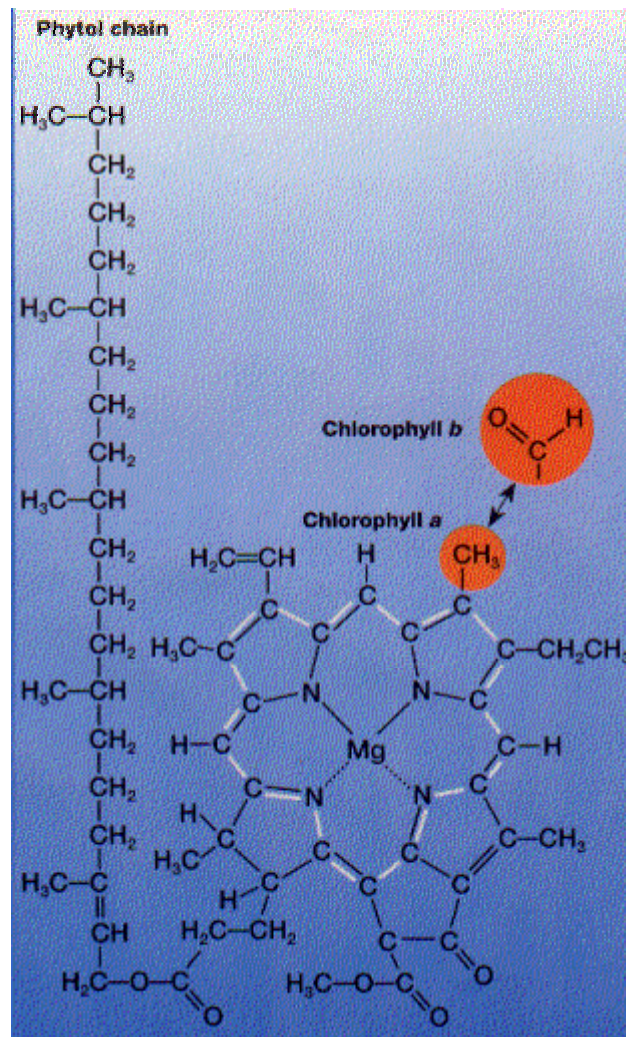
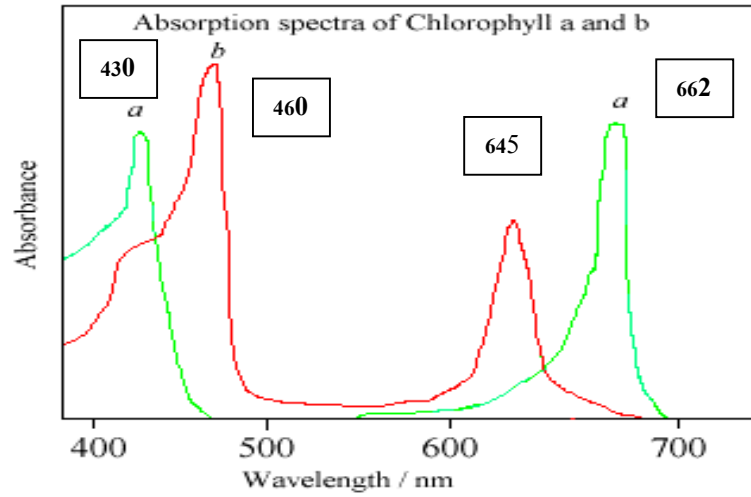
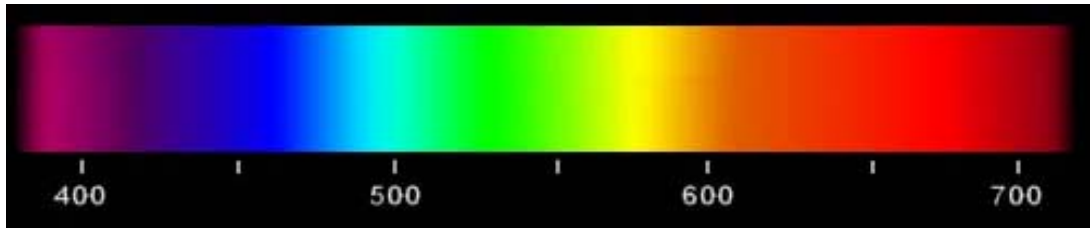
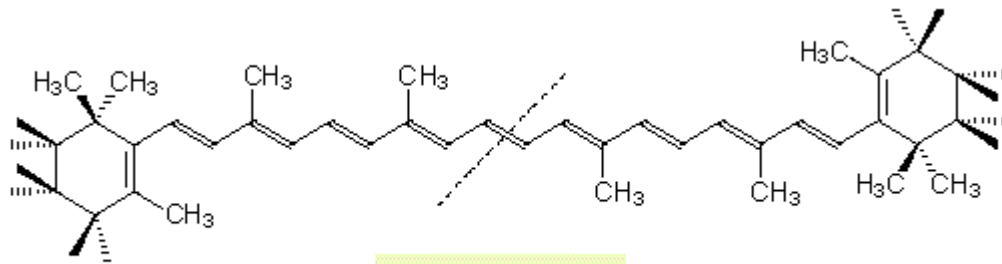


