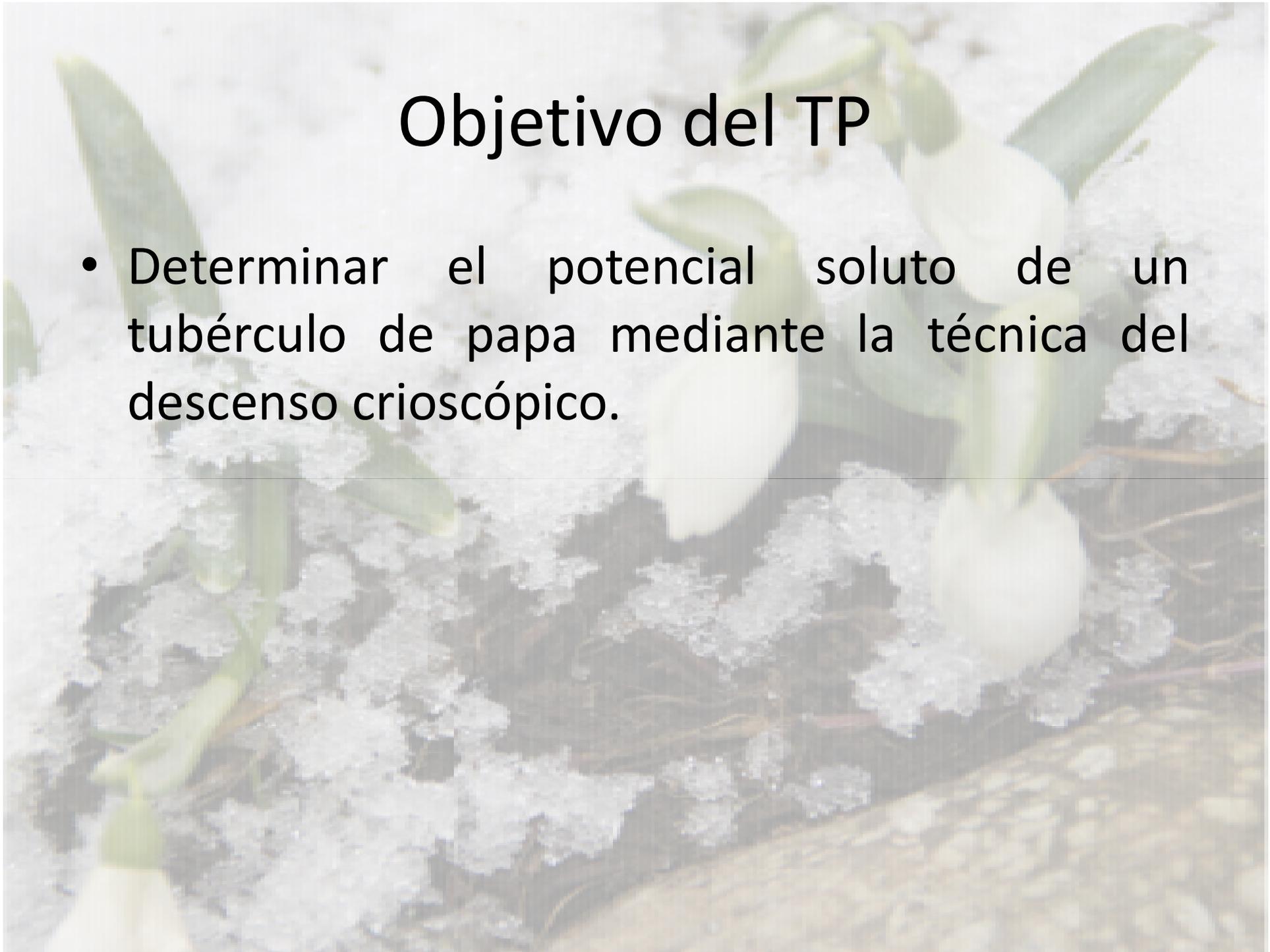


Trabajo Práctico Determinación de Potencial Solutivo por el método crioscópico

Dr Gustavo E Gergoff Grozeff
Ayudante del Curso de Fisiología
Vegetal – FCAyF UNLP

Objetivo del TP

- Determinar el potencial soluto de un tubérculo de papa mediante la técnica del descenso crioscópico.

