

LABORATORIO DI BIOCHIMICA
DOCENTE: DOTT.SSA. LUCIA GUIDI

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentarie Agro-Ambientali
Via del Borghetto 80 – 56124 Pisa
Tel. 050-2216613, Email: lucia.guidi@unipi.it

INTRODUZIONE

- 1) INTRODUZIONE ALLA PRATICA SPERIMENTALE
- 2) NORME GENERALI DI SICUREZZA
- 3) CENNI DI SPETTROFOTOMETRIA
- 4) ACIDI E BASI
- 5) TAMPONI

ESTRAZIONE E SEPARAZIONI DI PIGMENTI

- 1) INTRODUZIONE
- 2) UTENSILI E REAGENTI CHIMICI
- 3) PROCEDURA DI ESTRAZIONE DEI PIGMENTI FOTOSINTETICI
- 4) PROCEDURA DELLA LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO
- 5) CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DI PIGMENTI FOTOSINTETICI

INTRODUZIONE

1) Introduzione alla pratica sperimentale

Lo scopo di questo modulo è quello di far comprendere allo studente i comportamenti chimico-fisici delle molecole biologiche e contemporaneamente le capacità operative di base che saranno a lui utili nell'affrontare una professione.

2) Norme generali di sicurezza

I laboratori di ricerca dovrebbero essere muniti del seguente equipaggiamento di sicurezza: telefono, postazione per il lavaggio oculare, doccia, estintore, cappa di aspirazione, kit di pronto soccorso, camice, guanti ed occhiali. Asssicurarsi della presenza di tutti questi oggetti rende piu' sicuro il lavoro.

La sicurezza in un laboratorio dipende esclusivamente dalla responsabilità di tutte le persone che sono coinvolte.

Prima di iniziare un lavoro è fondamentale avere le idee chiare di quello che si vuole fare (la maggior parte degli incidenti in laboratorio avvengono proprio per mancanza di organizzazione).

Operare in laboratorio richiede sicuramente **ordine e pulizia**. A tal fine vi sono delle regole da rispettare scrupolosamente che permetteranno allo studente di lavorare con efficienza.

- 1) Non mangiare, non bere ,non fumare in laboratorio.
- 2) tenere il posto di lavoro sempre pulito e sgombro da tutto ciò che non occorre durante l'esecuzione dell'esperienza.
- 3) al termine di ogni esperienza lavare la vetreria utilizzata e gettare i reattivi non più utilizzabili negli appositi contenitori (spesso questi sono tossici ed altamente inquinanti).
- 4) seguire le procedure indicate dall'esperienza senza apportare alcun cambiamento.

- 5) Prestare la massima attenzione nell'utilizzare i reagenti idonei. A tal fine leggere attentamente le etichette e non utilizzare reagenti senza etichetta.
- 6) Indossare guanti monouso quando si fa uso di sostanze chimiche dannose e ricordarsi che i guanti sono una fonte di contaminazione. Sostituire i guanti in modo appropriato per evitare di diffondere una contaminazione. Non toccarsi mai la faccia con i guanti.
- 7) Lavorare sotto una cappa aspirante quando si fa uso di un composto che ha un cattivo odore.
- 8) Gli acidi e le basi sono pericolose agli occhi e al tratto respiratorio. Porre attenzione in modo da eludere il contatto con queste soluzioni, soprattutto quando concentrate.
- 9) L'acetone è infiammabile e deve essere utilizzato lontano dalle fiamme. E' una sostanza volatile, rilascia vapori e deve quindi essere posto in contenitori chiusi. Evitare il contatto e l'inalazione.
- 10) Non introdurre pipette, spatole o puntali direttamente nelle bottiglie dei reagenti, ma versarne prima una certa quantità in un becher o su un foglio di carta pulita.
- 11) Ricordarsi sempre di spegnere gli strumenti ad esperienza terminata e di informare chi di dovere del mal funzionamento di uno strumento.
- 12) Informare subito chi di dovere se si verifica un incidente o un episodio ritenuto pericoloso

.....e ricordate sempre:

- ◆ La sicurezza deve essere parte della vostra cultura di laboratorio
- ◆ Esperimenti sicuri ben pianificati porteranno ad una ricerca piu' produttiva

ESTRAZIONE E SEPARAZIONI DI PIGMENTI

1) INTRODUZIONE

Gli organismi fotosintetici (piante, alghe ed alcuni batteri) contengono una serie di pigmenti capaci di catturare l'energia luminosa dal sole. Questi composti colorati sono diversi soprattutto nelle alghe dove vengono utilizzati anche per la loro classificazione.