# 1<sup>a</sup> ESERCITAZIONE

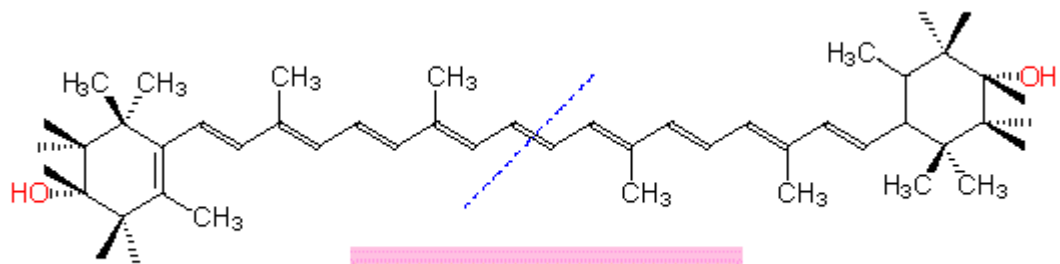


CLOROFILLA

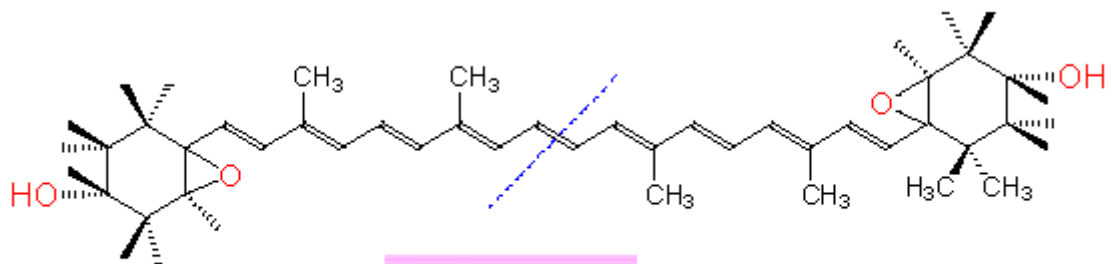
## CAROTENOIDI



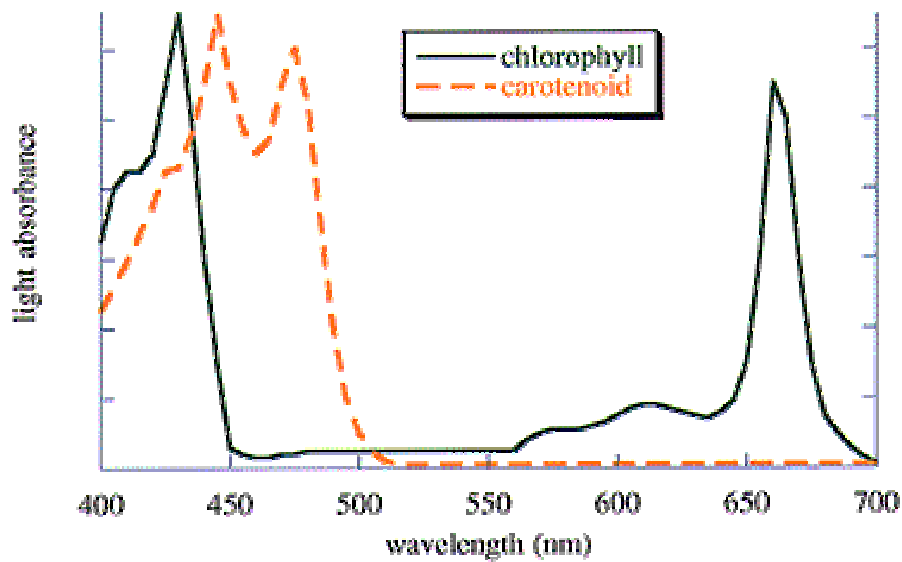
$\beta$  - carotene



lutein ( xanthophyll )



violaxanthin



## PARTE I - ESTRAZIONE E DOSAGGIO DELLE CLOROFILLE

### **Obiettivo: estrarre i pigmenti fogliari e quantificare per via spettrofotometrica la clorofilla a e la clorofilla b**

Da una foglia si ricavano circa 10 dischetti di diametro noto (corrispondenti a circa **0,5 g** di peso fresco) e si calcola la superficie totale e il loro peso fresco. Successivamente i dischetti vengono posti in un mortaio precedentemente pre-raffreddato e, dopo aver aggiunto azoto liquido o quarzo in cristalli, si riduce il materiale in una polvere finissima con il pestello. Si aggiunge poi la soluzione estraente costituita da acetone all'80%. L'estrazione dei pigmenti si considera completa quando il residuo nel mortaio è completamente bianco. L'estratto così ottenuto viene filtrato attraverso una membrana porosa con una pompa a vuoto per eliminare eventuali residui e portato ad un volume di 100 ml in un pallone. A questo punto si misura l'assorbimento del campione allo spettrofotometro a due diverse lunghezze d'onda: 645 e 663 nm, valori che corrispondono al