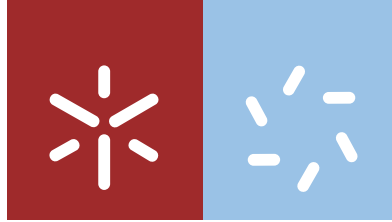


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Paula Alexandra Amaro da Costa

**Design e Desenvolvimento de Atividades
Laboratoriais de Química Verde para os
Ensinos Básico e Secundário**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Paula Alexandra Amaro da Costa

**Design e Desenvolvimento de Atividades
Laboratoriais de Química Verde para os
Ensinos Básico e Secundário**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Ciências – Formação Contínua de Professores
Área de Especialização em Física e Química

Trabalho realizado sob orientação da

Professora Doutora Alice Maria Esteves Dias

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento vai em primeiro lugar para a minha orientadora Professora Doutora Alice Maria Esteves Dias pelo incansável acompanhamento e disponibilidade, pelos ensinamentos, sugestões e palavras amigas. Muito obrigada.

Agradeço ao meu marido, Joaquim, ao meu filho Gil e à minha mãe Generosa pela paciência infinita, pela tolerância e compreensão das muitas horas que não pude estar com eles e por não me deixarem desistir.

Agradeço, ainda:

Ao meu irmão Luís pela máquina fotográfica.

À dona Custódia Florista pelas flores que me disponibilizou.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

TÍTULO: “Design e Desenvolvimento de Atividades Laboratoriais de Química Verde para os Ensinos Básico e Secundário”

RESUMO

O ensino das ciências com recurso a atividades práticas que requerem a ação efetiva do aluno, física e intelectual, dá sentido e complementa os conceitos em estudo, na medida em que, fazendo por si mesmo o aluno não só poderá valorizar a sua capacidade de preparação, autonomia e análise crítica, como poderá transformar as observações banais do dia-a-dia em observações com significado.

Porque é que há frutos vermelhos, verdes e de várias outras cores? E as pétalas? Azuis, violeta, amarelas, vermelhas, o que é que as torna tão bonitas e tão coloridas?

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novas atividades laboratoriais no âmbito da química dos pigmentos naturais que, para além de apresentarem um grande impacto visual, são concordantes com os princípios da Química Verde.

O trabalho laboratorial realizado envolveu a extração, identificação e separação dos carotenoides presentes num concentrado de tomate e dos carotenoides, flavonoides e antocianinas presentes nas pétalas de flores. A identificação dos pigmentos fez-se por cromatografia em papel e a sua separação foi realizada por cromatografia em coluna, com recurso a seringas descartáveis e materiais adsorventes de fácil aquisição.

Com base nos resultados obtidos na investigação realizada foram elaboradas duas propostas de atividades laboratoriais que validam toda a execução laboratorial. As atividades apresentadas permitirão aos alunos a aquisição de maiores competências na prática laboratorial e na compreensão de conceitos químicos, como a polaridade, ligações intermoleculares, solubilidade, miscibilidade de solventes, hidrocarbonetos e sustentabilidade.

PALAVRAS CHAVE: Cromatografia, Pigmentos Naturais, Química Verde

TITLE: "Design and Development of Green Chemistry Laboratory Activities for Basic and Secondary Education"

ABSTRACT

The teaching of the sciences with the use of practical activities requiring the effective action of the student, both physical and intellectual, gives meaning and complements the concepts under study. By doing himself, the student can value his capacity of preparation, autonomy, and critical analysis, and can also learn how to turn everyday banal observations into meaningful observations.

Why are there red, green, and various other colorful fruits? And, what about the colors of petals? Blue, violet, yellow, red, what makes them so beautiful and so colorful?

The objective of this work was to develop new laboratory activities in the field of the chemistry of natural pigments, aiming to achieve great visual impact and according with the principles of Green Chemistry.

The laboratory work performed involved the extraction, identification and separation of the carotenoids present in a tomato concentrate and of the carotenoids, flavonoids and anthocyanins present in the flower petals. The pigments were identified by paper chromatography and separated by column chromatography using disposable syringes and readily available adsorbent materials.

Based on the results obtained in the research carried out, two proposals of laboratory activities were elaborated that validate the entire laboratory execution. These activities will allow students to acquire greater competences in the laboratorial practice and theoretical concepts in chemistry, such as polarity, intermolecular bonds, solubility, miscibility of solvents, hydrocarbons and sustainability.

KEYWORDS: Chromatography, Green Chemistry, Natural Pigments

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Declaração de Integridade	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice Geral.....	vii
Tabela de Siglas	x
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiv
Capítulo I – Introdução	1
1. A Química Verde	3
1.1. As Dificuldades na Aplicação da Química Verde e os Segundos Doze Princípios da QV .	6
1.2. A Química Verde e a Educação	7
2. A Química dos Pigmentos: Pigmentos Naturais de Origem Vegetal	10
2.1. Classificação dos Pigmentos	11
2.1.1. Carotenoides	12
2.1.1.1. Estrutura Química de Carotenoides	13
2.1.1.2. Função dos Carotenoides/Papel na Saúde Humana	16
2.1.1.3. Extração de Carotenoides	17
2.1.2. Flavonoides	18
2.1.2.1. Estrutura Química de Flavonoides	18
2.1.2.2. Antocianinas	19
2.1.2.3. A Copigmentação de Flavonoides/Antocianinas	24
2.1.2.4. Extração e Separação de Flavonoides e Antocianinas	25
2.2. Extração e Separação de Pigmentos - Trabalhos Direcionados Para o Ensino	25
3. Separação e Identificação de Pigmentos por Técnicas de Cromatografia	28
3.1. Princípio da Cromatografia	28
3.2. Classificação dos Métodos Cromatográficos	29
3.2.1. Cromatografia de Adsorção em Coluna: Cromatografia Líquido-Sólido	31
3.2.2. Cromatografia de Partição Planar	31
3.3. A Fase Estacionária: O amido	32

