

## PRÁTICA Nº. 3.2

SEPARAÇÃO DOS PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS POR  
CROMATOGRAFIA EM PAPEL

## INTRODUÇÃO

O cloroplasto, organela onde se realiza a fotossíntese, apresenta estrutura formada por dupla membrana (envelope do cloroplasto), uma matriz fluida (estroma) e um sistema de membranas internas denominadas tilacoides. Os tilacoides constituem-se de membranas lipoproteicas cuja composição difere substancialmente das membranas do envelope. Eles apresentam proporção elevada de ácidos graxos polinsaturados, o que confere às suas membranas elevada fluidez, mas, em contraste, grande sensibilidade aos danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs).

O arranjo das membranas dos tilacoides favorece a captura da energia radiante, uma vez que os pigmentos da fotossíntese encontram-se associados a ela em estruturas denominadas fotossistemas. Os fotossistemas são formados por proteínas e pigmentos acessórios (clorofila *a*, clorofila *b*,  $\beta$ -carotenos e xantofilas), componentes das “antenas dos fotossistemas”, e pelos centros de reação, constituídos por moléculas de clorofila *a* *especiais*, os únicos pigmentos efetivamente envolvidos nos processos de transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese. Os pigmentos localizados nas “antenas” transferem a energia radiante até os centros de reação dos fotossistemas I e II. A transferência da energia de excitação das moléculas de um pigmento para outras ocorre por ressonância indutiva (mecanismo Förster), sendo esse um processo físico. Os pigmentos são responsáveis pela absorção da energia radiante e pela transferência dessa energia a uma série de compostos oxirredutíveis, possibilitando a formação de O<sub>2</sub>, ATP e NADPH+H<sup>+</sup>.

Cada tipo de pigmento possui uma estrutura química definida, com um padrão específico de duplas ligações conjugadas, o que determina a absorção seletiva de certos comprimentos de onda e, conseqüentemente, a sua coloração característica. Em decorrência disso, a clorofila *a* é verde-azulada, a clorofila *b* é verde-amarelada, as xantofilas são amarelas e o  $\beta$ -caroteno é alaranjado. Além de apresentarem colorações características, esses pigmentos também apresentam diferentes afinidades pelos diversos solventes orgânicos e pela água, o que se deve à proporção de radicais hidrofóbicos ou hidrofílicos que cada um deles possui.

Uma técnica extremamente simples que permite a separação dos pigmentos cloroplastídicos é a cromatografia em papel. Na década de 40, essa técnica revolucionou a separação e a detecção de produtos de reações, permitindo a identificação de compostos químicos em plantas. No caso, a cromatografia consiste no uso de tiras de papel-filtro, como suporte de uma fase aquosa (polar), nas quais uma fase móvel orgânica (apolar) se dirige por capilaridade em direção ao ápice. As substâncias a serem separadas são colocadas próximo à base da tira (origem) e se movem verticalmente, dependendo da sua afinidade por uma das fases (aquosa ou orgânica). A separação é, portanto, baseada na partição líquido-líquido dos compostos. Quanto mais apolar é pigmento, maior será sua afinidade pela fase móvel. Em contraste, quanto menos apolar ele for, mais retido pela fase estacionária (aquosa) ele será, permanecendo mais próximo à origem do cromatograma.

## OBJETIVOS

Separar e identificar alguns pigmentos dos cloroplastos por meio da técnica de cromatografia em papel. Associar a composição química dos pigmentos a sua afinidade pelas fases aquosa (polar) e orgânica (apolar) do sistema.

## MATERIAIS

- Folhas de plantas (gramíneas, fumo, beijo, etc.)



- Cuba ou frasco de vidro para cromatografia



- Tiras de papel-filtro cromatográfico (20 x 4 cm) ou outro papel-filtro de qualidade



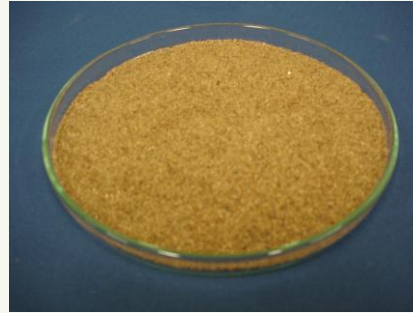
- Tetracloreto de carbono (solvente apolar)



- Balão de vidro



- Areia lavada



- Almofariz e pistilo



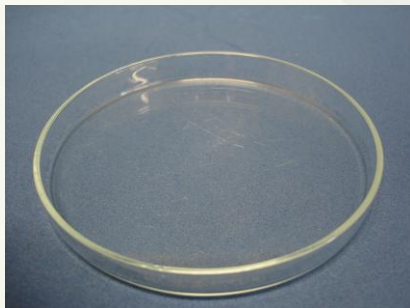
- Funil de vidro



- Tesoura



- Placa de Petri

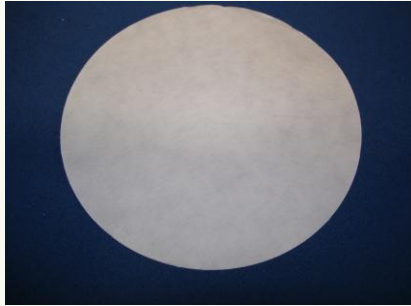


- Gaze





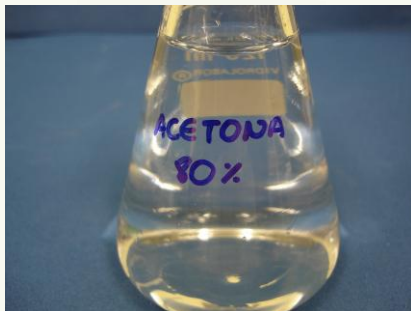
- Papel filtro



- Pipeta de Pasteur (capilar)



- Acetona pura ou 80% (v/v)



- Secador de cabelo



## PROCEDIMENTOS

Obtenha folhas da planta escolhida e picote-as com uma tesoura. Adicione aos pedaços de folhas uma pitada de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou de carbonato de magnésio ( $\text{MgCO}_3$ ) em um almofariz. Coloque um pouco de acetona e homogenize. Filtre o homogenato em papel-filtro. Recolha o filtrado em um frasco de vidro.

Corte uma tira de papel-filtro cromatográfico de aproximadamente 20 x 4 cm, tomando o cuidado para manuseá-la o mínimo possível, uma vez que a oleosidade das mãos interfere na resolução do cromatograma. Utilizando uma pipeta capilar, passe de 15 a 20 camadas do extrato dos pigmentos foliares sobre a origem do cromatograma, que deverão ser estreitas e concentradas. Utilizando um secador de cabelos, ventile levemente o papel após a aplicação de cada camada.

Em seguida, adicione 5 a 10 mL de tetracloreto de carbono (solvente apolar; fase móvel) em uma cuba. Fixe a tira de papel-filtro em uma placa de Petri invertida e introduza-a no interior da cuba, de modo que a extremidade encoste-se ao solvente, mas sem mergulhar a origem.

Após 60-90 minutos, observe as faixas formadas e identifique os pigmentos correspondentes, considerando a coloração e a posição de cada uma das faixas no cromatograma.