



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DISCIPLINA: BIOFÍSICA / PROFª BIANCA MENDES MACIEL

X CROMATOGRAFIA EM PAPEL

NOME DOS COMPONENTES:

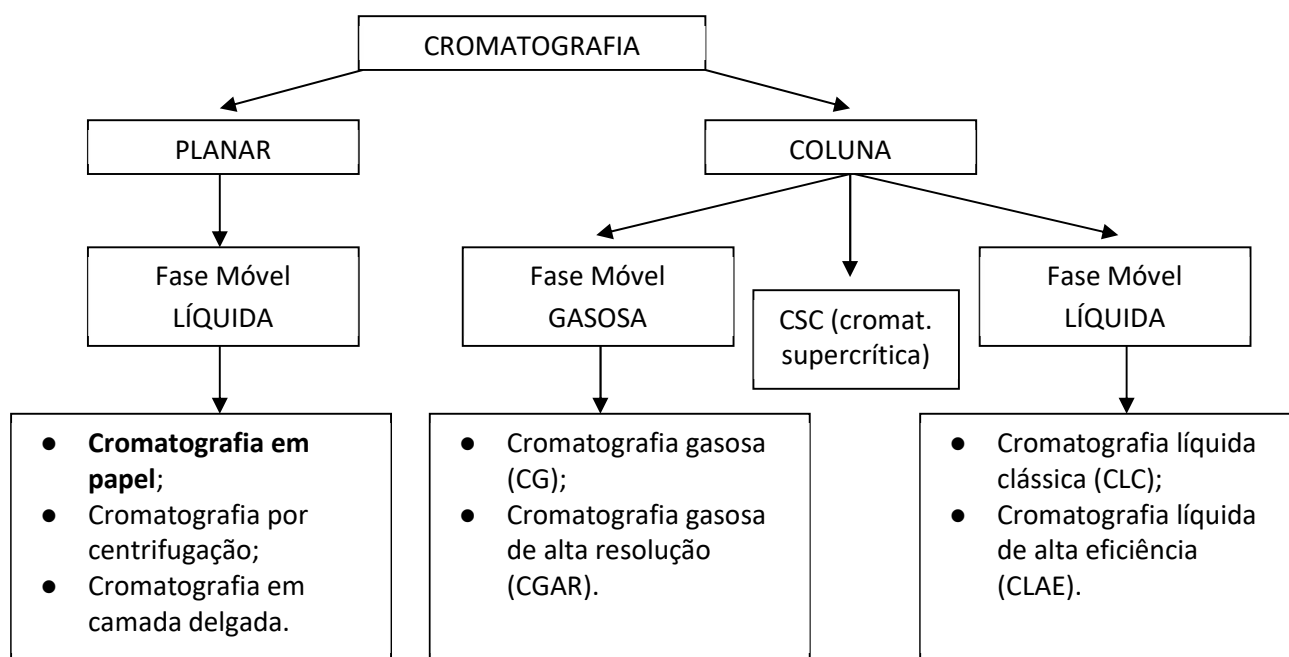
DATA: ____/____/____

OBJETIVOS:

- Familiarizar o estudante com a técnica de cromatografia em papel;
- Aplicar a técnica na separação de pigmentos vegetais.

CONSIDERAÇÕES:

- **CROMATOGRAFIA:** Método no qual as substâncias de uma mistura são separadas pela carga, tamanho, solubilidade ou outra propriedade de seus componentes, através de sua partição entre uma fase móvel e uma fase estacionária;

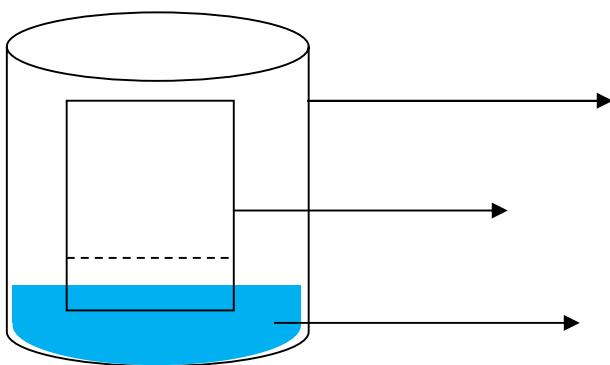


- **CROMATOGRAFIA EM PAPEL (partição líquido-líquido, separa compostos polares):**

