

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**  
**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA**

**Corso di Fisiologia Vegetale e Laboratorio**

**10 CFU**

**II Semestre – III anno**

**LABORATORIO DI FISIOLOGIA VEGETALE**

**Dipartimento di Biologia**  
**Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo**  
**Edificio 7**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sergio Spada', is positioned below the departmental information.

**ANNO ACCADEMICO 2020-2021**

## NOTIZIE PRELIMINARI E PROPEDEUTICHE

### Da leggere prima dell'esercitazione

1. L'esercitazione si svolge in gruppi di 3-6 persone
2. La durata dell'esperienza è di circa 1h 40'
3. Gli studenti devono indossare un proprio camice da laboratorio.
4. **L'esercitazione va seguita una sola volta nella carriera universitaria.** Non riprenotarsi o ripresentarsi se la si è già sostenuta in anni accademici precedenti. Nel dubbio inviare una mail al docente per un eventuale controllo.
5. Se ci sono impedimenti a seguire l'esercitazione nella data e nell'orario assegnati si prega di operare cambi con propri colleghi da comunicare al momento dell'inizio del laboratorio.
6. Gli studenti del vecchio ordinamento (22/; 432/; 571/) e quelli iscritti a Scienze Naturali **non** devono fare il laboratorio.

### Da tenere presente durante l'esercitazione

1. Ricordarsi di firmare il foglio di presenza.
2. L'esperienza di laboratorio riprende una normale procedura scientifica di laboratorio, non è quindi un gioco o un passatempo interessante.
3. Verranno utilizzati strumentazioni e reagenti comunemente utilizzati nei laboratori di ricerca. Molti di questi sono costosi, fragili, tossici o pericolosi.
4. É quindi necessario rimanere concentrati su quello che si sta facendo, e osservare scrupolosamente le norme di sicurezza e i consigli e suggerimenti forniti dai docenti.

### Da ricordare dopo l'esercitazione

1. Al termine dell'esperienza ogni gruppo dovrà stilare una relazione di 2-3 pagine su quanto fatto e osservato.
2. Sulla prima pagina dovranno essere indicati in ordine alfabetico: Cognome Nome e Matricola (in questo ordine!) degli studenti che stilano la relazione, e data e orario di svolgimento dell'esperienza.  
**Un fac-simile della prima pagina della relazione è fornito al termine di questa dispensa.**
3. Le relazioni dovranno essere consegnate *esclusivamente in forma cartacea* al docente entro la fine del corso e in ogni caso **entro il 31 Maggio 2018 p.v.**, a lezione o in orario di ricevimento (consultare il sito docenti [www.docenti.unina.it](http://www.docenti.unina.it)).
4. **Non inviare la relazione come file per email - saranno immediatamente cestinati, senz'altra risposta!**

## **Prima dell'esame**

Lo studente per sostenere l'esame deve:

1. Essere stato iscritto al corso (sito docenti), per scaricare **gratuitamente** i pdf delle lezioni.
2. Il corso di Fisiologia Vegetale e Laboratorio è modificato e aggiornato per ogni anno accademico. **Non utilizzare file pdf di altri (o di precedenti corsi) o scaricati da internet; né tantomeno comprati da chiunque.**
3. Essere stato presente all'esercitazione; si ricorda che fa fede **SOLO** la firma di presenza. **Chi non è stato presente NON può sostenere l'esame, senza deroghe ed eccezioni.**
4. Avere presentato la relazione scritta ENTRO i termini indicati. Non saranno accettate le relazioni presentate dopo il 31 Maggio o prima di appelli di esame.
5. Prenotarsi sul sito *Segrepass*. In giustificati casi di impossibilità a prenotarsi mediante procedura informatizzata, inviare una mail con cognome nome matricola data e orario dell'appello al docente.
6. La verbalizzazione dell'esame avviene mediante procedura elettronica. Ricordarsi il proprio **PIN di 5 cifre** per la convalida dell'esame!

# Estrazione, separazione e caratterizzazione dei pigmenti fotosintetici

## Base teorica

Le piante contengono diversi tipi di pigmenti fotosintetici, le clorofille e i carotenoidi, la cui estrazione viene effettuata con solventi organici apolari.

La loro caratterizzazione può essere condotta mediante TLC (thin-layer chromatography – cromatografia su strato sottile). In questa cromatografia i costituenti del campione in analisi possono essere separati poiché sono trasportati da una fase mobile liquida attraverso una fase stazionaria solida (lastrina per TLC) e ciascun composto è ritardato in funzione dell'interazione che la sua molecola subisce con queste due fasi.

