

SEPARAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENÓIDES COMO FERRAMENTA PARA O ENSINO DE CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Juliana Almeida Rocha

Mestranda em Biotecnologia - UNIMONTES
e-mail: juliana-57@hotmail.com

Vanessa de Andrade Royo

Doutora em Química de Produtos Naturais
Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNIMONTES

Recebido em: 28/08/2015

Aprovado em: 07/12/2015

RESUMO

Este artigo descreve um experimento simples, envolvendo a extração e separação de clorofilas e carotenos de folhas vegetais por meio da técnica de cromatografia preparativa. Este ensaio pode ser utilizado para o ensino de química orgânica em diversos cursos de graduação. Nesta prática foram utilizadas placas com sílica gel e os solventes hexano e acetona. A técnica permite que os alunos visualizem de forma rápida e prática o resultado da cromatografia preparativa.

Palavras chave: Cromatografia. Química orgânica. Pigmentos vegetais. Ensino. Aula Prática

SEPARATION OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDS AS A TOOL FOR INSTRUCTION IN PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

This article describes a simple experiment involving the extraction and the separation of chlorophylls and carotenoids from plant leaves by preparative chromatography technique. This essay can be used for the teaching of organic chemistry in various undergraduate courses. In this practice were used plates with silica gel and hexane solvents and acetone. The technique allows students to view a fast and practical way the result of preparative chromatography.

Keywords: Chromatography. Organic chemistry. Vegetable pigments. Education. Practical class.

1 INTRODUÇÃO

Cromatografia pode ser definida como método físico-químico de separação de componentes de mistura complexa, com o uso de duas fases imiscíveis: uma estacionária e outra móvel (COLLINS et al, 2006). Existem várias técnicas cromatográficas que são o resultado de combinações entre diferentes fases estacionárias e fases móveis (DEGANI et al, 1998).

Uma destas técnicas é a cromatografia em camada preparativa, que é utilizada com o objetivo de purificar substâncias. Entre as fases estacionárias utilizadas a sílica é a mais comum, no preparo, ela é depositada sobre uma placa suporte de vidro com tamanho de 20 cm x 20 cm, aplicada com espessura de 1,0 milímetro, em seguida ocorre a secagem e ativação em estufa (DEGANI et al, 1998).

As clorofilas e carotenoides são pigmentos envolvidos na fotossíntese, e ficam armazenados nos cloroplastos que são as organelas onde ocorre o processo fotossintético. Com o processo de maceração de tecidos vegetais com solventes orgânicos polares, como acetona, etanol, metanol e acetato de etila, ocorre o rompimento das ligações entre estas moléculas e assim elas são liberadas destas estruturas celulares (STREIT et al, 2005).

Em 1818, Pelletier e Caventou propuseram que a substância verde extraída de folhas com auxílio de álcool fosse chamada de clorofila (STREIT et al, 2005). Estas podem ser classificadas em: *a*, *b*, *c* e *d*, no entanto, apesar de receberem diferentes denominações, ambas possuem estrutura química semelhante: quatro anéis pirrólicos e um anel isocíclico e no interior há um átomo de magnésio (LANFER-MARQUEZ, 2003). Conforme pode ser observado na FIG. 1-A.

Além das clorofilas, há também os carotenoides, que têm este nome devido estarem presentes em grande quantidade em cenouras (*Daucus carota*), já foram descritos cerca de 600 tipos de carotenoides, entre eles um que se destaca é o β -caroteno, que é um dos precursores da vitamina A ou retinol (SILVEIRA et al, 2014). Apesar de também participar da fotossíntese é designada como um “pigmento acessório”, junto com a clorofila *b* e as ficobilinas (STREIT et al, 2005).

Os carotenoides são constituídos por cadeias de polienos isoprenoides, com oito unidades de cinco isoprenos unidos em um esqueleto central de 22 átomos de carbono e duas caudas com 9 carbonos, resultando em uma molécula simétrica (SILVEIRA et al, 2014). Conforme pode ser observado na FIG. 1-B.

Figura 1-A - Estrutura química da clorofila

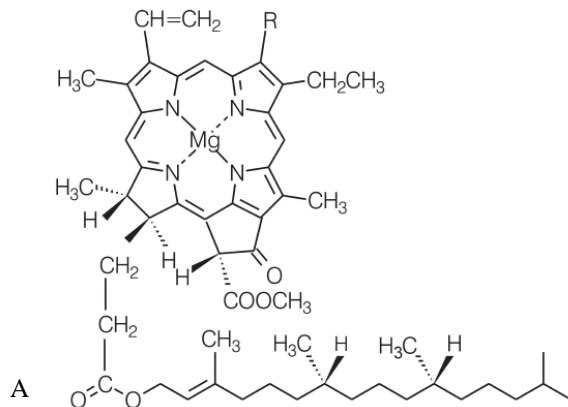
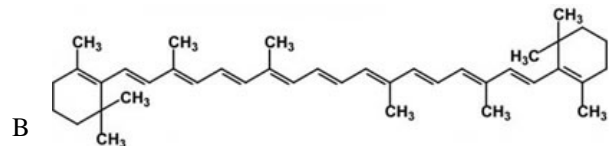