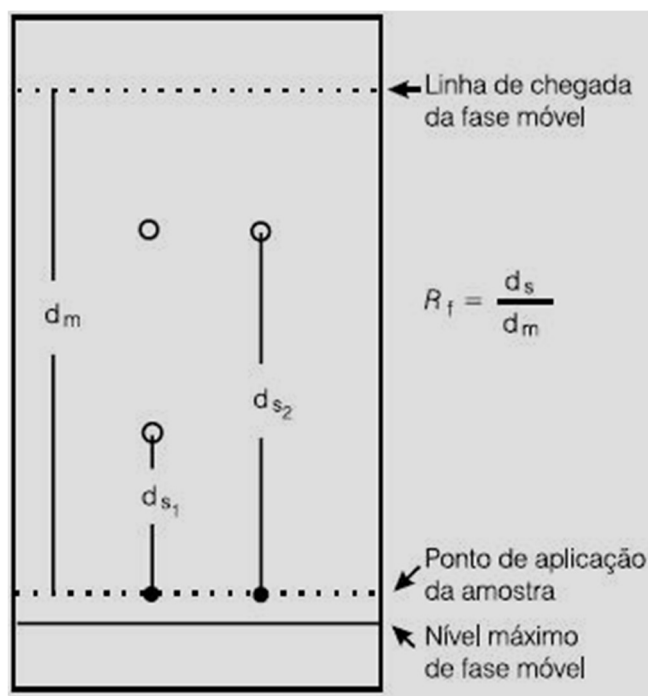
- a. Fase estacionária: sistema água-celulose (adsorção das moléculas de água pela fibra da celulose através das pontes de H).
- b. Fase móvel: solvente de baixa polaridade

Ocorre migração da fase móvel pela fase estacionária. Durante a migração, os compostos previamente aplicados na linha de base, são arrastados em velocidades diferentes e separados de acordo com suas polaridades, de modo que a substância que possui maior afinidade com o solvente é deslocada com uma velocidade maior.

Nomeie as partes do sistema de cromatografia em papel:



O parâmetro mais importante a ser considerado é o *fator de retenção* (R_f), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6.



FONTE: Degani et al., 1998

MATERIAL

I. Equipamentos:

- Câmara cromatográfica (pode ser um frasco de vidro com tampa ou um Becker tampado com uma placa de Petri)
- Estufa
- Secador de cabelo

II. Vidrarias e utensílios:

- Almofariz e pistilo
- Becker 250 mL
- Placa de Petri
- Proveta 50 mL
- Tubo capilar
- Papel de filtro Whatman nº 1
- Tesoura
- Régua
- Clips

III. Reagentes:

- Acetona
- Água destilada

IV. Amostras:

- Folhas verdes, amarelas, vermelhas ou verduras e legumes de cores diferentes.

PRECEDIMENTO

1. Depois de lavadas e retiradas as “nervuras”, triturar as folhas no almofariz com o auxílio do pistilo acrescentando-se, em pequenas quantidades, 10 mL de acetona, medidos com a proveta, para formar um extrato foliar cetônico;
2. Cortar o Papel de Filtro no tamanho 9 X 9 cm. Trace a lápis três retas: uma a 2 cm da base do papel (linha de base); outra a 8 cm da linha de base (linha de chegada da fase móvel); e uma linha na margem esquerda a 1 cm da borda do papel. Subdivida a linha de base a cada 2 cm (nesses pontos serão aplicados as amostras);
3. Aplicar nos pontos marcados, as amostras preparadas por cada grupo, com o auxílio do tubo capilar. Aplique duas vezes, deixando secar a cada aplicação (utilize o secador de cabelo para secar).
4. Coloque a fase móvel (acetona) na câmara cromatográfica até, mais ou menos, a 1 cm de altura;
5. Enrole o papel e prenda-o com um clip, de forma que se pareça com um tubo, deixando a linha marcada na lateral para dentro;
6. Coloque o papel na câmara cromatográfica, de maneira uniforme, sem que a linha de partida esteja imersa no solvente;
7. Tampe a câmara cromatográfica e observe a subida da fase móvel. Assim que o solvente atingir a linha de chegada, retire o papel, secando em estufa ou com secador de cabelo.
8. Amassar as outras folhas com o pistilo no almofariz acrescentando, dessa vez, 10 mL de etanol, em pequenas quantidades. Obteremos então um extrato foliar etanólico, que será transferido para a outra câmara cromatográfica;

9. Repetir os passos de 2 a 7, colocando etanol ou invés de acetona na fase móvel.

EXERCÍCIOS:

1) Relacione os diferentes pigmentos observados em cada amostra de cada extrato (cetônico ou etanólico) e calcule as Rf:

PIGMENTO	EXTRATO CETÔNICO		EXTRATO ETANÓLICO	
	DISTÂNCIA PERCORRIDA (cm)	Rf	DISTÂNCIA PERCORRIDA (cm)	Rf
AMOSTRA ____				
AMOSTRA ____				
AMOSTRA ____				

AMOSTRA _____				
AMOSTRA _____				

OBS: Cores dos pigmentos

- ✓ Antocianina (Flavonóide) - roxa;
- ✓ Clorofila – Tipo A: verde-azulada / Tipo B: verde-amarelada;
- ✓ Xantofila (carotenoide) – amarela;
- ✓ Caroteno (carotenoide) – laranja intenso

3) Cole os cromatogramas e observe se houve diferença nos perfis cromatográficos em relação ao solvente? Relacione a solubilidade dos pigmentos com a fase móvel aplicada.

- 4) Compare os seus resultados com as corridas dos outros grupos. Ocorreu reprodutibilidade do experimento?**