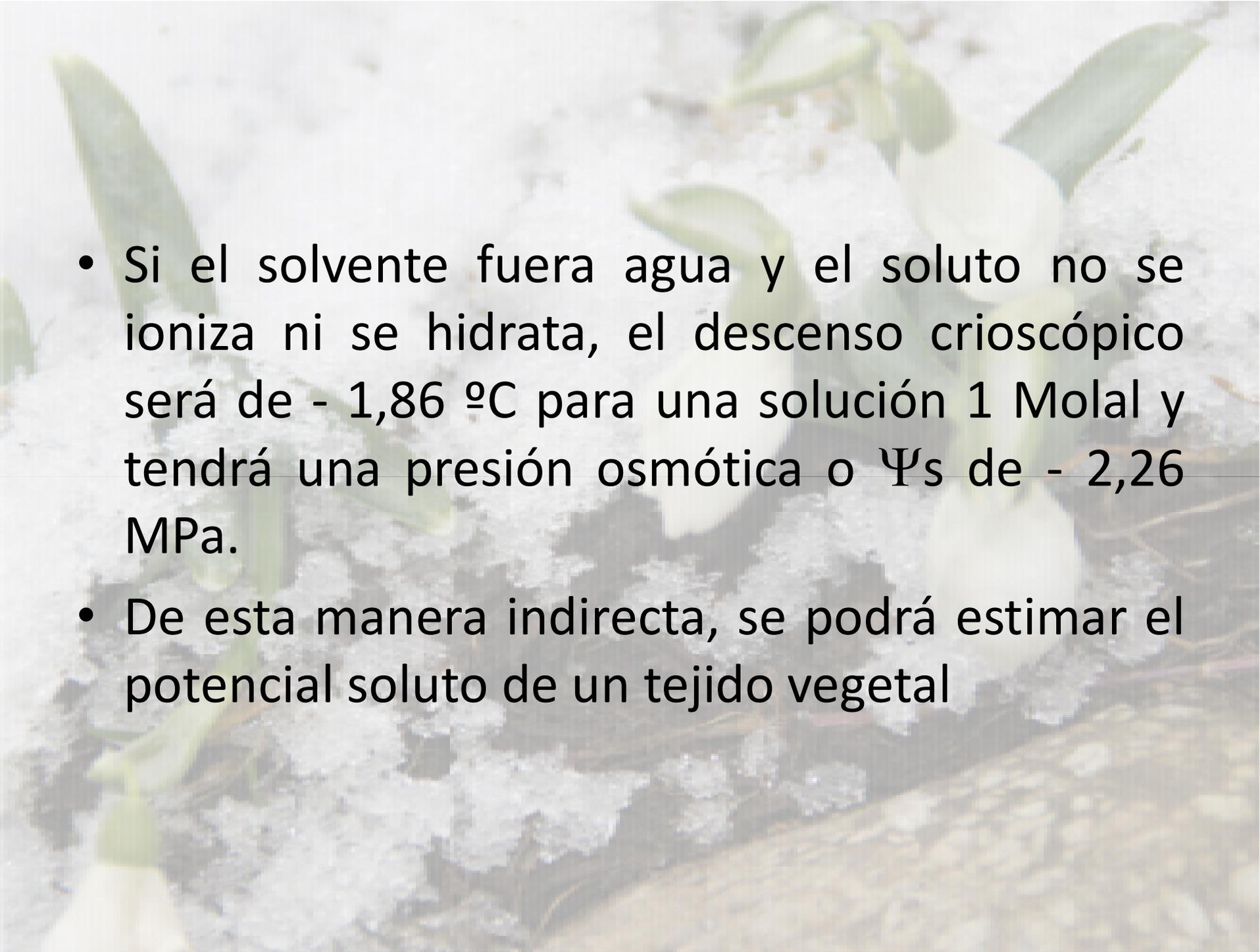


¿Qué es el descenso crioscópico?