Figura 1-B – Estrutura química carotenoide



Devido às clorofilas e carotenos serem facilmente visualizados na separação cromatográfica, sem necessitar de métodos adicionais para revelação, como luz UV e reagentes reveladores químicos, elas podem facilitar o aprendizado da técnica de cromatografia preparativa.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver aula experimental de fácil execução, para ser utilizada em disciplinas que envolvam temas da química orgânica, e que não necessitasse de reveladores químicos ou físicos. A experiência consiste na cromatografia preparativa do extrato de folhas vegetais, que pode ser obtido facilmente com uso de solventes orgânicos, trituração/maceração das folhas e posterior filtração. Para este ensaio foram utilizados dois solventes: acetona e hexano, e sílica como fase estacionária nas placas cromatográficas.

2 MÉTODOS

2.1 Procedimentos gerais

Foram utilizados Solventes PA Vetec. O objetivo da aula foi demonstrar o método para a realização da cromatografia preparativa. Foram preparadas placas cromatográficas de 10 cm X 3 cm (FIG. 2-A). As placas de sílica foram preparadas diluindo sílica gel 60 G sem fluorescência em água na proporção 2:1, que, em seguida, foi aplicada sobre o aparato de vidro em espessura de um milímetro, deixou-se secar em temperatura ambiente e, em seguida, ativou-se a sílica com aquecimento em estufa a 130° C por duas horas. Após ativação, as placas foram levadas ao dessecador até atingir temperatura ambiente.

2.2 Preparo do extrato

Cerca de 50 gramas de folhas vegetais foram pesadas, em seguida trituradas em cadinho com auxílio de um pistilo, logo após adicionou-se uma mistura de hexano: acetona (2:1) e a solução obtida foi filtrada em funil usando algodão. Obtendo-se o extrato pronto para ser aplicado nas placas (FIG. 2-B).

2.3 Separação cromatográfica

Ocorre em três etapas: eluição inicial, separação dos pigmentos e segunda eluição.

2.3.1. Primeira etapa: eluição inicial: Com auxílio de uma pipeta foi depositado o extrato obtido sobre toda a extensão inferior da placa de cromatografia, a aproximadamente 0,5 centímetros da borda inferior (FIG. 2-C). Após evaporar o solvente a placa foi eluída em cuba contendo hexano (FIG. 2-D).

2.3.2. Segunda etapa: separação dos pigmentos: Após a primeira eluição foi observada a presença de duas regiões com cores distintas na placa, uma verde e outra amarela (FIG. 2-E). Com auxílio de uma espátula retirou-se as áreas da placa que continham os pigmentos, separando em dois *erlenmeyers*, um com a parte verde e outro com a parte amarela. Adicionaram-se 5 mL de solução de hexano: acetona (2:1) em cada *erlenmayer* (FIG. 2-F), estes foram colocados em banho-maria com ultrassom por 10 minutos, em seguida o material foi filtrado para remoção da sílica.

2.3.3 Terceira etapa: segunda eluição: Foi realizada nova eluição com os líquidos obtidos na segunda etapa, aplicou-se uma gota de cada um deles em regiões separadas na parte inferior da placa de cromatografia em camada delgada (CCD) a aproximadamente 0,5 cm da borda inferior, conforme pode ser observado na FIG. 2-G. A placa de CCD pode ser preparada com a mesma técnica usada para o preparado da placa de cromatografia preparativa, a diferença é na quantidade de sílica depositada, que na CCD a camada é menos espessa.

