

PAOLO PUPILLO (*)

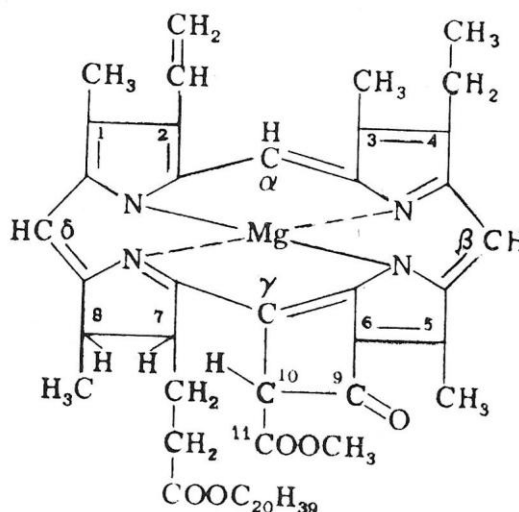
I PIGMENTI VEGETALI LIPOSOLUBILI

Le esperienze e le dimostrazioni pratiche nelle scuole secondarie dovrebbero essere intese ad avvincere l'attenzione degli studenti, essendo comprensibili e scientificamente significative. L'estrazione dei pigmenti delle piante risponde a questi requisiti: è interessante, è facile e può servire ad introdurre molti concetti nuovi.

Pigmenti si chiamano quei composti organici caratterizzati dalla capacità di assorbire determinate radiazioni luminose nelle lunghezze d'onda del « visibile ». Nei vegetali quelli quantitativamente più importanti sono le clorofille ed i carotenoidi fra i pigmenti liposolubili; gli antociani e i flavoni fra gli idrosolubili.

Le clorofille

Un cenno sulle caratteristiche chimiche e biologiche delle clorofille. Esse costituiscono una famiglia omogenea di composti con un nucleo porfirinico alquanto modificato e legato ad un ione Mg^{++} , esterificano nel carbossile in posizione 7 e con un alcool superiore della serie terpenica che di solito è il fitolo (fig. 1). Le proprietà di risonanza dell'anello tetrapirrolico determinano in larga misura il tipo di assorbimento spettrale (fig. 2), e quindi il colore, delle clorofille, che però

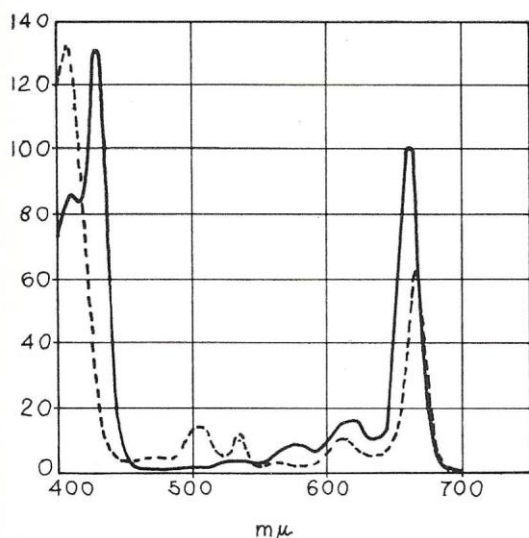


1) Struttura della clorofilla a.

dipende anche dall'ambiente in cui si trovano le molecole (p.e., dalla natura del solvente); non bisogna quindi pensare che dopo l'estrazione gli spettri delle clorofille restino identici a quelli riscontrabili « in vivo ». Inoltre, mentre negli estratti si trova una sola clorofilla a, nelle cellule viventi si osservano un certo numero di forme diverse.

La clorofilla a è presente in tutte le piante eucariotiche fotosinteticamente competenti e nelle alghe azzurre, mancando solo nei batteri fotosintetici che invece possiedono specifiche bacterioclorofille; è

(*) Prof. PAOLO PUPILLO, dell'Orto botanico dell'Università di Bologna.



2) Spettro d'assorbimento della clorofilla a (—) e della feofitina a (---) in etere di petrolio.

la clorofilla fondamentale per la fotosintesi ed è normalmente accompagnata nelle piante verdi (Cloroficee, Briofite e piante vascolari) dalla clorofilla *b*, mentre nelle altre divisioni del regno vegetale può presentarsi unitamente a determinate clorofille « accessorie » (tabella 1). Nelle Cianoficee, Rodoficee e Criptoficee i principali pigmenti accessori sono invece delle ficobiliproteine.

