

DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS PIGMENTOS DOS CLOROPLASTOS

INTRODUÇÃO

A luz visível corresponde a faixa da energia eletromagnética perceptível ao olho humano, que, por definição, se constitui de movimentos ondulatórios na forma de pacotes de energia (fótons). A luz visível inclui toda a radiação eletromagnética compreendida entre as faixas do ultravioleta e do infravermelho. Para que a energia luminosa seja utilizada pelos organismos vivos é preciso que ela seja absorvida e, nas plantas, a absorção dessa energia é realizada pelas clorofilas e carotenoides presentes nas antenas dos fotossistemas.

As folhas absorvem mais fortemente as radiações nas faixas do azul-violeta e do amarelo-vermelho, mas transmitem ou refletem quase toda a radiação na faixa do verde. Cada fóton da radiação absorvida irá excitar uma molécula de clorofila ou carotenoide nas “antenas” dos fotossistemas. Parte da energia de cada fóton, independentemente da sua energia (cor, faixa do espectro ou comprimento de onda) é dissipada na forma de calor. Outra fração dessa energia é dissipada por fluorescência, radiação luminosa emitida pelas clorofilas na região do vermelho e em comprimento de onda mais longo do que o recebido pelo pigmento. A fluorescência tem sido utilizada na avaliação da ocorrência de estresses em plantas como estimativa da eficiência fotoquímica, parâmetro fisiológico que determina a eficácia com que os fótons absorvidos pelas antenas dos fotossistemas são convertidos em poder redutor (NADPH+H⁺). Normalmente, a eficiência fotoquímica é reduzida quando as plantas são submetidas a condições de estresse.

Cada pigmento que participa da fotossíntese apresenta uma coloração que está diretamente relacionada à sua estrutura química e, como consequência, cada pigmento apresenta regiões específicas de absorção no espectro de radiação, que, geralmente, correspondem às suas cores complementares. Os pigmentos carotenoides apresentam picos de absorção nas faixas correspondentes às cores azul-violeta, absorvendo mais intensamente radiações nas faixas de maior energia do espectro (menor comprimento de onda). Todavia, as clorofilas, além de absorverem nas faixas correspondentes a sua cor complementar (laranja e vermelho), também absorvem na região do azul-violeta.

A determinação das faixas de absorção de cada pigmento pode ser obtida com a utilização de espectrofotômetros, equipamentos que utilizam o princípio da decomposição da luz branca pela passagem dessa radiação através de um prisma. Cada faixa de radiação monocromática é obtida pela seleção de determinado comprimento de onda por um filtro (monocromador). Esses equipamentos permitem obter o “espectro de absorção”, que consiste na absorção relativa (absorvância) do pigmento em cada comprimento de onda (λ). Quando se estudam os efeitos da luz de diferentes comprimentos de onda, usando quantidades não saturantes em um processo fisiológico, como a fotossíntese, por exemplo, obtém-se o “espectro de ação”. O espectro de ação, comparado com o espectro de absorção, ajuda a elucidar a possível participação de um pigmento em um determinado processo fisiológico.

A espectrofotometria também permite determinar, de modo quantitativo, a concentração de substâncias que, em solução, absorvem radiação luminosa. A Lei de Lambert-Beer expressa uma relação matemática que forma a base da análise espectrofotométrica e mostra que a absorvância de uma solução é diretamente proporcional à concentração somente até certo limite, apresentando um ajustamento logarítmico.

A equação $A = -\log(I/I_0)$ corresponde à representação matemática da Lei de Lambert-Beer, em que: **A** = absorvância medida com a utilização de um espectrofotômetro, **I₀** = intensidade da radiação incidente na cubeta de amostra em determinado comprimento de onda, **I** = intensidade de radiação transmitida pela amostra.

Quando o valor do coeficiente de extinção molar é conhecido e utilizando-se dos conceitos da Lei de Lambert-Beer relacionados à espectrofotometria, a concentração (**c**) de uma amostra pode ser determinada empregando-se a equação $A = a \cdot b \cdot c$, em que: **A** = absorvância lida no espectrofotômetro, **a** = coeficiente de absorvidade molar (constante que varia de substância para substância e com o solvente utilizado), **b** = caminho óptico da luz através da amostra (distância que a luz percorreu nela, geralmente, 1 cm), e **c** = concentração da substância na amostra.

OBJETIVOS

Determinar o espectro de absorção dos pigmentos cloroplastídicos e de soluções coloridas. Verificar a ocorrência de fluorescência das clorofilas em extratos cetônicos.

MATERIAIS

- Extrato cetônico de pigmentos de cloroplastos
- Extrato cetônico de carotenóides purificados
- Extratos etéreos de *Iresine* e/ou de *Codiaeum*
- Extrato aquosos antocianinas ou soluções de azul de metileno, vermelho neutro, bicromato de potássio e/ou de outro corante qualquer



- Acetona pura



- Colorímetro ou espectrofotômetro



- Anilina verde (obtida em lojas de artigos para festas)



- Tubos de ensaio ou cuba de vidro bipartida



- Lâmpada refletora de 100-150W



- Folhas de plantas de *Allamanda cathartica* L. (Apocinaceae) mantidas à sombra e na luz



PROCEDIMENTOS

Colete folhas de gramíneas ou de outra espécie sugerida (fumo, espinafre, etc.). Picote 50 mg de folhas e macere em 25 mL de acetona pura adicionada de uma pitada de carbonato de cálcio (CaCO_3). Filtre o homogenato em papel-filtro, lavando o mesmo até a retirada de todo o pigmento aderido. Mantenha o extrato protegido da luz. Utilizando o extrato cetônico de pigmentos foliares, determine a absorvância nos comprimentos de onda disponíveis no colorímetro (filtros) ou no espectrofotômetro de 5 em 5 nanômetros (10^{-9} m). O espectrofotômetro é um equipamento que decompõe a luz branca nas diferentes cores: violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho, que correspondem a diferentes faixas de comprimentos de onda. Caso o extrato obtido fique muito concentrado, dilua-o com acetona. Use acetona pura para ajustar o zero de absorvância (ou 100% de transmitância) no equipamento. Construa um gráfico e coloque na abscissa os comprimentos de onda e, na ordenada, as respectivas absorvâncias. Da mesma forma, determine o espectro de absorção de uma preparação de carotenoides ou de uma solução aquosa de dicromato de potássio, comparando com o espectro anterior. Determine os espectros de absorção dos demais pigmentos ou extratos disponíveis e compare os resultados.

Utilizando-se fórmulas específicas, encontradas na literatura, também é possível determinar, com o auxílio de espectrofotômetro, as concentrações de pigmentos fotossintéticos provenientes de folhas e de outros órgãos vegetais.

Para se observar o fenômeno de fluorescência, transfira para uma cuba de vidro bipartida ou para um tubo de ensaio o restante do extrato de pigmentos totais obtido. No outro lado da cuba ou em outro tubo de ensaio, coloque uma solução aquosa de anilina verde. Exponha o conjunto a uma fonte de luz forte e observe a variação de cor nas duas soluções.