Figura 2-A – Placa de sílica

Figura 2-B – Extrato para ser aplicado nas placas

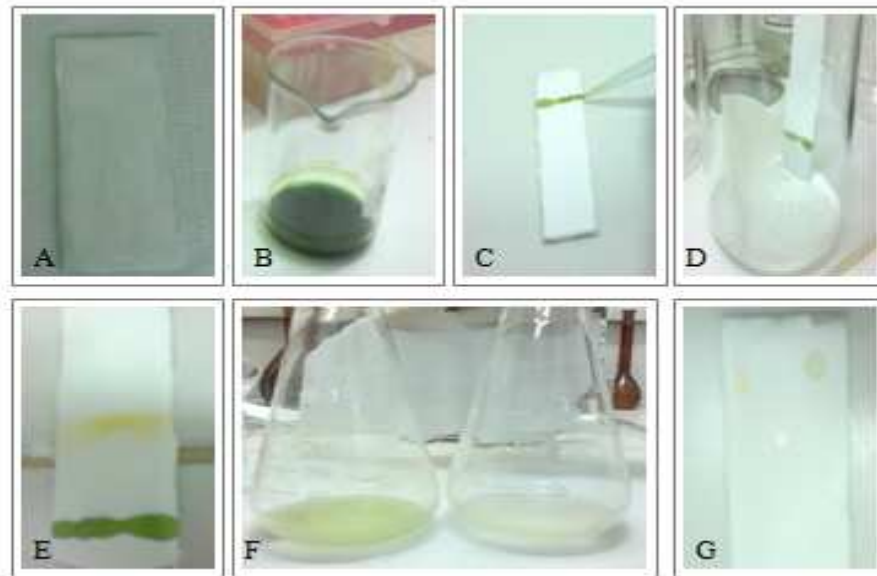
Figura 2-C - Aplicação do extrato nas placas

Figura 2-D - Eluição em cuba contendo hexano

Figura 2-E – Placa após a 1ª eluição

Figura 2-F – Erlenmeyers com pigmentos separados na segunda etapa

Figura 2-G – Placa após a 2ª eluição



Fonte: Material da pesquisa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Separação dos pigmentos

Para analisar compostos em sistemas cromatográficos em geral, um parâmetro a ser observado é a polaridade dessa substância, pois isso influenciará a escolha do solvente a ser utilizado em cada etapa do processo (STREIT et al, 2005). Para extração dos pigmentos da folha utilizou-se a acetona que é um solvente polar, pois a clorofila e carotenos também apresentam caráter polar e assim pode-se obter boa extração destes pigmentos do material foliar.

Após a 1ª eluição das placas, foi possível verificar duas áreas com colorações distintas: amarela e verde. A coloração amarela se deve à presença de carotenoides (FIG. 1-B), que possuem cadeia carbônica longa e com alto grau de insaturação. A área com tonalidade verde é devido à presença de clorofilas *a* e *b* (FIG. 1-A), suas estruturas são semelhantes, a única

diferença entre elas é que a clorofila *a* possui um grupo metil (-CH₃), e a clorofila *b* no lugar do grupo metil tem um grupo aldeído (-CHO). As clorofilas *a* e *b* possuem uma porfirina contendo magnésio em seu centro, o que faz com que ela apresente interação mais forte com a fase estacionária (FONSECA; GONÇALVES, 2004). Dessa forma, elas têm tendência a ficar mais retidas, enquanto os carotenos tendem a eluir mais rapidamente, ficando localizados na parte superior da placa, conforme pode ser observado na FIG. 2-E.

Através da observação da placa da 2^a eluição pode-se perceber que a separação e purificação dos pigmentos utilizando a técnica de cromatografia preparativa foi eficaz. Na FIG. 2-G é possível observar claramente que os pigmentos foram separados adequadamente, pois na área onde foi aplicada a amostra que deveria conter apenas clorofilas a única área observada foi a que apresentava coloração verde, e na área onde foi aplicada a porção que conteria os carotenos foi visualizada apenas uma região com coloração amarela.

3.2 Aplicação em aula

Este experimento foi aplicado em aula prática, na disciplina de Métodos analíticos em biotecnologia, do curso bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros, com duração de quatro horas, para dez alunos, divididos em cinco duplas, todas realizaram todas as etapas da prática. Após a primeira eluição, os pigmentos obtidos pelas cinco duplas foram reunidos em um único *erlenmeyer* para o processo de concentração em banho-maria.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível perceber que com o uso de materiais simples, como folhas vegetais, é possível preparar aulas práticas interessantes, obtendo bons resultados no ensino de cromatografia preparativa e de cromatografia em camada delgada. Nessa prática, pode-se combinar ainda com a discussão de outros temas, como a importância desses pigmentos para as plantas, abordando também fenômenos envolvendo interações intermoleculares.

ROCHA, J. A.; ROYO, V. de A. Separação de clorofilas e carotenoides como ferramenta para o ensino de cromatografia preparativa

REFERÊNCIAS

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7, 1988. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

FONSECA, S. F.; GONÇALVES, C. C. S. Extração de pigmentos do espinafre e separação em coluna de açúcar comercial. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 20, p. 55-58, nov. 2004. Disponível em: <qnesc.sbq.org.br/online/qnesc20/v20a10.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2015.

LANFER- MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 227-242, jul./set. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v39n3/03.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2015.

SILVEIRA, A. A. B.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. B-caroteno e astaxantina - características e importância: uma revisão. **Revista Eletrônica Interdisciplinar de Saúde e Educação – RISE**, Barra do Garças, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2014. Disponível em: <<http://faculdadegarapes.edu.br/revista/index.php/rise/article/download/49/37>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, maio/jun., 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000300043&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 jun. 2015.