Per l'estrazione delle clorofille da ma-

TABELLA 1. - Distribuzione dei pigmenti fotosintetici in alcuni gruppi di vegetali

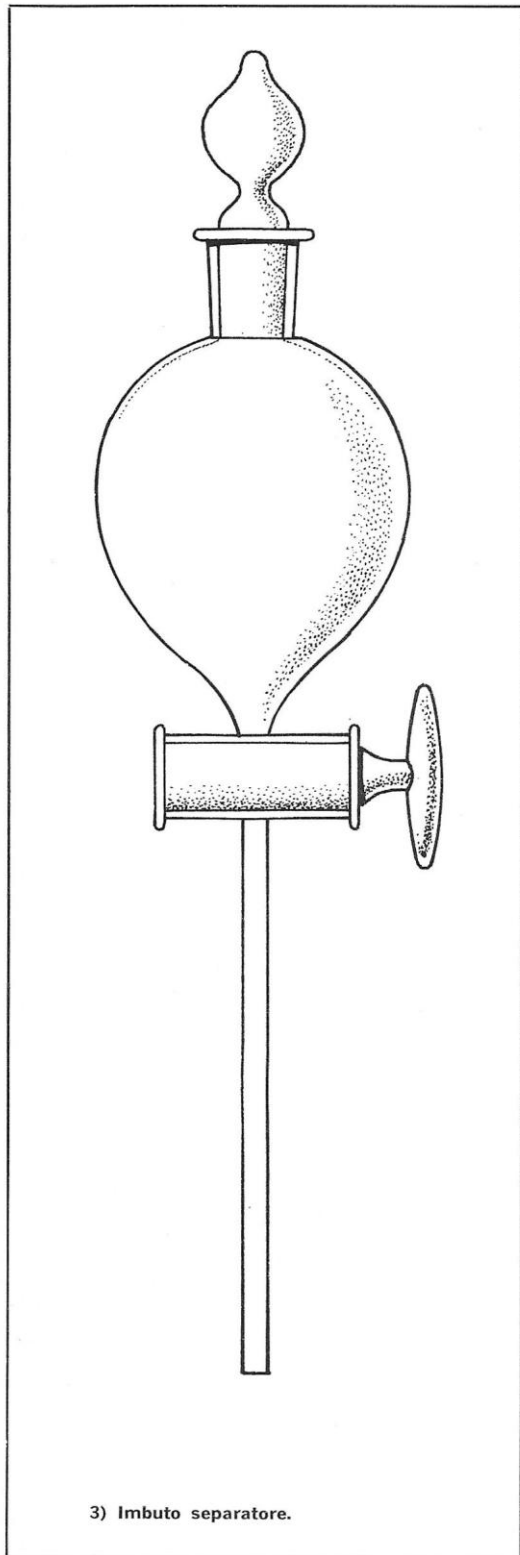
Taxon	Clorofille	Xantofille
<i>Eufite</i> (piante verdi)	a, b	luteina neoxantina violaxantina zeaxantina (tracce)
<i>Dinoficee</i> (Peridinee)	a, d	peridinina dinoxantina diadinoxantina
<i>Bacillarioficee</i> (Diatomee)	a, c	diadinoxantina diatoxantina (tracce) fucoxantina neufucoxantina
<i>Feoficee</i> (alghe brune)	a, c	neufucoxantina fucoxantina violaxantina
<i>Rodoficee</i> (alghe rosse)	a, c (tracce)	luteina zeaxantina

teriale vegetale fresco i solventi più adatti sono quelli miscibili con l'acqua, quali la piridine, gli alcoli alifatici inferiori, l'acetone, o miscele di questi con etere di petrolio; è spesso consigliata la miscela metanolo-etere 3:1. Si può anche partire da tessuti secchi, per esempio da polvere d'ortica. I vari metodi d'estrazione si basano sulla stessa sequenza: *a*) estrazione dei pigmenti (e di acqua) in un solvente polare; *b*) aggiunta di un solvente non polare e passaggio dei pigmenti in quest'ultimo; *c*) eliminazione del solvente iniziale mediante aggiunta di un eccesso d'acqua, che lo estrae totalmente.