3.4. Solventes de Eluição	36
Capítulo II – Resultados e Discussão	39
PARTE A – Extração e Separação de Carotenoides do Concentrado de Tomate	42
1. Os Pigmentos do Tomate	42
2. Extração de Carotenoides	44
2.1. Ensaio preliminares	45
2.2. Extração otimizada	49
3. Separação de Carotenoides por Cromatografia	50
3.1. Cromatografia em Papel	50
3.2. Cromatografia em Coluna	52
PARTE B –Extração e Separação de Pigmentos de Pétalas de Flores	57
1. Extração de pigmentos	57
2. Separação Cromatográfica	59
2.1. Análise dos Pigmentos por Cromatografia em Papel	59
2.2. Cromatografia em Coluna de Extratos de Flores	68
2.2.1. Pigmentos de Pétalas de Rosas Amarelo-avermelhadas e Rosas Bordeaux	68
2.2.2. Pigmentos de Pétalas de Amores-Perfeitos	74
2.2.3. Pigmentos de Pétalas de Petúnias	79
2.2.4. Pigmentos de Pétalas de Tagetes	81
2.2.5. Pigmentos de Lantanas amarelo-avermelhadas	84
Capítulo III – Parte Experimental	87
Parte A – Extração e Separação de Carotenoides do Tomate	88
1. Materiais e Reagentes	88
2. Extração de Carotenoides	88
2.1. Ensaio preliminares	88
2.2. Preparação dos extratos (otimizados)	90
3. Separação de Carotenoides por Cromatografia	90
3.1. Cromatografia em Papel	90
3.2. Cromatografia em Coluna	91
PARTE B - Extração e Separação dos Pigmentos de Pétalas de Flores	94
Materiais e Reagentes/Flores	94

1. Extração de Pigmentos	94
2. Separação Cromatográfica	95
2.1. Cromatografia em Papel	95
2.2. Cromatografia em Coluna de Flores (C _F)	96
2.2.1. Colunas de Extratos de Rosas Bourdeux e Amarelo-avermelhadas	96
2.2.2. Colunas de Extratos de Amores-perfeitos (C _{F6} -C _{F9})	98
2.2.3. Coluna de Extratos de Petúnias (C _{F10})	99
2.2.4. Coluna de Extratos de Tagetes (C _{F11})	99
2.2.5. Coluna de Extratos de Lantanas (C _{F12})	99
2.3. Testes Colorimétricos Para Pesquisa de Flavonoides	100
2.4. Teste de Vapores de Amoníaco/Luz UV	100
Capítulo IV – Proposta de Atividades	101
Atividade 1: Atividade Laboratorial - Extração e Separação dos Pigmentos do Tomate por Cromatografia.....	102
Atividade 2: Projeto de Investigação Experimental – A Química na Cor das Flores	109
Capítulo V– Considerações Finais	122
Capítulo VI – Referências Bibliográficas	124

Tabela de Siglas

QV	-	Química Verde
GCI	-	Green Chemistry Institute (Instituto da Química Verde)
ACS	-	American Chemical Society (Sociedade Americana de Química)
GSK	-	GlaxoSmithKline
SDS	-	Safety Data Sheet (Folha de Dados de Segurança)
SHE	-	Safety, Health, Environment (Segurança física, Saúde Humana, Ambiente)
CPS	-	Copolymer of <i>n</i> -butylacrylate, styrene and acrylic acid (copolímero de <i>n</i> -butilacrilato, estireno e ácido acrílico)
UV-Vis	-	Ultravioleta-Visível
T	-	Tomate
C	-	Cenoura
CT	-	Concentrado de Tomate
CP	-	Cromatografia em papel
CC	-	Cromatografia em Coluna
C _T	-	Coluna de Tomate
C _F	-	Coluna de Flores
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Elevado Desempenho)
TLC	-	Thin Layer Chromatography (Cromatografia em Camada Fina)
R _f	-	Fator de Retenção
Forestal	-	Mistura de ácido acético/ácido clorídrico conc./água (10:3:30)
BAW	-	Mistura de butanol/ácido acético/água (4:1:5)
EP	-	Éter de petróleo 40-60 °C
Ac	-	Acetona
EtOH	-	Etanol
AcOEt	-	Acetato de etilo
BuOH	-	Butanol

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura de uma célula vegetal.	11
Figura 2 - Fontes naturais de carotenoides.	12
Figura 3 - Carotenoides dão cor amarela e laranja a: (a) <i>Gerbera híbrida</i> , (b) <i>Lilium</i> e (c) <i>Freesia</i>	13
Figura 4 - Grupo isopreno (ip) característico dos isoprenoides.	13
Figura 5 - Estrutura química do licopeno evidenciando as unidades isoprénicas ...	14
Figura 6 - Grupos terminais da cadeia carbonada presentes nas estruturas químicas de carotenoides.	14
Figura 7 - Estruturas químicas de carotenoides: (a) licopeno (b) β -caroteno; (c) luteína.	15
Figura 8 - Representação da estrutura química de um flavonoide.	19
Figura 9 - (a) Estrutura básica dos pigmentos de uma antocianina com a numeração dos átomos de carbono, (b) Grupos substituintes.	20
Figura 10 - Estrutura da cianidina como exemplo de uma antocianidina..	21
Figura 11 - Ácidos comuns que se ligam às antocianinas glicosadas: (a) ácido malónico, (b) ácido <i>p</i> -cumárico.	21
Figura 12 - Estrutura química da antocianina <i>delfinidina-3-malonilglucosídeo-5-</i> <i>glucosídeo</i>	22
Figura 13 - A delfinidina-3-galactosídeo e os produtos da sua hidrólise: a delfinidina (antocianidina) e a galactose.	22
Figura 14 - - Transformação estrutural de antocianinas: pelargonidina 3-glucosídeo em solução aquosa a diferentes valores de pH. (a) catião flavílio (cor vermelha), (b), (c) e (d) - bases quinoidais (cor azul), (e) – pseudobase ou carbinol (incolor) e (f) – pseudobase chalcona (incolor ou levemente amarela) (pH >7).....	23
Figura 15 - Antocianinas dão cor rosa, magenta e púrpura a (a) <i>Pelargonium</i> (pelargonidina), (b) <i>Antirrhinum majus</i> (cianidina) e (c) <i>Petunia híbrida</i> (delfinidina e petunidina).	24
Figura 16 - Classificação geral dos métodos cromatográficos em função da natureza das fases móvel e estacionária.	30