- Es una propiedad coligativa, en la cual la magnitud del descenso de la temperatura depende directamente del número de partículas de soluto (sin importar su naturaleza) y de disolvente.
- La magnitud del descenso crioscópico está referida al punto de congelación del solvente puro (T_{fus}^*) y del la solución incógnita (T_{fus})

$$\Delta T_c = T_{fus}^* - T_{fus}$$

- El principio de este método está basado en que toda solución congela a menor temperatura que el solvente puro. La diferencia entre el punto de congelación de la solución y el del solvente, llamada **descenso crioscópico**, es proporcional a la concentración de la solución.
- Si a un solvente puro le disolvemos un soluto se le modifican las Propiedades Coligativas: temperatura de ebullición, temperatura de fusión, presión de vapor y capacidad de realizar trabajo (potencial químico). La magnitud de la modificación esta en relación a la cantidad de moléculas del soluto por cantidad de moléculas de solvente.

- 
- Si el solvente fuera agua y el soluto no se ioniza ni se hidrata, el descenso crioscópico será de $-1,86\text{ }^{\circ}\text{C}$ para una solución 1 Molal y tendrá una presión osmótica o Ψ_s de $-2,26\text{ MPa}$.
 - De esta manera indirecta, se podrá estimar el potencial soluto de un tejido vegetal

Materiales y métodos

- Termómetro
- Tubérculos de papa
- Extractor de jugo para las papas
- Tubo crioscópico
- Cuba aislante con mezcla refrigerante