Il principale fotorecettore nelle piante (responsabile del processo fotosintetico) è la **clorofilla**. Questa sostanza è un tetrapirrolo ciclico simile al gruppo eme dei citocromi ed è un derivato biosintetico della *protoporfirina IX*. La clorofilla differisce dal gruppo eme per diversi aspetti:

- il suo atomo centrale di metallo è il magnesio (Mg^{2+}) invece del Fe(II) oppure del Fe(III);
- l'anello pirrolico IV è parzialmente ridotto nella clorofilla *a* (Chl *a*) e nella clorofilla *b* (Chl *b*)
- la catena laterale propionilica dell'anello IV è esterificata ad un alcol tetraisoprenoide. Nelle Chl *a* e *b* l'alcol può essere il **fitolo** oppure il **geranilgeraniolo** (a seconda della specie batterica).
- La Chl *b* ha un gruppo formilico (-COH) al posto del sostituito metilico sull'anello II della Chl *a*.

Dato che la fotosintesi è un processo guidato dalla luce, è necessario rivedere come interagiscono luce e materia. La radiazione elettromagnetica si propaga sotto forma di **quanti (fotoni)**, nel visibile, la cui energia E è data dalla *legge di Plank*:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

dove h = costante di Plank = $6,626 \times 10^{-34}$ Js

c = velocità della luce = $2,998 \times 10^8$ m s⁻¹

ν = frequenza della radiazione

λ = la lunghezza d'onda della radiazione (400-700 nm)

Le molecole, come gli atomi, possiedono numerosi stati quantici con livelli energetici diversi. Poiché le molecole hanno più di un nucleo, ognuno dei loro stati elettronici ha una serie di sottostati vibrazionali e rotazionali con livelli energetici simili. L'assorbimento della luce da parte di una molecola avviene, solitamente, mediante un passaggio di un elettrone dal suo orbitale molecolare nello stato basale (con energia più bassa) a uno con energia maggiore. **Una data molecola può assorbire solo fotoni da una certa lunghezza d'onda in quanto, come è richiesto dalla legge di conservazione dell'energia, la differenza energetica tra i due stati deve corrispondere esattamente all'energia del fotone assorbito.**

La quantità di luce assorbita da una sostanza ad una data lunghezza d'onda è descritta dalla legge di **Lambert-Beer**:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c l}$$

dove: I_0 ed I sono rispettivamente l'intensità della luce incidente e della luce trasmessa

c = concentrazione molare del campione

l = lunghezza, in cm, del campione che la luce deve attraversare

ϵ = coefficiente di estinzione molare della molecola in esame

Da ciò ne deriva che se poniamo in grafico il valore di ϵ in funzione della lunghezza d'onda della luce, otteniamo lo **spettro d'assorbimento**, della molecola, che è indicativo della sua struttura elettronica.

Le varie forme di clorofilla sono molecole altamente coniugate ed è proprio questo tipo di molecole che assorbe più fortemente la luce visibile. I coefficienti di estinzione molare delle varie clorofille (valori superiori a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sono tra i più elevati nelle molecole organiche conosciute.

Le pur piccole differenze chimiche che si riscontrano tra le varie clorofilla modificano considerevolmente i loro spettri di assorbimento della luce.

Nelle piante, ed in particolare nelle antenne dei fotosistemi, vi sono altre sostanze che assorbono la luce e che sono diverse dalla clorofilla. Questi **pigmenti accessori** servono a completare lo spettro di assorbimento dei complessi antenna nelle regioni in cui le molecole di clorofilla non sono efficaci. Tra questi si hanno i **carotenoidi**, polieni lineari come il **β -carotene**.

Nel caso della clorofilla, l'analisi dello spettro mostra le lunghezze d'onda della luce solare assorbita, che è la combinazione dell'assorbimento della clorofilla *a* e della clorofilla *b*. Il massimo di assorbanza della clorofilla *a* è a 420 e 660 nm ed il massimo di assorbanza della clorofilla *b* è a 435 e 643 nm. Nelle foglie, la clorofilla è legata alle membrane tilacoidali all'interno dei cloroplasti e, la luce solare assorbita viene convertita in energia chimica. Quando la clorofilla è estratta dalle foglie, l'energia luminosa non può essere trasferita nei cloroplasti. Infatti, la luce viene rimessa e/o assorbita come calore. L'emissione della luce viene definita *fluorescenza* ed avviene ad una lunghezza d'onda di 675 e 685 nm (nella regione rossa della luce visibile).