In particolare, il flusso del solvente porterà ogni sostanza dal punto di applicazione verso l'estremità opposta della lastrina o della colonna. Se il composto non avrà interazioni con la fase stazionaria migrerà con il fronte del solvente altrimenti, se trattenuto, subirà un rallentamento (A).

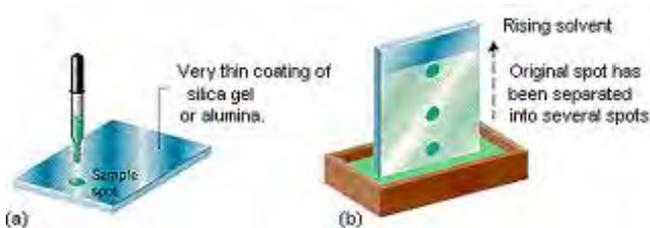
Il “ritardo di migrazione” di ogni composto, rispetto al fronte della fase mobile, è selettivo e dipende dal sistema fase fissa/fase mobile impiegato. I diversi pigmenti si separeranno in modo caratteristico per cui ciascuno avrà uno specifico  $R_f$  determinato dal seguente rapporto:

$$R_f = R_p / R_s$$

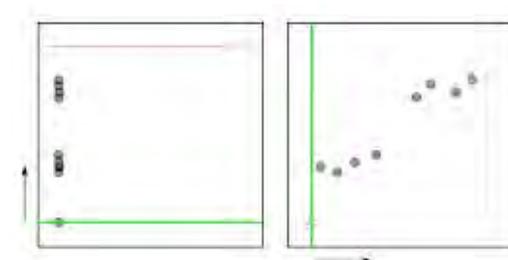
Dove :  $R_p$  = distanza tra punto di applicazione e banda del pigmento

$R_s$  = distanza tra punto di applicazione e fronte del solvente

La TLC è una tecnica rapida e semplice per l'identificazione e la purificazione di pigmenti. In questa esercitazione i pigmenti liposolubili, clorofille e caroteni, verranno separati a partire da estratti di pigmenti totali utilizzando come fase mobile una miscela di etere di petrolio:cloroformio in rapporto 3:1. La fase stazionaria sarà invece costituita da lastre TLC ricoperte di un sottile strato di gel di silice. Le lastre dopo una prima fase di migrazione saranno ruotate di 90° e i campioni verranno fatti correre in una diversa fase solvente (etere di petrolio:propanolo 99:1) (B) per migliorare ulteriormente la separazione dei pigmenti.



A



## Protocollo sperimentale

Prelevare 1-2 gr di tessuto fogliare (foglie di spinacio), avendo cura di eliminare le principali nervature. Tagliarlo in pezzi piccoli e metterlo in un mortaio. Aggiungere un cucchiaino di sabbia di quarzo lavata. Aggiungere 2 ml di N-N'-dimetilformamide e macinare fino ad ottenere una poltiglia verde.

Filtrare l'estratto con 4 strati di garza e metterlo in una provetta.

Preparare la lastrina da TLC segnando un punto a 1,5 cm dal limite inferiore e dal lato destro.

Versare 1 cm del solvente di separazione 1 (**etere di petrolio: cloroformio in rapporto 3:1**) nel vasetto per cromatografia e lasciarlo equilibrare per qualche minuto dopo aver coperto il recipiente.

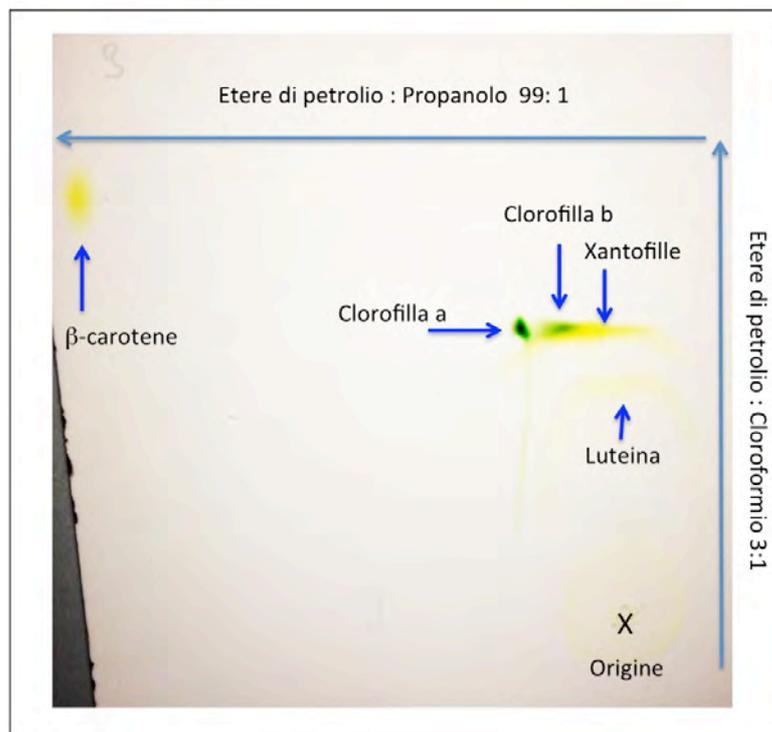
Utilizzando un capillare deporre il campione in varie applicazioni successive nel punto segnato.