Come esempio verrà qui descritta l'estrazione in acetone. Si prendono 2 g di foglie e si pestano in mortaio con un po' di acetone puro. Si aggiunge poi acetone all'85 % fino a 7-8 volumi, quindi la sospensione viene lasciata sedimentare finché il colore sia passato interamente nel solvente; dopo filtraggio su carta porosa, l'estratto è pronto. Il processo può essere reso più rapido ed efficiente se la carta da filtro contenente la sospensione viene inserita in un filtro Buchner, e questo viene collegato con una pompa aspirante azionata lentamente. Ovvero, per rendere limpida la sospensione la si può semplicemente centrifugare per pochi minuti.

Comunque ottenuta, la soluzione dei pigmenti viene versata in un imbuto separatore (fig. 3) o in altro recipiente adatto, provvisto inferiormente di scarico chiudibile. Si aggiungono 40 cc. di etere di petrolio e poi si versano nell'imbuto circa 50 cc. di acqua distillata che serve ad estrarre l'acetone dall'etere; l'acqua viene versata lungo le pareti dell'imbuto per evitare che si produca un'emulsione, e in pochi minuti, al freddo, lo strato d'etere si separa al di sopra dello strato acquoso contenente l'acetone. L'acqua viene lasciata lentamente defluire dall'imbuto aprendo il rubinetto, e poi si ripete l'operazione di lavaggio con acqua distillata (o, se opportuno, con soluzione di NaCl, più pesante); alla fine la soluzione eterea contiene tutti i pigmenti liposolubili della foglia.

La soluzione ottenuta nel modo descritto è verde se osservata in uno stra-

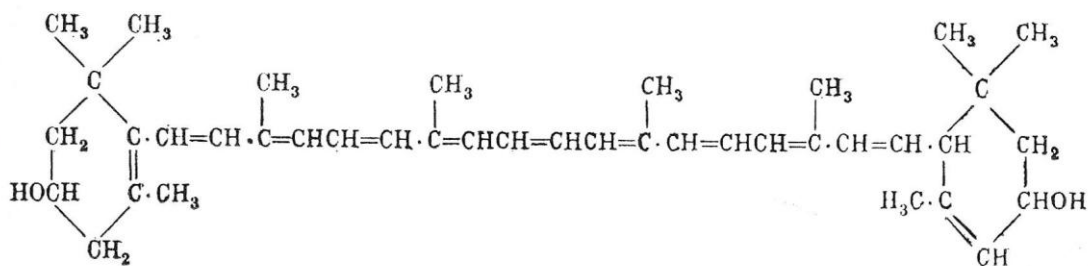


to sottile, ma se forma uno strato spesso è quasi nera; se viene esaminata in luce riflessa, specialmente se condensata da una lente, mostra invece una intensa fluorescenza rosso-sangue, corrispondente alla luce assorbita e riemessa dalla clorofilla.

Lo spettro di assorbimento dell'estratto, qualora non si disponga di un semplice spettroscopio, si può dimostrare ponendo davanti alla lente di un proiettore (anche di diapositive) un cartone con una sottile fessura, e fissando un prisma in corrispondenza del raggio uscente dalla fessura. Il prisma viene orientato in modo tale che il raggio cada su di uno schermo bianco, e lo spettro può essere messo a fuoco con l'aiuto di una lente convessa. Se ora si pone di fronte alla fessura un recipiente di vetro a pareti piatte contenente la soluzione concentrata, si osserverà che viene trasmessa soltanto luce rosso-scura (680 nm e oltre). Sostituendo con una soluzione diluita, risalterà una banda di assorbimento nel rosso (attorno ai 660 nm) e una nell'arancio (circa 620 nm); le due zone saranno però spesso sovrapposte. A 660 nm è situata infatti la più nota banda di assorbimento della clorofilla *a*, ma ve ne sono anche altre rilevabili con uno spettroscopio, la più intensa delle quali è la banda di Soret nel violetto (fig. 2).

I carotenoidi

Non bisogna tuttavia pensare che solo le lunghezze d'onda corrispondenti ai picchi d'assorbimento della clorofilla siano efficaci ai fini della fotosintesi, poiché i principali pigmenti cloroplastici detti «accessori» assorbono energia luminosa e sono in grado di trasferire l'eccitazione alla clorofilla *a*; si ritiene che nelle piante verdi questa funzione sia svolta prevalentemente dai carotenoidi (fig. 4). La presenza di doppi legami nei carotenoidi, che sono composti appartenenti alla grande famiglia chimica dei terpenoidi, rende possibile l'esistenza di sistemi coniugati e quindi di numerosi isomeri cis-trans, ed è inoltre causa dei caratteristici picchi di assorbimento nel violetto (attorno ai 450 nm), che determinano le note colorazioni gialle o rosso-arancione (fig. 5).