2) UTENSILI E REAGENTI CHIMICI:

- Mortaio e pestello
- Centrifuga
- Tubi da centrifuga
- Bilancia da laboratorio
- Pipette Pasteur
- Provette graduate
- Cuvette monouso da 1 ml per la lettura nel visibile
- Spatola
- Foratappi per prelievo dischetti fogliari (diametro 10 mm)
- Acetone (80%)
- Acqua distillata
- Ghiaccio
- Quarzo

In questa esercitazione gli studenti procederanno all'estrazione dei pigmenti fotosintetici in diverse piante ed anche in piante allevate in particolari condizioni.

3) PROCEDURA DI ESTRAZIONE DI PIGMENTI FOTOSINTETICI:

1. Utilizzare la foglia fresca, una porzione di area nota (3 dischetti da 10 mm).
2. Porre il materiale vegetale nel mortaio e pestare in acetone -1.5 mL- (la quantità di acetone utilizzata deve essere in rapporto 1:30 -p/v- con la quantità di materiale vegetale utilizzato), al fine di solubilizzare le clorofille. Per facilitare l'operazione di omogenizzazione è opportuno aggiungere anche una spatolina di quarzo. Porre attenzione al fatto che l'acetone è un solvente volatile per cui è opportuno lavorare a bassa temperatura (nel ghiaccio) ed in fretta.

3. Omogenizzare vigorosamente per qualche minuto e comunque il tempo sufficiente affinché il materiale vegetale risulti finemente tritato ed il solvente assuma la colorazione verde.
4. Recuperare l'omogenato in un tubo da centrifuga.
5. Bilanciare il tubo con uno equivalente ma riempito di acqua.
6. Centrifugare per 10 min a 13.000 rpm.
7. Recuperare la frazione liquida (**surnatante verde**) contenente acetone e clorofilla trasferendola in provette graduate, mentre il residuo solido (**pellets**) viene eliminato.

4) PROCEDURA DELLA LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO:

L'estratto ottenuto conterrà i diversi pigmenti che assorbono la luce a lunghezze d'onda diverse per cui si sfrutta questa loro capacità per poter utilizzare la spettrofotometria. Il surnatante ottenuto (contenente le clorofille ed i carotenoidi) assorbe a 663.2 nm (clorofilla a), 648.8 nm (clorofilla b) e 470 nm (carotenoidi, xantofille e β -carotene).

- 1) Accendere lo spettrofotometro e settarlo alla lunghezza d'onda desiderata.
- 2) Porre nella cuvetta 1 ml di acetone e leggere l'assorbanza allo spettrofotometro.
- 3) Azzerare lo spettrofotometro.
- 4) Porre nella cuvetta il surnatante (50-200 μ l) ed aggiungere acetone fino ad un volume finale di 1 ml e quindi leggere l'assorbanza.

5) CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DEI PIGMENTI FOTOSINTETICI:

I valori di assorbanza ottenuti vengono utilizzati nelle seguenti formule di conversione:

$$\begin{aligned} \text{Chl a} &= (12.25 \times A_{663.2}) - (2.79 \times A_{648.8}) \\ \text{Chl b} &= (21.50 \times A_{646.3}) - (5.10 \times A_{663.2}) \\ \text{Carotenoidi} &= [(1000 \times A_{470}) - (1.82 \times \text{Chl a}) - (85.02 \times \text{Chl b})] / 198 \end{aligned}$$

I valori così ottenuti sono espressi come μ g di pigmento per ml di estratto.

Poiché noi abbiamo operato una diluizione dobbiamo moltiplicare il valore ottenuto per il fattore di diluizione:

$$\text{Valore ottenuto} : X \text{ ml dell'estratto} = \text{Valore in ml} : 1 \text{ ml}$$

A questo punto possiamo riferire il valore ottenuto al peso fresco e/o all'area del campione vegetale:

$$\text{Valore ottenuto} : \text{peso fresco (g) e/o area (cm}^2\text{)} = x : 1 \text{ g (1 cm}^2\text{)}$$

I valori finali sono quindi espressi in mg Clorofilla/ g (cm) peso fresco (area)

Possiamo dedurre una formula generale:

$$\text{Assorbanza} \times \text{fattore diluizione} \times (\text{Volume}_{\text{finale}}) / \text{Peso (area)}_{\text{iniziale}}$$

DETERMINAZIONE DELLE CLOROFILLE

RACCOLTA DATI

Nome _____

Specie vegetale
Colore della foglia
Area fogliare
cm²
Assorbanza
663.2 nm
Assorbanza
646.3 nm
Chl <i>a</i>
($\mu\text{moli mL}^{-1}$)
Chl <i>b</i>
($\mu\text{moli mL}^{-1}$)
Chl tot
($\mu\text{moli mL}^{-1}$)
Chl <i>a/b</i>