Immergere la lastrina nel recipiente da cromatografia e attendere fino a che il fronte del solvente non arriva a circa 2 cm dal bordo superiore. Estrarre la lastrina e appoggiarla sul banco.

Sostituire il solvente nella vaschetta: allontanare la miscela solvente 1 e versare 1 cm del solvente di separazione 2 (**etere di petrolio:propanolo 99:1**).

Ruotare la lastrina di 90° in senso orario. Immergere la lastrina nel recipiente da cromatografia e attendere fino a che il fronte del solvente non arrivi a circa 2 cm dal bordo superiore. Estrarre la lastrina e appoggiarla sul banco.

Osservare le varie macchie colorate (spots) e identificare i vari pigmenti in base alla chiave di lettura fornita:



Con una lametta grattare i diversi spots, raccogliendo la polvere colorata su un foglio di alluminio. Versare la polvere in una provetta Eppendorf. Versare 1 ml di N-N' dimetilformamide, agitare leggermente, centrifugare, prelevare 1 soluzione di pigmento limpida, ed osservare allo spettrofotometro gli spettri di assorbimento ottenuti per scansione da 400 a 730 nm. Il bianco è il solvente acetone 80%.

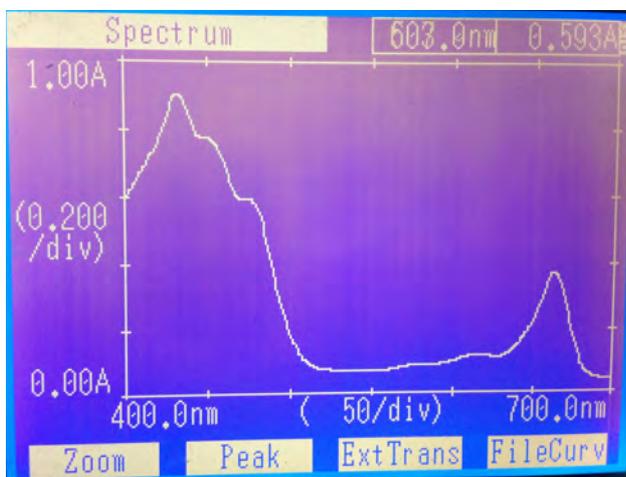
I picchi caratteristici dei vari pigmenti sono:

Pigmento	Picco nel Blu	Picco nel Rosso
clorofilla a	428nm	664 nm
clorofilla b	452nm	642 nm
$\beta$ -carotene	450nm	no
luteina	445 nm	no
violaxantina	460	no
neoxantina	422	no