Figura 17 - Formas dos grânulos de amido de diferentes origens vegetais.	33
Figura 18 - Fotomicrografia de grânulos de amido de batata.	33
Figura 19 - Estrutura química da amilose.	34
Figura 20 - Estrutura química da amilopectina.	34
Figura 21 - Esquema de um grânulo de amido de batata: estrutura de anéis de crescimento cristalinos e amorfos, em camadas alternadas. As zonas de crescimento cristalino são subdivididas em camadas concêntricas de lamelas cristalinas e amorfas, alternadamente (imagem à direita). ..	35
Figura 22 - Secção transversal de um tomate de dois lóculos.	42
Figura 23 - Resíduo sólido de tomate após extração com éter petróleo 40-60°C, sem desidratação.	45
Figura 24 - Extração dos pigmentos do tomate com éter de petróleo 40-60°C: (a) sem desidratação prévia; (b) após desidratação com etanol.	47
Figura 25 - Etapas da desidratação do tomate: (1) adição de Na ₂ SO ₄ (2) adição de amido.	49
Figura 26 - Etapas da extração de pigmentos do tomate após desidratação: (3) acetona, (4) éter de petróleo 40-60°C (1:1), (5) extrato líquido após filtração.	49
Figura 27 - Extrato sólido obtido por tratamento do tomate com Na ₂ SO ₄ e amido....	50
Figura 28 - Frações de pigmentos do tomate eluídas da coluna C ₁₈ : (a) Frações com carotenoides amarelos; (b) Frações com licopeno.	54
Figura 29 - Frações eluídas em seringa de 100 mL (Tabela 12 b), com etanol (f ₁ , f ₂ e f ₃) e éter de petróleo 40-60°C (f ₄ , f ₅ e f ₆).	56
Figura 30 - Cromatograma das frações 1, 5 e 6, da figura 29, obtido em câmara de etanol.	56
Figura 31 - Cromatogramas revelados com vapores de amoníaco. Extratos líquidos de: (1) folha de faia vermelha, (2) tagetes, (3) amores-perfeitos em câmaras: (a) BAW e (b) EtOH/vinagre (1:1).	64
Figura 32 - Cromatogramas revelados com vapores de amoníaco. Extratos de: (4) rosas, (5) petúnias e (6) lantanas, em câmaras (a) Ep/Ac (90:10); (b) BAW; (c) EtOH/vinagre (1:1)..	65

Figura 33 - Cromatogramas revelados com vapores de amoníaco. Extratos de (7) Tagetes, (8) Lantanas e (9) Dálias amarelas, em câmaras (a) EP/Ac; (b) BAW; (c) EtOH/vinagre (1:1).....	67
Figura 34 - (a) Frações de pigmentos de pétalas de rosas bourdeux (C _{F5}); (b) Cromatograma em câmara BAW das frações de acetona e acetona/água (1:1); (c) Cromatograma com vapores de NH ₃ e luz UV.	73
Figura 35 - Testes colorimétricos ácido-base das frações de pigmentos eluídas da coluna de rosas vermelho bourdeux.	73
Figura 36 - Frações de pigmentos de amores-perfeitos eluídas em seringa de 100 mL (C _{F9}): Ep (f ₁ e f ₂), Ep/Ac (90:10) (f ₁ ,f ₂ e f ₃), Ep/Ac (75: 25) (f ₁), AcOEt(f ₁), AcOEt/Ac (75:25), Ac (f ₁ e f ₂), H ₂ O(f ₁).	76
Figura 37 - Frações de pigmentos de amores-perfeitos eluídas em seringa 100 mL (C _{F9}). EP (f ₁ ,f ₂ ,f ₃ e f ₄), EP/Ac (90:10) (f ₁ ,f ₂ e f ₃), EP/Ac(75:25) (f ₁ ,f ₂), EP/Ac(1:1), EP/Ac (25:75) (f ₁ ,f ₂), Ac, Ac/água (1:1) (f ₁ ,f ₂ e f ₃).	78
Figura 38 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações de pigmentos eluídos da coluna de amores-perfeitos com EP/Ac (75:25) e EP/Ac (25:75).	78
Figura 39 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações de pigmentos eluídos com acetona e acetona/H ₂ O (1:1).....	79
Figura 40 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações de pigmentos de petúnias eluídas com acetona e acetona/H ₂ O (1:1) (C _{F10}).	80
Figura 41 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações incolores eluídas da coluna de petúnias, na presença de uma base forte, NaOH 1,5 M.	81
Figura 42 - (a) Frações de pigmentos de pétalas de tagetes eluídas em seringa 100 mL (C _{F11}): EP (f ₁ ,f ₂), EP/Ac (90:10) (f ₁ ,f ₂ ,f ₃), EP/Ac (75:25) (f ₁ ,f ₂), EP/Ac (25:75) (f ₁ ,f ₂ ,f ₃), Ac (f ₁ ,f ₂ ,f ₃), Ac/H ₂ O (1:1) (f ₁ ,f ₂ ,f ₃) (b) Cromatograma em câmara BAW das frações: Ep/Ac (25:5), Ac (f ₁), Ac/H ₂ O (1:1) (f ₂ ,f ₃).	83