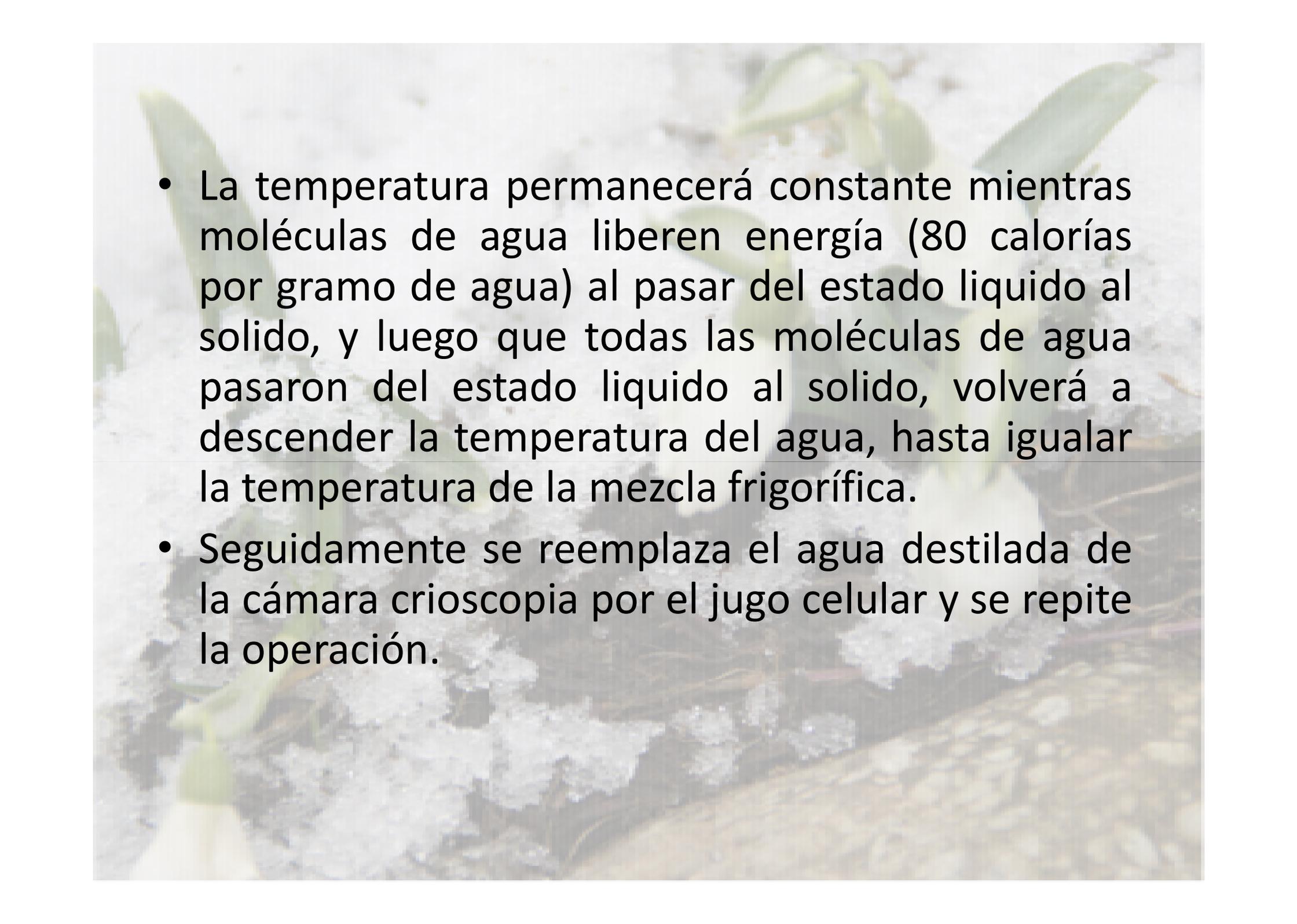


Procedimiento

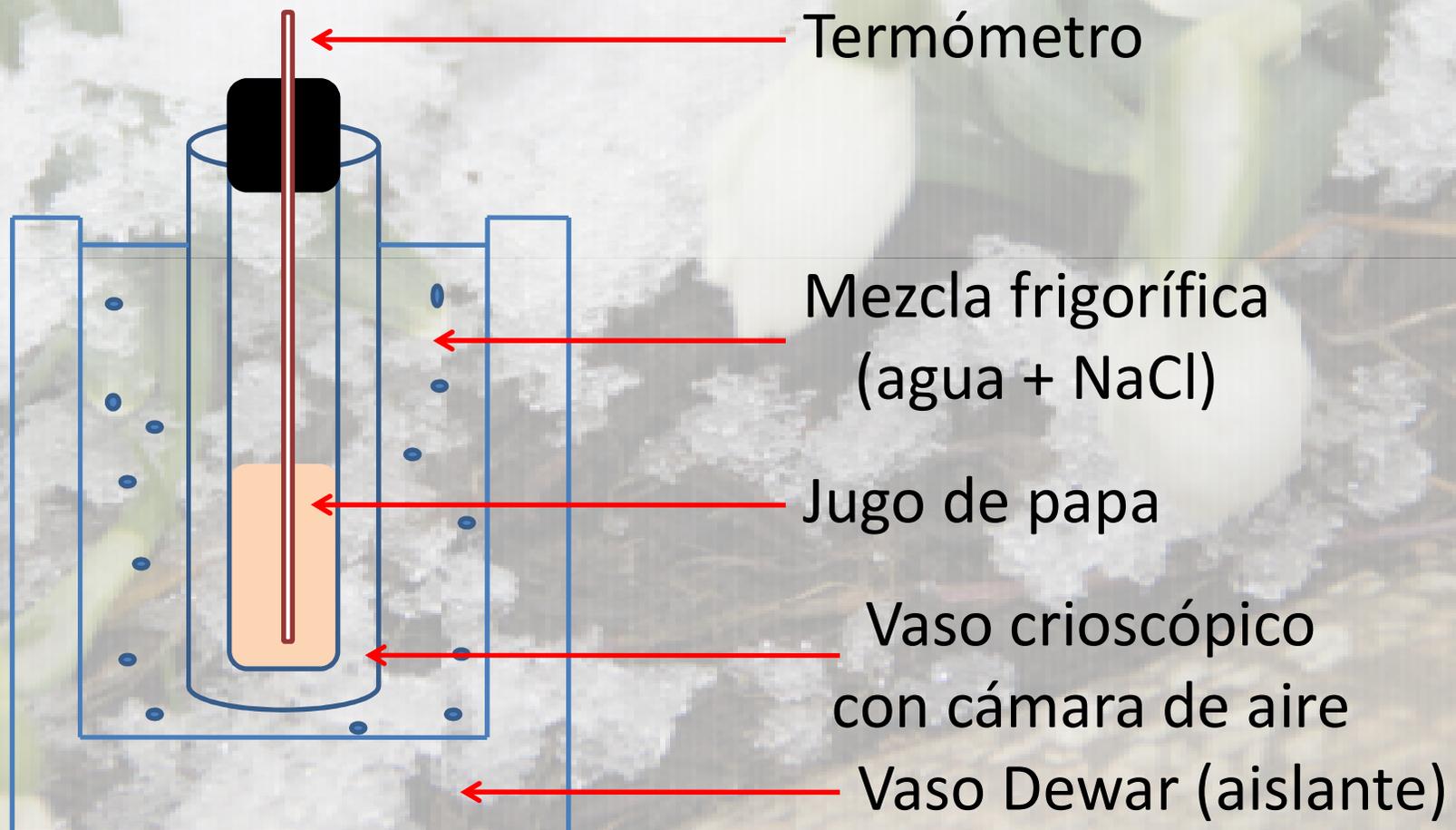
- Se procesan los tubérculos con el extractor y se obtiene el jugo de los mismos (15 a 25 ml).
- Crioscopio: el aparato que mide el descenso crioscópico consta de una cámara crioscópica, destinada a recibir el agua primero y el jugo luego. Está formada por un tubo de ensayo de paredes gruesas, rodeada por otro tubo más ancho, que forma una envoltura de aire, para evitar descensos bruscos de temperatura. El conjunto se sumerge dentro de un recipiente cilíndrico lleno de una mezcla de hielo y sal (refrigerante) u otro equipo refrigerado que provoque congelación del agua y del jugo celular.
- Su temperatura se mantendrá por lo menos a -15°C durante la operación.