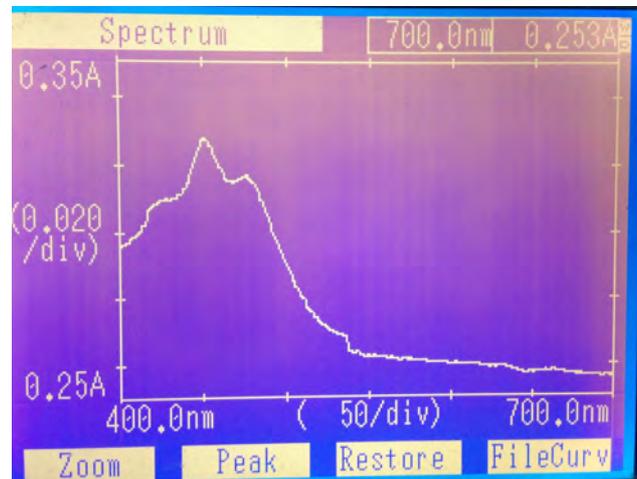
Estratto Foglie Clorofille Carotenoidi



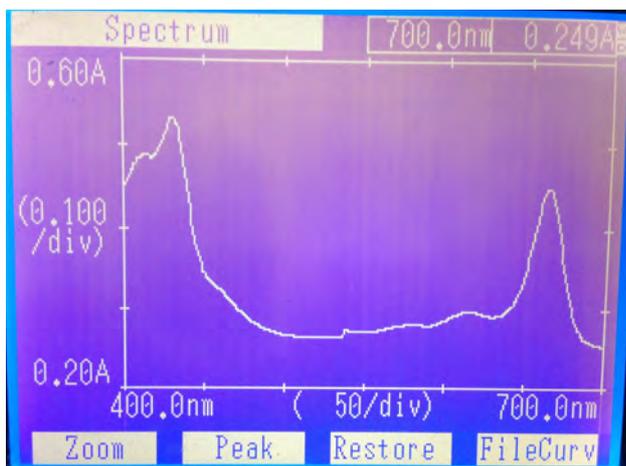
Estratto Foglie



Carotenoidi



Clorofille



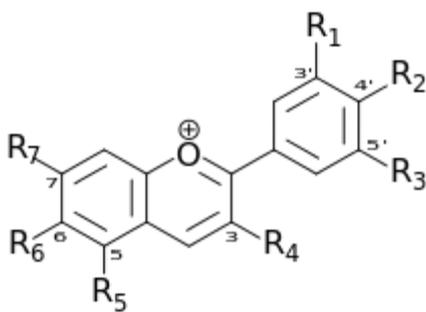
## Pigmenti non fotosintetici ed accessori con funzione vessillifera: estrazione e caratterizzazione di carotenoidi e antociani

### Base teorica

Oltre ai pigmenti fotosintetici la cellula vegetale possiede anche altri tipi di pigmenti, presenti soprattutto nei vacuoli. Ad esempio gli antociani sono pigmenti colorati che impartiscono un colore rosso e blu alle corolle dei fiori. In alcuni casi la corolla del fiore presenta più di un colore (garofano, bocche di leone, viole del pensiero, dalie) e ciò è dovuto alla contemporanea presenza nella stessa corolla di antociani di colore diverso. Antociani sono presenti anche in altre parti della pianta, frutti, fusto, foglie e anche radici. I colori rosso ed aranciato delle foglie in autunno prima della loro caduta sono in gran parte dovuti agli antociani, il cui colore dipende dal pH del succo vacuolare.

In ambiente acido gli antociani assumono il colore rosso, mentre il colore azzurro si ha in ambiente basico (es. fiori delle ortensie). È sufficiente trattare con una base una fogliolina rossa di radicchio o un petalo di geranio, o l'epidermide che si ottiene per spellatura, perché scompaia il colore rosso e appaia il colore azzurro. Lavando con acqua e aggiungendo poche gocce di un acido ricompare il colore rosso che, magari, può risultare anche più intenso di quello originario se il pH raggiunto in seguito all'aggiunta dell'acido è più basso di quello di partenza. A questo fenomeno si dà il nome di viraggio degli antociani, analogamente al viraggio di altri composti usati come indicatori chimici (tornasole ecc.).

Non tutti i colori presenti nella pianta sono però di natura fenolica. Anche i carotenoidi svolgono spesso una azione vessillifera. I cromoplasti sono plastidi colorati per la presenza di pigmenti, tra cui i più abbondanti sono proprio i carotenoidi. Questi plastidi sono tipicamente presenti nei fiori e nei frutti, ai quali impartiscono colorazioni che vanno dal giallo, all'arancio, al rosso.