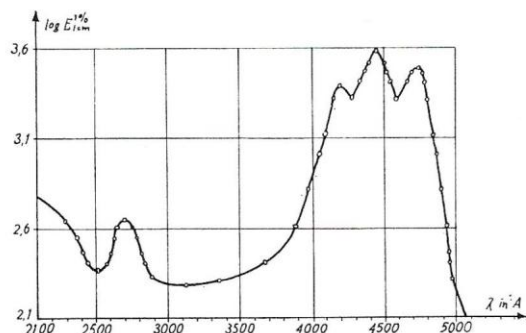


4) Struttura di un carotenoide, la luteina.

I carotenoidi sono presenti universalmente nei plastidi fotosintetici e nelle analoghe strutture dei batteri ai vivaci colori dei frutti (pomodoro, peperone), dei fiori (Ranunculacee, Composite, Leguminose), delle spore fungine (*Neurospora*). Vengono distinti artificialmente in caroteni e xantofille, queste più ossidate di quelli per la presenza di gruppi idrossilici, chetonici ecc. Fra i vegetali la presenza di specifici pigmenti fotosintetici è un carattere estremamente conservativo, e in quanto tale consente la classificazione delle specie di piante in grandi gruppi naturali, al di fuori di possibili convergenze morfologiche. Fra i carotenoidi, il β -carotene è normalmente presente e per lo più abbondante in tutte le specie eucariotiche, associato o meno al suo isomero α -carotene (che però in certe specie o famiglie prevale per quantità); le « xantofille » variano caratteristicamente da gruppo a gruppo (tab. 1).

Separazione dei pigmenti

I metodi più pratici di separazione dei pigmenti dalla soluzione di estrazione so-



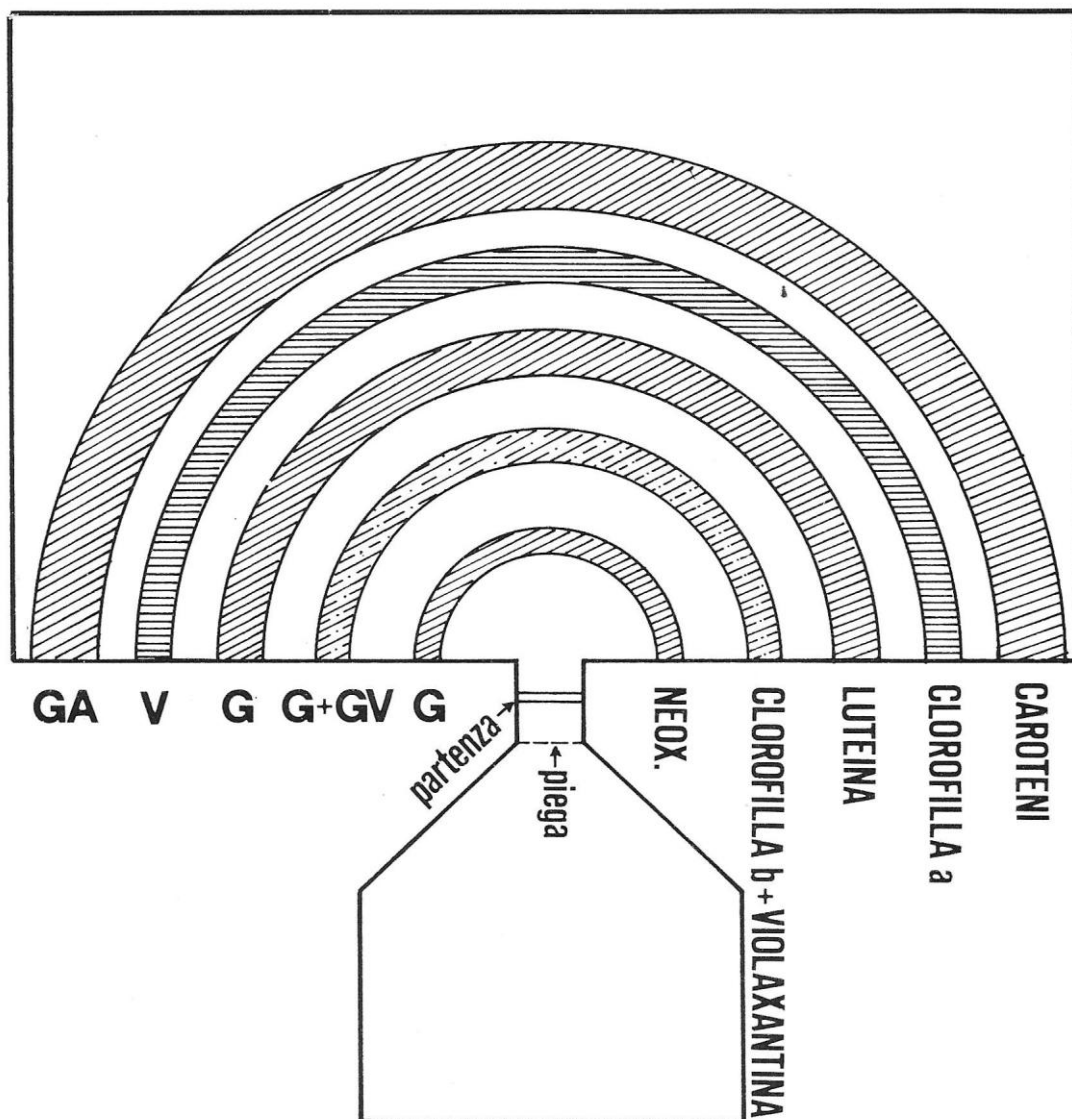
5) Spettro d'assorbimento della luteina in esano.