Figura 43 - Testes colorimétricos ácido-base: frações eluídas da coluna de tagetes(C _{F11}): (a) Ac, (b) Ac/H ₂ O (1:1), na presença de: 1- HCl 0,75 M; 2 – NaOH 1,5 M.	83
Figura 44 - Frações de pigmentos de pétalas de lantanas eluídas em seringa 100 mL (C _{F12}); EP (f ₁ ,f ₂ ,f ₃), EP/Ac (90:10) (f ₁ ,f ₂), EP/Ac (75:25) (f ₁ ,f ₂), EP/Ac (25:75) (f ₁ ,f ₂), Ac (f ₁ ,f ₂), Ac/H ₂ O (1:1) (f ₁ ,f ₂ ,f ₃).....	85

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Conteúdo de licopeno em frutas e vegetais.	16
Tabela 2 - Estruturas de antocianidinas comuns a partir do catião flavílio.	20
Tabela 3 - Série eluotrópica	36
Tabela 4 - Distribuição dos carotenoides presentes no tomate.....	43
Tabela 5 - Ensaio preliminares de extração, realizados diretamente sobre o concentrado de tomate.	46
Tabela 6 - Ensaio de extração, realizados sobre o resíduo de tomate obtido por desidratação com etanol.	47
Tabela 7 - Extração dos pigmentos do tomate na presença de agentes desidratantes.	48
Tabela 8 - Extratos líquidos de cenoura (C) e do tomate (T); cromatogramas obtidos em câmaras de: (1) Etanol; (2) Éter de petróleo 40-60°C /acetona (90:10).....	51
Tabela 9 - Eluição dos pigmentos do extrato sólido de tomate em seringas de 50 mL.	52
Tabela 10 - Cromatografia em coluna, realizada em quatro seringas de 50 mL: Pigmentos amarelos eluídos com diferentes proporções de etanol/acetona.....	54
Tabela 11 - Cromatografia em coluna de um extrato de tomate, realizada em seringas de 50 e 100 mL.	55
Tabela 12 - Cromatografia em seringa de 100 mL com diferentes alturas de fase estacionária: (a) C _{T9} , 25 g; (b) C _{T10} , 15 g.	56
Tabela 13 - Flores e extratos brutos líquidos.	58

Tabela 14 - Resultados obtidos na cromatografia em papel a partir de extratos de pétalas de rosas.	61
Tabela 15 - Cromatograma de um extrato líquido de dalias amarelas com nervuras castanhas eluído com quatro eluentes diferentes.....	62
Tabela 16 - Cromatogramas de extratos líquidos de: (1) Folha de faia vermelha, (2) Tagetes, (3) Amor-perfeito. Câmaras: EP/Ac (90:10); BAW, EtOH/Vinagre (1:1).	63
Tabela 17 - Cromatogramas de extratos líquidos de flores: (4) Rosas, (5) Petúnias, (6) Lantanas. Câmaras: EP/Ac (90:10); BAW; EtOH/Vinagre (1:1). ..	65
Tabela 18 - Cromatogramas de extratos líquidos de flores: (7) Tagetes, (8) Lantanas amarelo-avermelhada, (9) Dalias amarelas. Câmaras: EP/Ac (90:10); BAW; EtOH/Vinagre (1:1).	66
Tabela 19 - Resultados obtidos na CP de extratos de flores e classes de pigmentos atribuídas.	67
Tabela 20 - Eluição de pigmentos de rosa amarelo-avermelhadas ^{a,b} em seringa de 50 mL (C _{F1}).	69
Tabela 21 - Eluição de pigmentos de rosas amarelo-avermelhadas ^{a,b} ; coluna em seringa de 50 mL (C _{F2}).	69
Tabela 22 - Eluição de pigmentos de rosas vermelho bourdeux ^{a,b} em seringa de 50 mL (C _{F3})	70
Tabela 23 - Frações de pigmentos de rosas vermelho bourdeux eluídas em seringa de 50 mL (C _{F4}). Testes colorimétricos ácido-base	71
Tabela 24 - Eluição de pigmentos de rosas vermelho bourdeux ^{a,b} , em seringa de 100 mL (C _{F5}).	72
Tabela 25 - Eluição de pigmentos de rosas vermelho bourdeux em seringa de 100 mL (C _{F5}).	72
Tabela 26 - Eluição dos pigmentos de um extrato de amores-perfeitos ^{a,b} em seringa de 100 mL (C _{F6} e C _{F7}).	74
Tabela 27- Eluição de pigmentos de um extrato sólido de amores-perfeitos ^{a,b} em seringa de 100 mL (C _{F8})	75
Tabela 28 - Bandas de pigmentos de pétalas de amores-perfeitos em seringa de 100 mL (C _{F8})	75

Tabela 29- Testes colorimétricos ácido-base das frações eluídas da coluna de amores-perfeitos (C _{F8}).	76
Tabela 30 - Eluição dos pigmentos de um extrato de amores-perfeitos ^{a,b} em seringa de 100 mL(C _{F9}).	77
Tabela 31 - Bandas de pigmentos de pétalas de amores-perfeitos em seringa de 100 mL (C _{F9})	78
Tabela 32 - Eluição de pigmentos de um extrato sólido de petúnias ^{a,b} em seringa de 100 mL (C _{F10})	79
Tabela 33 - Eluição dos pigmentos de petúnias em seringas de 100 mL (C _{F10}).	80
Tabela 34 - Eluição de pigmentos de um extrato sólido de tagetes ^{a,b} , em seringa de 100 mL (C _{F11}).	82
Tabela 35 - Eluição de pigmentos de tagetes em seringa de 100 mL (C _{F11}).	82
Tabela 36 - Eluição de pigmentos do extrato de lantanas amarelo-avermelhadas ^{a,b} , em seringa de 100 mL (C _{F12}).	84
Tabela 37 - Frações de pigmentos de lantanas eluídas em seringa 100 mL(C _{F12}).	85