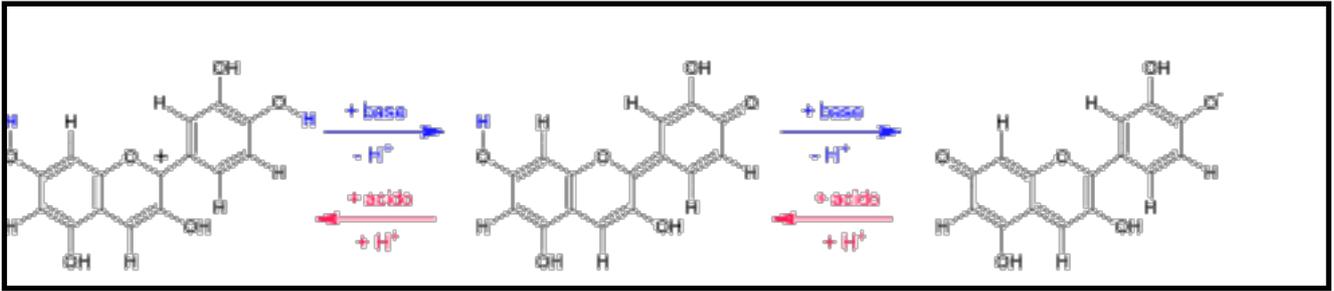


Struttura generale degli antociani

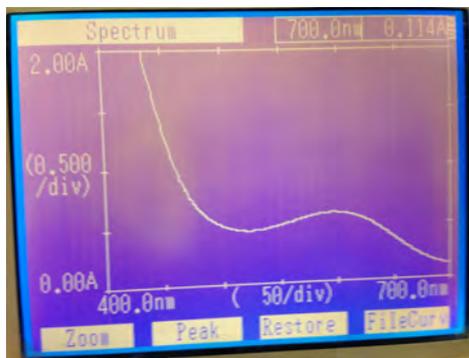
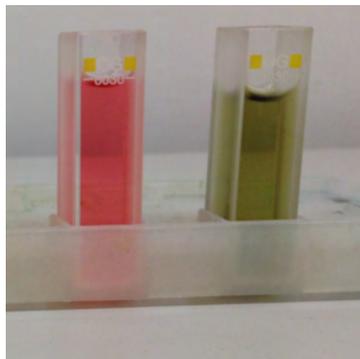
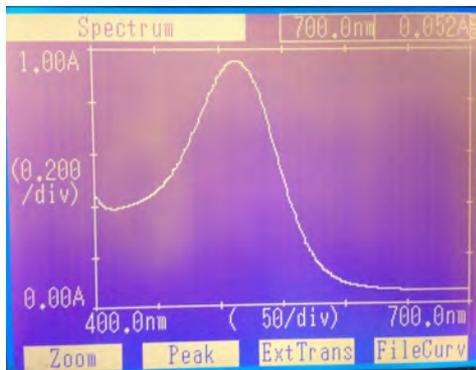
## Protocollo sperimentale

- Foglie di radicchio e pericarpo di agrumi vengono estratti separatamente in un mortaio e pestello in una miscela etanolo:cloroformio 2:1. Se possibile utilizzare azoto liquido per migliorare la qualità dell'estrazione. L'omogenato viene filtrato e centrifugato.
- 2 ml di estratto vengono trasferiti in provette da 5 o 10 ml, e vengono aggiunti 2 ml di acqua distillata. Dopo aver chiuso le provette, mescolare la miscela invertendo il tubo per 3-4 volte. Mettere la provetta nel porta provette e aspettare la separazione delle fasi. Osservare la ripartizione dei pigmenti tra fase organica e fase idrofila.
- L'aggiunta di acqua distillata all'estratto di pericarpo di mandarino fa sì che i pigmenti lipofili (caroteni) si ripartiscano nella fase organica (inferiore).
- L'aggiunta di acqua distillata all'estratto di radicchio porta invece alla ripartizione dei pigmenti idrofili nella fase acquosa superiore, mentre nella fase lipofila inferiore si ripartiscono le clorofille.
- Prelevare due aliquote da 0.5 ml dalla fase idrofila e versarle in due provette distinte. Aggiungere alcune gocce di HCl 1N nella prima e alcune gocce di NaOH 1N nella seconda. Osservare il viraggio del colore. L'aggiunta di una base o di un acido all'estratto del radicchio, porta al viraggio degli antociani. Questo fenomeno è legato alla presenza di gruppi -OH sulla molecola. Un maggior numero di gruppi ossidrilici sposta l'assorbimento verso lunghezze d'onda più elevate e dona una colorazione tendente sempre più al blu e poi al giallo-verde.

**Viraggio della colorazione degli antociani in funzione del pH.**



Il colore varia da rosso nelle soluzioni acide (pH intorno a 3) a viola-blu in quelle da poco acide a poco basiche (valori di pH compresi fra 5 e 8) e infine a giallo nelle soluzioni nettamente basiche (valori di pH maggiori di 8), con una possibile transizione attraverso il verde (giallo+blu).



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA**

**Corso di Fisiologia Vegetale e Laboratorio  
10CFU**

**RELAZIONE DELL'ESPERIENZA DI  
LABORATORIO DI FISIOLOGIA VEGETALE**

**Prof. Sergio Esposito**

<b>Cognome</b>	<b>Nome</b>	<b>Matr.</b>	<b>Indirizzo (BMC/BN)</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Data</b>