no quelli cromatografici; alcuni sono estremamente semplici, altri un po' meno, e così verranno qui descritti in ordine di complessità crescente — purché sia chiaro che anche la più semplice delle tecniche può essere resa rigorosa e quindi « difficile ».

1) *Cromatografia su carta*. - L'estratto in acetone preparato di fresco viene versato in un recipiente piatto, nel quale viene immerso il bordo inferiore di una carta da filtro posta verticalmente. Il procedimento va effettuato sotto una campana (o un bicchiere) di vetro a causa della volatilità del solvente. Nel giro di pochi minuti la soluzione sale nella carta e si distinguono due zone, una più alta, giallastra, contenente i caroteni, e una verde, il cui bordo superiore può essere verde-azzurro (clorofilla *a*).

Alternativamente, si può disporre orizzontalmente una carta da filtro, sulla quale poi si lasciano lentamente cadere poche gocce di estratto; infine si versa lentamente allo stesso modo dell'etere di petrolio e si ottengono dei cerchi concentrici diversamente colorati: il più esterno è di carotene (meno polare), seguono le xantofille e, al centro, le clorofille (fig. 6). Questi metodi cromatografici si avvalgono delle diverse polarità dei vari tipi di molecole in soluzione, le quali, per effetto di partizione e di adsorbimento differenziale, migrano a velocità differenti nella miscela di solventi, integrando più o meno con la fase solida.

2) *Partizione*. - Il tessuto fresco viene immerso per un minuto in acqua bollente e poi pressato per eliminarne l'acqua; i pigmenti sono estratti con alcool al 95 %.



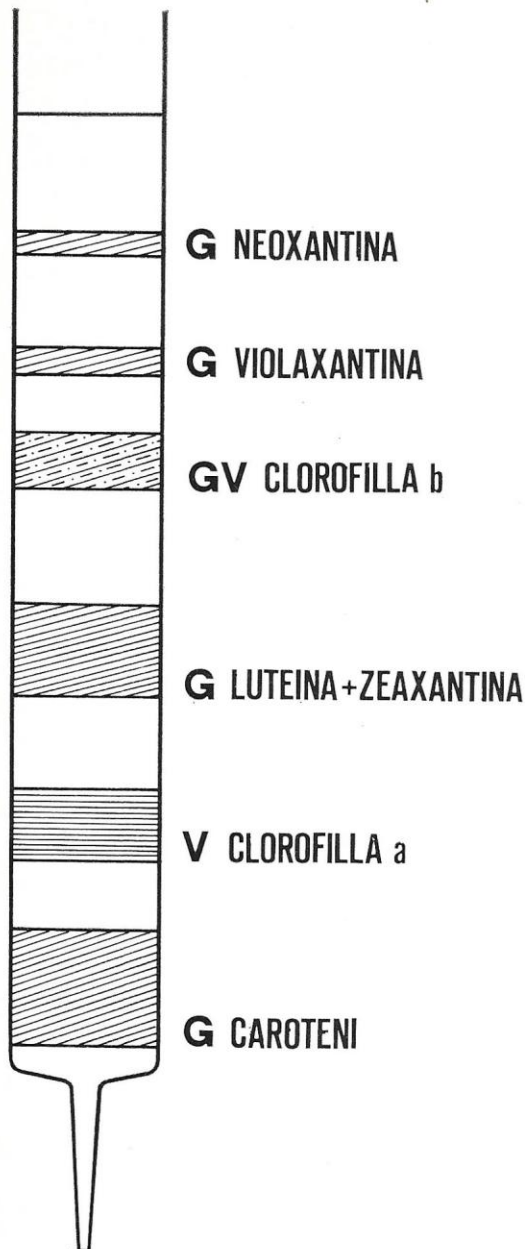
6) Cromatografia radiale su carta di pigmenti fotosintetici; solvente: etere di petrolio — 1,5 % n-propanolo. G = giallo, V = verde, A = arancio.