Procedimiento

- La cámara crioscópica y el tubo que la rodea se introducen en la mezcla refrigerante agitando continuamente el agua destilada.
- Se observará el termómetro, tomándose nota de la temperatura que indique, cada medio minuto. Al comienzo del descenso será mayor del que corresponde al punto de congelación, por el fenómeno de sobrefusión. Pero agitando se llegará a la formación de pequeños cristales lo que provocará la subida de la columna. Cuando ésta permanezca estacionaria indicará la verdadera temperatura de congelación.

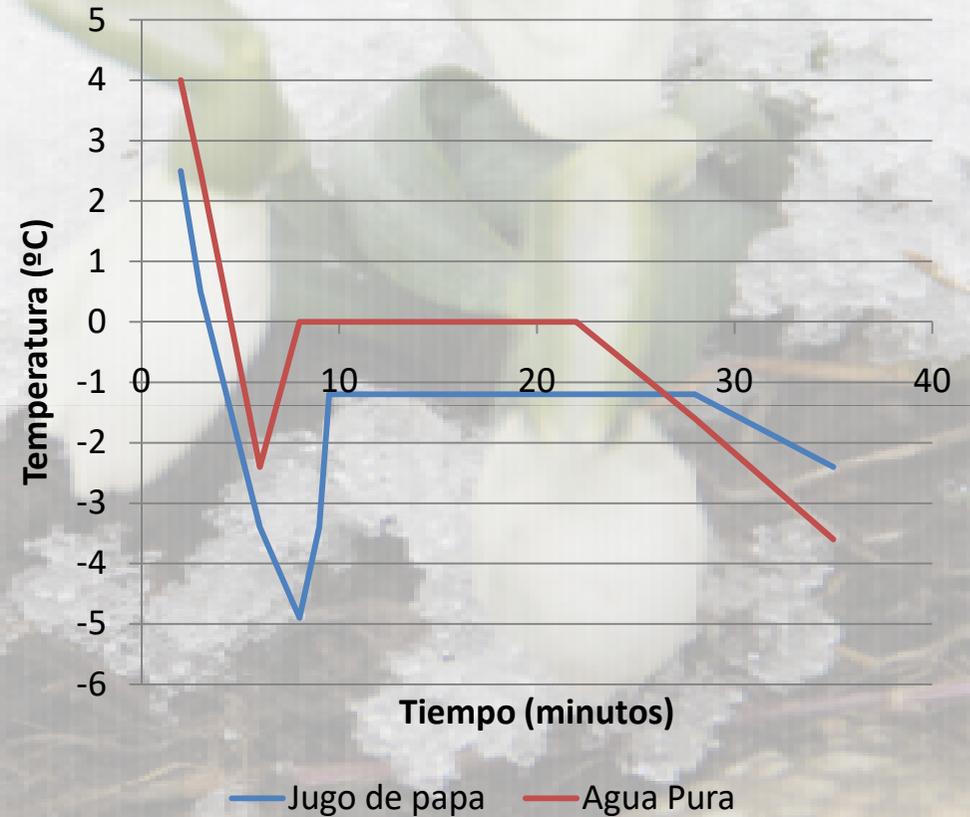
- 
- La temperatura permanecerá constante mientras moléculas de agua liberen energía (80 calorías por gramo de agua) al pasar del estado líquido al sólido, y luego que todas las moléculas de agua pasaron del estado líquido al sólido, volverá a descender la temperatura del agua, hasta igualar la temperatura de la mezcla frigorífica.
 - Seguidamente se reemplaza el agua destilada de la cámara crioscopia por el jugo celular y se repite la operación.