CAPÍTULO I

Introdução

A Química é uma ciência complexa cujo estudo ou aproximação será mais interessante e facilitado se for realizado a partir das interações quotidianas dos alunos. Desde muito cedo que se ouve jovens estudantes dizer que as ciências são muito difíceis e com pouca utilidade para o seu saber, tentando, desde logo, amputar a sua natural e espontânea curiosidade e até mesmo a capacidade de se surpreenderem. A motivação dos alunos é um aspeto essencial para a sua aprendizagem e requer que continuamente, a par com a teoria, o professor capte a sua atenção e desperte o seu sentido crítico, revelando o verdadeiro prazer da ciência que é a experimentação.¹

A aprendizagem deve ser vista como um acumular progressivo de conhecimentos, alicerces que se constroem ao longo da vida. A forma como as crianças e jovens aprendem ciências implica que, desde cedo, se envolvam em situações práticas e experimentais que proporcionem a possibilidade de desenvolverem a curiosidade e o rigor, de distinguirem o verdadeiro do falso, de aprenderem com alegria e de se exprimirem corretamente.² Preparam-se para a abordagem posterior, a um nível cognitivo e conceptual mais profundo, na medida em que se podem tornar mais observadoras, mais perspicazes, e com maior capacidade para a discussão e conexão entre as observações e os conceitos químicos aprendidos, requerendo estes uma certa maturidade intelectual, assim como um vocabulário e linguagem próprios.³ Estas vivências prematuras têm grande impacto na decisão dos alunos que, mais tarde, irão acabar por prosseguir estudos na área das ciências.^{3,4}

É também preciso desmistificar e ensinar a química dentro de uma perspetiva de sustentabilidade ambiental passando uma imagem diferente da que lhe tem sido atribuída. A imagem da ciência que causa medo ou que se deva evitar, ora porque é difícil, ora porque a ela se deve a criação da bomba atômica, das drogas, ou das alterações climáticas, deve dar lugar à ciência que contribuiu para a melhoria da qualidade de vida dos biliões de habitantes deste planeta. A contribuição da química para a vida das pessoas no século XXI continuará a ter um largo alcance e a envolver uma grande variedade de modos de atividade positivos. No entanto, para satisfazer este papel, é da maior importância que a química e a tecnologia química sejam seguras, úteis e desfrutem da confiança das pessoas.⁵

Em Portugal, verificou-se um decréscimo na procura de cursos relacionados com a química e a inversão deste sentido está a ser trabalhada, não só pelas universidades, como também pela Sociedade Portuguesa de Química. Estas instituições tentam, através de ações nas escolas e nas universidades, despertar a atenção dos jovens, motivando-os e mostrando-lhes para que serve esta ciência. A química está presente em tudo e, ao relacioná-la com a indústria ou com outras áreas

intervenientes, descobrem-se possíveis alternativas futuras. Acima de tudo, é necessário ultrapassar o caráter negativo que lhe é dado.⁶

Com o trabalho aqui desenvolvido pretende-se inculcar nos alunos a valorização e o interesse pela química, apresentando atividades que, através da manipulação, levem à aquisição das competências e conhecimentos necessários de uma forma lúdica e responsável.

Assim, propõe-se delinear procedimentos laboratoriais na área dos pigmentos naturais com recurso a técnicas de cromatografia que utilizam adsorventes comuns e solventes que sejam menos nocivos; realçar a importância da realização do trabalho experimental baseado na sustentabilidade e preservação do meio ambiente, integrando os conceitos da Química Verde (QV) e da segurança laboratorial; adaptar as atividades, em termos de tempo e materiais, aos currículos vigentes no ensino Básico e Secundário.

1. A Química Verde

A Química Verde nasceu no início da década de noventa (1990), nos EUA, através do Programa “Vias Sintéticas Alternativas para Prevenção da Poluição”, com o objetivo de explorar o desenvolvimento de novos produtos e processos químicos, ou melhorar os já existentes, de forma a torná-los menos nocivos para o ambiente e para a saúde humana. Num sentido mais lato, importava reduzir a poluição na síntese de compostos químicos.⁷

Os problemas ambientais, tais como o buraco do ozono, as alterações climáticas, a introdução de poluentes orgânicos nos ecossistemas ou a poluição dos oceanos são alguns exemplos familiares de que a química esteve mal, já que andou um século a poluir o ambiente.⁷

A QV surgiu como uma mudança de filosofia que minimiza o risco, reduzindo ou eliminando "o uso ou a geração de substâncias perigosas na conceção, fabrico e aplicação de produtos químicos".^{8,9}

Durante toda a década de noventa, nos EUA e em países como a Inglaterra, Alemanha, Itália e Austrália, surgem organismos e ações que premeiam o desenvolvimento de inovações tecnológicas, para implementação nos diversos setores de produção industrial, e que reduzem a produção de resíduos poluentes e tóxicos.

Em 1997, nos EUA, surge o Instituto da Química Verde (*The Green Chemistry Institute, GCI*) que tem sido um grande promotor do conceito e das práticas da QV em todo o mundo, através da pesquisa, educação, conferências, simpósios, encontros e divulgação de informações.^{7,10} No ano 2000, a American Chemical Society (ACS) estabelece uma aliança com o GCI, instituindo a QV

como prioridade de pesquisa nacional, conciliando os interesses políticos, empresariais e da comunidade científica. Neste âmbito foram introduzidas regulamentações que limitam a poluição e a exposição a substâncias/materiais perigosos.⁷

Os objetivos da QV foram adotados internacionalmente por diversos organismos e iniciativas, quer governamentais, quer diretamente ligados à educação e à pesquisa na área da química, engenharia e indústria, conjugando-se assim o desenvolvimento humano e económico e a proteção do ambiente.

O conceito de Química Verde é descrito pelas mãos de alguns cientistas, seus pioneiros, nomeadamente Paul Anastas e John Warner, através de uma estratégia global de Doze Princípios que induzem, no seu todo, ao caminho da sustentabilidade.^{7,11} Os Primeiros Doze Princípios, fundamentais na implementação da QV na investigação, indústria ou ensino são:

1. Prevenção

Evitar a formação de resíduos tóxicos é economicamente mais rentável do que eliminar a sua toxicidade através de tratamentos à posteriori.