L'estratto viene versato in un imbuto separatore, al quale si aggiunge un ugual volume di benzene. Si agita violentemente, poi si lascia la miscela a riposo e così si ottengono per partizione le clorofille nello strato superiore (benzenico) e i carotenoidi nello strato inferiore, di alcool. In questo modo è possibile avere separati i due gruppi di pigmenti che si possono quindi cromatografare.

3) *Cromatografia su colonna.* - La soluzione in etere di petrolio viene versata con

cura sopra una colonna di carbonato di calcio o di gesso precedentemente dissecato in stufa, contenuta in un tubo di vetro. I quattro gruppi di pigmenti si separano per differente velocità di migrazione: i carotenoidi sono i più veloci, poi come al solito seguono le xantofille e infine le clorofille (la *a* e poi la *b*).

Per ottenere risultati migliori e riproducibili occorre disidratare completamente la colonna e l'estratto. Sul fondo della colonna di vetro si stratifica della lana di



7) Cromatografia su colonna di zucchero a velo, eluita con etere di petrolio — 0,5 % n-propanolo.

vetro come supporto, e al di sopra di questa si depone con cura il carbonato (già reso anidro), che poi viene pressato in modo da dare una colonna omogenea di circa 10 cm. La superficie della colonna può essere protetta con uno strato di disidratante, ad esempio cloruro di calcio anidro

o solfato sodico. Il tessuto fogliare, secco o disidratato nel modo precedentemente descritto, viene estratto con una miscela etanolo (o propanolo) — etere di petrolio 1:10, si aggiunge un po' di gesso in polvere e la miscela viene tritata in mortaio. La soluzione filtrata e portata ad almeno 5 volumi viene versata in imbuto separatore, al quale viene a poco a poco aggiunto un volume doppio d'acqua, agitando lentamente. Lasciando poi riposare la miscela, si separa inferiormente uno strato acquoso che contiene tutto l'alcool e che viene rimosso aprendo l'ugello dell'imbuto. La soluzione eterea viene quindi chiusa in una beuta contenente sul fondo del disidratante e lasciata a riposo per almeno un giorno.

Al momento dell'esperienza, sopra la colonna viene deposto con una pipetta un poco di etere di petrolio, che a poco a poco scende ad imbibire tutta la colonna. Poi si aggiunge una piccola quantità di estratto: si formano varie zone ben nette, che dall'alto verso il basso corrispondono a: xantofilla, clorofilla *b*, cl. *a*, due o più bande di xantofille. Al contrario i caroteni non sono adsorbiti e si ritrovano nel filtrato, in fondo alla beuta posta a raccogliere le varie frazioni della colonna. Con analogo processo la separazione può essere attuata su colonna di zucchero al velo, e questo è tuttora considerato da molti il metodo migliore (fig. 7). La colonna può poi cedere le singole frazioni se viene lavata con etere contenente un alcool (il n-propanolo è il più adatto) in piccola quantità, dallo 0,5 al 2 %, meglio se in concentrazioni crescenti.

Tutti questi metodi e soprattutto le separazioni su colonna sono tuttora largamente impiegati, in forma più elaborata di quella qui descritta, per la separazione di routine dei carotenoidi. Comunque va ricordato che molte delle bande che si ottengono sono artefatte, contenendo miscugli di pigmenti o loro prodotti di degradazione, e che d'altra parte questi procedimenti non consentono di separare molti isomeri (α - e β -carotene; luteina e zeaxantina); benché queste tecniche siano belle e fondamentalmente semplici, i risultati vanno interpretati con molta cautela.