Dispositivo Experimental

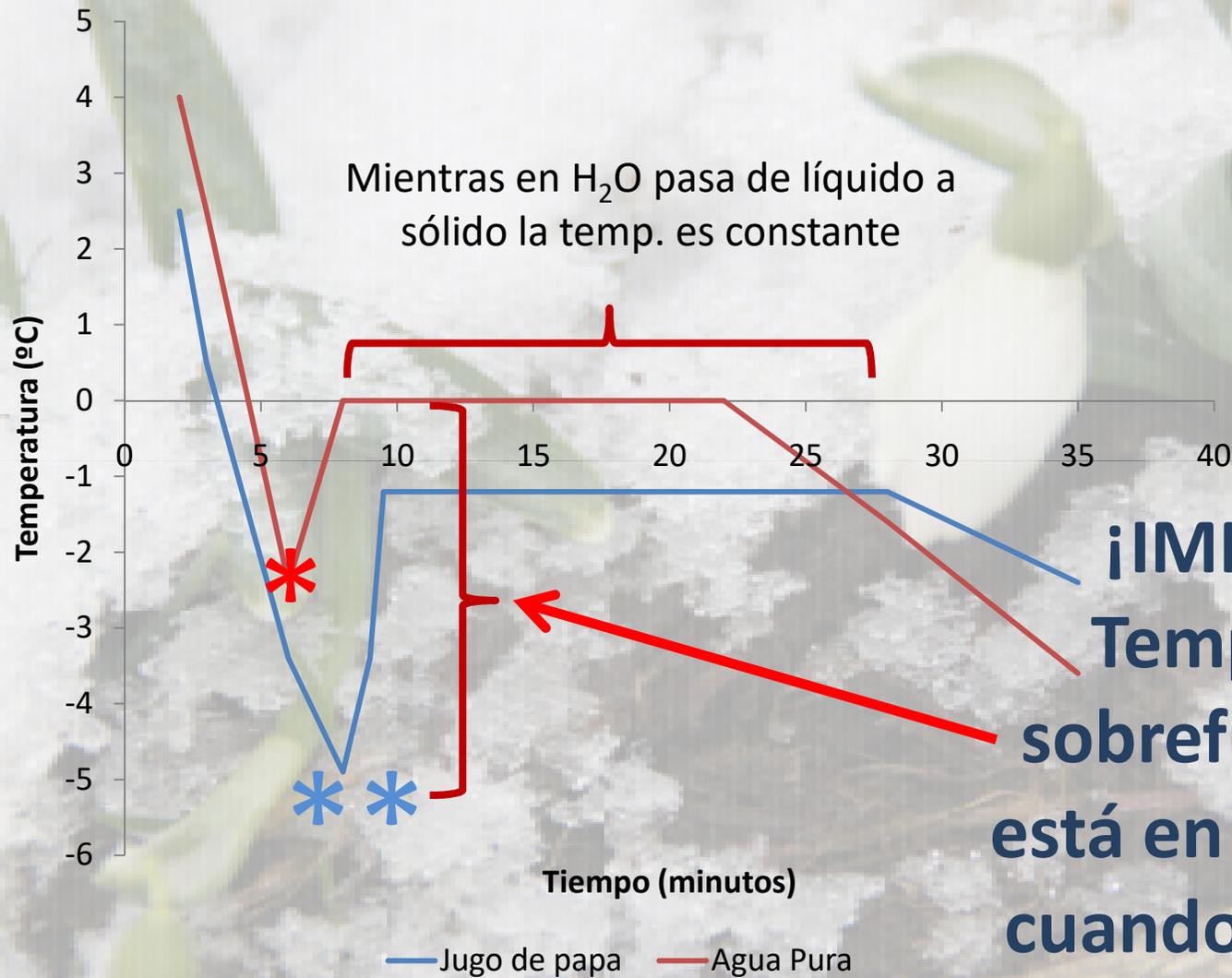


Resultados

Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	
	Jugo de papa	Agua Pura
2	2,5	4
3	0,5	2,5
6	-3,4	-2,4
8	-4,9	0
9	-3,4	0
9,5	-1,2	0
22	-1,2	0
28	-1,2	-1,6
35	-2,4	-3,6



Observar en el gráfico



* Se forma un cristal de hielo

** Se forma un cristal de hielo

¡IMPORTANTE!
Temperatura de
sobrefusión. El agua
está en estado líquido
cuando debería estar
sólida **

¿Cómo calculo el Potencial Solutivo?