2. Economia atómica

Os processos sintéticos devem ser planificados de modo a que as substâncias finais possam incorporar o maior número de átomos possível.

3. Sínteses menos perigosas

Desenvolver métodos sintéticos que levem ao uso ou produção de substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade para o Homem ou para o ambiente.

4. Planificação de produtos mais seguros

Os produtos químicos devem ser desenvolvidos a nível molecular de forma a executar as funções para as quais são destinados e a minimizar a sua toxicidade.

5. Solventes e substâncias auxiliares seguras

Sempre que possível, evitar o uso de substâncias auxiliares e solventes (agentes purificantes, secantes, etc). Quando utilizados devem ser inócuos e reutilizáveis.

6. Planificação para conseguir eficiência energética

Planear e minimizar os impactos económicos e ambientais dos requisitos energéticos dos processos químicos. Procurar realizar os processos químicos sintéticos à temperatura e pressão ambientais.

7. Utilização de matérias-primas renováveis

Deve ser sempre considerado o uso de matérias-primas e recursos renováveis em detrimento das não renováveis.

8. Redução das derivatizações

Devem-se minimizar ou evitar o uso de etapas com agentes intermédios, como grupos bloqueadores de proteção/desproteção ou de modificações temporárias na molécula para permitir processos físicos/químicos. Tais etapas requerem reagentes adicionais e podem produzir resíduos.

9. Catálise

Devem ser escolhidos, preferencialmente, reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) a reagentes estequiométricos.

10. Produtos degradáveis

A conceção molecular de produtos químicos deve favorecer a sua rápida e inócua bio decomposição, após o seu uso.

11. Observação direta na prevenção da poluição em tempo real

Os processos de fabrico devem ser diretamente monitorizados em tempo real, de forma a evitar ou controlar a formação de substâncias tóxicas.

12. A Química segura previne os acidentes

Prevenir a ocorrência de acidentes, tais como fugas, explosões e incêndios, na laboração ou na utilização de substâncias químicas é usá-las de forma prudente e responsável.

Desde finais da última década do séc. XX que o interesse crescente, a nível internacional, no uso da QV se tornou numa alternativa às práticas industriais do “poluir e depois limpar”, vigentes nos países em desenvolvimento. A conceção de produtos químicos e processos ambientalmente benignos deveria ser uma imposição para a redução dos impactos negativos para a saúde humana e para o meio ambiente, na medida em que, o desenvolvimento sustentável passa por criar mecanismos que permitam o crescimento da população sem sacrificar o seu bem-estar ou a qualidade do ambiente.^{7,12} Nesse sentido, na primeira Conferência sobre Química Verde e Sustentável, decorrida em Tóquio no ano de 2003, foi proposta uma mudança na designação da QV para Química Verde e Sustentável, patente na chamada “Declaração de Tóquio 2003”, fazendo sobressair o desenvolvimento sustentável em todos os campos da atividade humana e realçando a importância da Química e da Engenharia Química.⁷

1.1. As Dificuldades na Aplicação da Química Verde e os Segundos Doze Princípios da QV

Passados trinta anos, a implementação dos Princípios da QV tem seguido várias vertentes já que os seus objetivos atingem diferentes áreas, mas aquela que mais relevância tem tido diz respeito à substituição de substâncias perigosas por outras que sejam menos nocivas. Apesar do interesse na questão, tem-se verificado que os perigos potenciais que as substâncias químicas apresentam são de tal complexidade, que acabam por limitar a exequibilidade das mudanças pretendidas.¹³

A aplicação de cada um dos doze pressupostos da QV não tem sido assim tão linear. A história mostra que, para uma tecnologia ter sucesso, não pode depender apenas da sua sustentabilidade, mas deve ter, também, consistência para os seus tradicionais seguidores.¹⁴

Segundo **Machado (2008)**, a aplicação dos princípios da QV na formação de novos compostos e reações químicas, por exemplo, não são tão verdes quanto são publicitados. Apesar de se verificar o cumprimento de um dos princípios da QV, outros são ignorados, ou mesmo afetados negativamente. Os exemplos analisados mostraram que um aumento da verdura num dado aspeto de um composto ou reação química resultante da aplicação de um ou mais destes princípios não significa, necessariamente, que o composto ou processo de síntese seja globalmente mais sustentável, pois pode implicar que outros tenham sido violados, sem que o investigador se aperceba disso, ou seja, de forma não intencional.¹⁴

Os chamados Segundos Doze Princípios da QV (**Winterton, 2001**), talvez não tão divulgados como os primeiros, apelam à obtenção de vias de síntese de compostos químicos mais inovadoras e sustentáveis, onde se dê mais importância à verdura das reações químicas, concretizando assim os objetivos da QV e facilitando o processo de fabrico verde, tornando-o mais rápido e eficaz.¹⁴

Os Segundos Doze Princípios da QV são descritos por **Machado (2008)**:

13 – Identificar e quantificar os coprodutos (subprodutos eventuais e resíduos).

Identificar os coprodutos e determinar as suas quantidades relativamente à do produto principal.

14 - Obter conversões, seletividades, produtividades, etc.

Para além do rendimento químico das reações de síntese, determinar métricas relevantes para a QV: seletividades, produtividades (eficiência atômica e similares).

15 – Estabelecer balanços materiais completos para o processo.

Especificar, quantificar e contabilizar todos os materiais usados na obtenção do produto final, incluindo os auxiliares, nomeadamente os solventes.

16 - Determinar as perdas de catalisadores e solventes nos efluentes.

Determinar as quantidades ou caudais dos fluxos de efluentes líquidos, sólidos, e gasosos e as concentrações de reagentes auxiliares neles.

17- Investigar a termoquímica básica do processo.

Avaliar e relatar as variações de entalpia das reações exotérmicas para alertar sobre eventuais problemas de libertação de calor com a mudança de escala.

18 – Considerar limitações de transferência de calor e de massa.