picco massimo di assorbimento della clorofilla b e della clorofilla a, rispettivamente. Applicando poi le seguenti formule (Arnon et al., 1949, Plant Physiol., 24: 1-15), si calcola il contenuto delle due clorofille presenti nell'estratto:

$$Cl\ a = [(12,7) \times (\text{lettura a } 663)] - [(2,69) \times (\text{lettura a } 645)]$$

$$Cl\ b = [(22,9) \times (\text{lettura a } 645)] - [(4,68) \times (\text{lettura a } 663)]$$

Da queste formule si ricava il valore delle clorofille espresso come mg di clorofilla per litro di estratto; quindi se il volume dell'estratto ottenuto è diverso, occorrerà effettuare una correzione. Infine, si effettueranno i calcoli necessari ad esprimere il contenuto delle due clorofille rispetto al peso fresco (mg / g) o rispetto alla superficie (mg / cm<sup>2</sup>) da cui si è partiti.

In condizioni ottimali, l'estrazione dei pigmenti va eseguita in un ambiente illuminato da una luce verde (corrispondente ad una lunghezza d'onda non assorbita dalle clorofille che, perciò, non si ossidano) e sotto cappa per evitare di respirare troppo l'acetone. I campioni devono essere preparati

nel minor tempo possibile e, appena estratti, se la misurazione non può essere fatta subito, vanno mantenuti al buio e a 4°C per brevi periodi, o a -20°C per periodi più lunghi.