- -1,86 °C equivalen a -2,26 Mpa

Por regla de tres simple . . .

- -1,2 °C equivalen a -1,45 Mpa

-1,45 MPa equivalen al ψ_{solutivo}

Si recordamos del TP de potencial de un tubérculo de papa

- Habíamos determinado que el potencial tubérculo era de $-0,8$ Mpa, por lo que podríamos estimar el Potencial pared de nuestro órgano.

$$\psi \text{ tubérculo} = \psi_{\text{pared}} + \psi_{\text{soluto}}$$

$$-0,8 \text{ Mpa} = \psi_{\text{pared}} + (-1,45 \text{ MPa})$$

Despejando . . .

$$\psi_{\text{pared}} = 1,45 \text{ Mpa} - 0,8 \text{ Mpa} = \mathbf{0,65 \text{ MPa}}$$

Estrés por bajas temperaturas

- Las plantas poseen diferentes mecanismos adaptativos y de aclimatación para superar el estrés por frío.
- Estrés por enfriamiento (*chilling stress*): temperaturas 0-15 °C dependiendo de la sensibilidad de la especie
- Estrés por congelamiento (*freezing stress*): temperaturas < 0 °C.

Rangos de tolerancia

- A medida que las plantas envejecen, la tolerancia es mayor
- También depende del estado fenológico. En estado de floración son mucho más sensibles.
- La tolerancia es mayor en órganos subterráneos o semillas (-273 °C) y menor en órganos en activo crecimiento o primordios florales

Prunus persica (duraznero) en plena floración



Chionodoxa luciliae (Gloria de las Nieves), adaptada al ambiente de la tundra



Adaptaciones en las membranas

- Plantas de climas cálidos o tropicales: poseen una proporción mayor de ácidos saturados
- Plantas de climas templado-fríos o fríos: poseen una proporción mayor de ácidos poliinsaturados

TABLE 25.5

Fatty acid composition of mitochondria isolated from chilling-resistant and chilling-sensitive species

Major fatty acids ^a	Percent weight of total fatty acid content					
	Chilling-resistant species			Chilling-sensitive species		
	Cauliflower bud	Turnip root	Pea shoot	Bean shoot	Sweet potato	Maize shoot
Palmitic (16:0)	21.3	19.0	12.8	24.0	24.9	28.3
Stearic (18:0)	1.9	1.1	2.9	2.2	2.6	1.6
Oleic (18:0)	7.0	12.2	3.1	3.8	0.6	4.6
Linoleic (18:2)	16.4	20.6	61.9	43.6	50.8	54.6
Linolenic (18:3)	49.4	44.9	13.2	24.3	10.6	6.8
Ratio of unsaturated to saturated fatty acids	3.2	3.9	3.8	2.8	1.7	2.1

^a Shown in parentheses are the number of carbon atoms in the fatty acid chain and the number of double bonds.

Source: After Lyons et al. 1964.

Mecanismos de resistencia al frío

- Antifreeze proteins (AFP): Proteínas con un efecto crioprotectivo, que impiden la formación de núcleos de hielo
- Disminuir el contenido acuoso en los tejidos
- El ABA está relacionado a la aclimatación de los tejidos y en semillas estimulando las proteínas LEA
- **Síntesis de osmolitos, entre ellos azúcares, como sacarosa, fructosa, rafinosa y fructosanos; y alcoholes como el manitol y el sorbitol o aminoácidos como la prolina. Estos osmolitos disminuyen el ψ soluto de las células haciendo que la temperatura de congelamiento disminuya.**

Bibliografía

- Azcón-Bieto & Talon, 2013. Fundamentos de Fisiología Vegetal.
- Taiz y Zeiger, 2006. Plant Physiology
- Tarkowsky & Van de Ende, 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. Disponible on-line:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00203/full>