Identificar fatores que afetem a transferência de calor e de massa no escalamento (velocidade de agitação ou de dispersão de gases, área de contacto gás-líquido, etc.).

19 – Visualizar as reações sob a perspetiva dos engenheiros químicos.

Identificar e compreender pontos de constricção para o escalamento da química no desenvolvimento do processo industrial por estudo das várias alternativas de tecnologia disponíveis para o implementar e contactos com engenheiros químicos.

20 – Considerar a globalidade do processo industrial ao selecionar a química de base.

Avaliar o impacto das alternativas possíveis de todas as variáveis de processo (matérias primas, natureza do reator, operações de separação, etc.) nas opções possíveis para a química de base. Realizar experiências com os reagentes comerciais que vão ser utilizados no fabrico.

21 – Ajudar a desenvolver e aplicar medidas de sustentabilidade do processo.

Avaliar quantitativamente, na extensão possível, o grau de sustentabilidade do processo industrial (atividade ainda incipiente, mas com futuro).¹⁴

1.2. A Química Verde e a Educação

A importância da Educação Sustentável foi reconhecida pelas Nações Unidas (ONU) ao declarar a década 2005-2014 como a “Década da Educação para o Desenvolvimento Sustentável”, procurando integrar os princípios, valores e práticas de desenvolvimento sustentável em todos os aspetos de educação e aprendizagem, abordando as questões sociais, económicas, culturais e ambientais que enfrentamos no séc XXI.¹⁵

A incorporação de um pensamento sustentável desde a criação ao desenvolvimento experimental de projetos e materiais é uma das ferramentas chave na Educação. Educando futuros cientistas e cidadãos com base na química verde e sustentável, poder-se-á tornar a educação relevante para o mundo de hoje e criar uma mentalidade sustentável nas gerações futuras.⁸

A investigação, implementação e o ensino dos pressupostos da QV permitirá que a ciência e a tecnologia química do futuro sejam compatíveis com o ambiente e a vida e não continuem a provocar problemas do tipo dos que emergiram no século XX. Este ensino deve, sobretudo, incutir nos alunos novas maneiras de pensar e executar, sendo fundamental a ideia de que se tem de atender a objetivos múltiplos, baseados nos Doze Princípios da QV.⁷

A QV não é considerada como uma disciplina em si, mas sim uma abordagem para conduzir a ciência de uma forma responsável, garantindo que as gerações futuras não sejam comprometidas pelas ações de hoje.¹⁶ Os estudantes de hoje e os cientistas de amanhã irão beneficiar significativamente com a introdução dos Princípios da QV no currículo das disciplinas das ciências experimentais. Os alunos entrarão no mundo profissional com o conhecimento das fraquezas dos atuais processos industriais, e a motivação para o desenvolvimento de soluções baseadas nos princípios da QV.¹⁶

Deve-se continuar a potenciar a conjugação de esforços e pontes entre a química e a engenharia no desenvolvimento de debates em torno das preocupações ambientais e energéticas. Aumentar a comunicação e consciencialização entre químicos, engenheiros, governantes e cidadãos conduzirá a uma maior responsabilização pelas questões ambientais e globais.

O desenvolvimento bem-sucedido de tecnologias no âmbito da QV está a par da inovação a nível molecular. As dificuldades em enfrentar estes desafios centram-se, sobretudo, na forma como os programas da química académica e das ciências dos materiais os enfrentam, verificando-se a existência de inúmeras lacunas no ensino das técnicas que os ajudem a projetar produtos sustentáveis. A necessidade de utilização de reagentes mais benignos, nomeadamente a diminuição do uso de solventes orgânicos e o acompanhamento da evolução do *design* de novas tecnologias e produtos, são alguns pontos de partida onde se pode abordar a importância da QV para, desse modo, incutir nos alunos perspetivas mais sustentáveis, responsáveis e menos egoístas.

O trabalho realizado pelos diferentes níveis de ensino deve ser conjunto, em especial no ensino universitário, no sentido de procurar e encontrar caminhos que integrem os princípios da QV nos seus currículos. Assim, no futuro, a grande maioria dos cientistas, ou mesmo todos, terão a preparação adequada e as organizações que adotarem a QV levarão vantagem competitiva.¹⁷

Em Portugal, os programas curriculares propostos em 2014 no programa de Física e Química A do Ensino Secundário (11.º ano), realçam a componente laboratorial e a introdução no currículo de pressupostos da QV:

“A enorme utilidade da química no mundo atual aponta para um futuro sustentável em áreas vitais para a sociedade (energia, recursos naturais, saúde, alimentação, novos materiais, entre outros) através de avanços significativos na síntese química, na química analítica, na química computacional, na química biológica e na tecnologia química. Estes aspetos devem, por isso, ser valorizados, procurando-se que os alunos reconheçam algumas aplicações e outros resultados de investigação que tenham impacto na sociedade e no ambiente.

A economia atómica deve surgir no contexto da QV para realçar que, no caso das reações químicas, é possível introduzir modificações que visam economizar energia e/ou átomos e aumentar o rendimento e a seletividade de um dado processo. Podendo estes aspetos serem debatidos com os alunos do ponto de vista da sustentabilidade.”¹⁸

Uma análise recente, realizada por **Duarte *et al* (2019)** e intitulada “O tratamento da Economia Atómica no programa e manuais do ensino secundário”, revela que, e citando, “o tema foi introduzido de uma maneira insuficientemente detalhada na proposta de programa, difusa e errónea, ignorando, por exemplo, que o termo economia atómica é usado para designar quer um conceito, quer uma métrica de vedura material, e que a metrificação da vedura material das reações de síntese requer outras métricas.”¹⁹

Apesar da abordagem sugerida no programa curricular para este nível de ensino (11.º ano) e, de forma implícita, no Perfil do Aluno para o século XXI, na realidade ainda não foi introduzida a componente pedagógica, baseada nos princípios da QV, principalmente no que diz respeito à área da segurança nos laboratórios.¹³ Segundo **Machado (2018)**, a nível do ensino secundário, o ensino da QV poderá realizar-se por via da incorporação de uma cultura de segurança laboratorial. A exploração e discussão de cada um dos Doze Princípios da QV conduzirá os alunos ao estabelecimento intuitivo de uma importante relação entre a QV e a segurança laboratorial.²⁰

A esta deficiente abordagem, acresce que, de uma forma geral, os professores não têm formação na área da QV nem conhecimento de ofertas de formação nessa mesma área, havendo necessidade urgente de colmatar esta falha. Caso os docentes possuam o saber, a preocupação e o interesse necessários, o tema QV pode facilmente ser introduzido desde o 7.º até ao 12.º ano de escolaridade, dado que é um tema transversal a muitos conteúdos da química.