## **PARTE II - SEPARAZIONE DEI PIGMENTI MEDIANTE**

### **CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO SU STRATO SOTTILE**

#### **Obiettivo: Separazione ed identificazione dei principali pigmenti presenti nel cloroplasto**

La cromatografia è una tecnica di separazione di componenti di una miscela in base alla loro differente ripartizione tra due fasi immiscibili tra di loro. Le due fasi vengono indicate come fase stazionaria e fase mobile. La prima viene detta così in quanto è fissata ad un supporto inerte rappresentato in questo caso da una lastra di vetro; essa è costituita da una miscela preparata mescolando:

- 18 g di Kieselguhr G (Merck 8129)
- 4,5 g di Gel di silice (Merck 7729)
- 4,5 g di CaCO<sub>3</sub> (Merck 2066)
- 0,02 g di Ca(OH)<sub>2</sub> (Merck 2047)
- 50 ml di acido ascorbico 8 mM sciolto in H<sub>2</sub>O distillata.

La miscela (sufficiente per 6 lastre) viene stratificata sui supporti di vetro (200 x 200 mm) con uno spessore che può variare da 0,125 a 0,250 mm e fissata attraverso il riscaldamento in stufa a 50-60°C per 90 minuti.

La fase mobile è detta così in quanto è libera di muoversi attraverso quella stazionaria ed è costituita da una soluzione di ligroina-isopropanolo-acqua distillata (100-12-0,25); essa viene posta all'interno di un recipiente di vetro chiuso almeno un'ora prima della separazione per essere sicuri che l'atmosfera al suo interno diventi satura del vapore del solvente (*equilibramento*). Questa è un'operazione necessaria per avere una corsa cromatografica regolare ed efficiente.

APPLICAZIONE DEL CAMPIONE Il campione è costituito da un estratto concentrato ottenuto come descritto in precedenza e viene applicato mediante una pipetta pasteur o una siringa sulla lastra dove è stratificata la fase stazionaria a circa 2 cm dal bordo inferiore e ad 1,5 cm dal bordo sinistro e destro. Si lascia asciugare per qualche secondo e poi si posiziona la lastra verticalmente all'interno del recipiente contenente la fase mobile in modo che peschi nel solvente stesso. Il lato immerso sarà naturalmente quello in cui è stato applicato il campione. Si chiude di nuovo il recipiente e la separazione dei pigmenti avverrà man mano che la soluzione corre lungo la lastra; per ottenere la cromatografia completa occorrono in genere circa 30-40 minuti a temperatura ambiente. Anche in questo caso la separazione ottimale andrebbe effettuata la buio per evitare la fotoossidazione e quindi la degradazione dei pigmenti.

In questa esercitazione la cromatografia è definita "in fase normale", in quanto la fase stazionaria è polare e quella mobile è apolare. I pigmenti presenti nel nostro estratto si separeranno in base alle loro caratteristiche di polarità: quelli più polari si legheranno maggiormente alla fase polare stazionaria e quindi correranno meno lungo la lastra. Al contrario, i pigmenti più idrofobici si legheranno maggiormente alla fase mobile apolare e correranno di più fermandosi ad una distanza maggiore rispetto allo start.

Esiste anche la cromatografia detta "in fase inversa" in quanto la fase stazionaria è apolare e quella mobile è polare. Questa tecnica viene utilizzata per la separazione dei pigmenti su HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione o risoluzione), in cui la fase stazionaria apolare è impaccata all'interno di una colonna in acciaio e la fase polare mobile viene fatta passare attraverso quella stazionaria mediante pompe capaci di sviluppare alte pressioni. In questo caso, i pigmenti più polari si staccano più facilmente dalla fase stazionaria e, perciò, vengono eluiti per primi dalla colonna, mentre quelli apolari vengono trattenuti maggiormente ed eluiti per ultimi.

Al termine della nostra separazione osserveremo la seguente situazione:



- |   |                      |
|---|----------------------|
| 1 | $\beta$ -carotene    |
| 2 | clorofilla a         |
| 3 | clorofilla b         |
| 4 | luteina + zeaxantina |
| 5 | violaxantina         |
| 6 | neoxantina           |

L'identificazione di un composto può essere effettuata in base alla distanza percorsa riferita a quella del fronte, calcolando cioè il valore di  $R_F$ .

$$R_F = \frac{\text{Distanza start-banda}}{\text{Distanza start-frontera}}$$