2. A Química dos Pigmentos: Pigmentos Naturais de Origem Vegetal

O mundo colorido deve-se, maioritariamente, às plantas, uma vez que estas são os principais produtores de pigmentos. Os pigmentos vegetais estão presentes nas folhas, frutas, vegetais, flores, nos fungos e bactérias, assim como em outras estruturas de animais, nomeadamente a pele e os olhos.²¹

Além dos pigmentos naturais, existem também aqueles que são sinteticamente produzidos em laboratório. Qualquer que seja a sua origem, eles estão presentes na medicina, na alimentação, roupas, cosméticos entre outros produtos/atividades.

Para além da sua beleza, os pigmentos naturais têm uma importância vital na nossa vida, sem os quais, provavelmente, esta não seria possível. Como poderia existir a fotossíntese sem as clorofilas ou os carotenoides? Nos animais, como poderia o oxigénio ou o dióxido de carbono ser transportado sem hemoglobina ou mioglobina? É conhecida a importância das quinonas na conversão da luz em energia química; o efeito de tela protetora da melanina no homem e outros vertebrados; a fotoproteção dos olhos pelo betacaroteno; a atividade farmacológica de alguns pigmentos, nomeadamente na prevenção do cancro, tal como o licopeno ou o betacaroteno, devido ao seu efeito antioxidante.²¹

A cor das flores é tradicionalmente vista como uma forma das plantas atraírem polinizadores pensando-se, inclusive, que há diferentes preferências de cor por diferentes polinizadores, dado que o seu espetro de visão também varia. ²² Para além disso, a polinização e as alterações dos níveis de néctar disponíveis pelas flores estão diretamente associadas às suas mudanças bruscas de cor.²²

A cor atrai os animais para que estes comam os frutos maduros, promovendo assim a dispersão das suas sementes. A cor pode ser ainda uma medida da toxicidade de alguns tecidos, podendo incluir-se, neste caso, os frutos ainda não amadurecidos. O contraste de cor com o fundo verde da vegetação serve também para atrair os insetos polinizadores.

Nas células das plantas superiores, os pigmentos fotossintéticos ocorrem nas estruturas especializadas chamadas cloroplastos (**Figura 1**). Os pigmentos não envolvidos na fotossíntese estão normalmente localizados nos vacúolos, estruturas celulares que também servem de local de armazenamento de água e nutrientes.

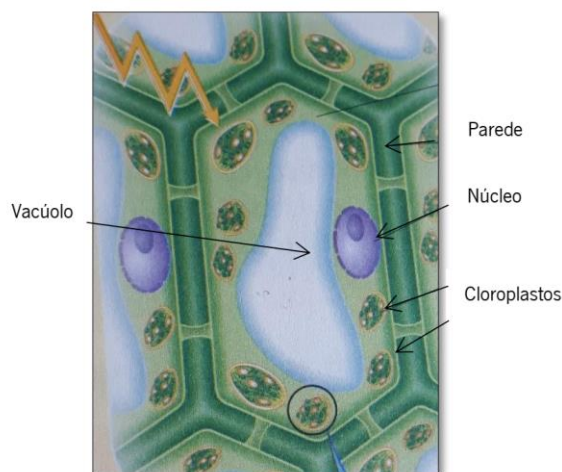


Figura 1: Estrutura de uma célula vegetal.²³

As plantas, normalmente, produzem a cor através da síntese de pigmentos que absorvem luz em diferentes comprimentos de onda do espectro visível, sendo a cor percebida por nós determinada pela luz refletida.²²

A cor observada é devida a uma estrutura específica da molécula, chamada cromóforo que, ao captar energia, promove a excitação de um elétron de uma orbital externa para outra de energia mais elevada. A energia não absorvida é refletida e/ou refratada para o olho que a transmite ao cérebro, através de impulsos nervosos, podendo estes interpretá-los como cor.²¹

Os animais possuem fotorreceptores diferentes dos do homem e podem obter os efeitos de preto e branco absorvendo ou refletindo luz na gama de comprimentos de onda visível.²²

2.1. Classificação dos Pigmentos

Os pigmentos naturais de origem vegetal podem ser classificados em função das suas características químicas, em:

- Compostos heterocíclicos com uma estrutura tetrapirrólica, como as *clorofilas*;
- Isoprenóides ou terpenóides, como os *carotenóides* ou as *quinonas*;
- Compostos heterocíclicos, com anéis aromáticos e grupos substituintes hidroxilo (compostos fenólicos), como os *flavonóides*;
- Compostos nitrogenados, como as *betalainas*.

No presente trabalho dar-se-á relevo aos pigmentos das famílias carotenóides e flavonóides.

2.1.1. Carotenoides

Os carotenoides, derivados dos isoprenóides ou terpenóides, são biossintetizados por todas as plantas fotossintéticas, protistas e bactérias heterotróficas, alguns fungos e alguns invertebrados.²⁴ São encontrados nos frutos vermelhos, amarelos e alaranjados e nos vegetais, como flores, raízes, sementes e folhas verdes mais escuras (**Figura 2**). Também contribuem para a cor de insetos, animais marinhos e pássaros.^{21,25}



Figura 2 - Fontes naturais de carotenoides.²⁶

Nas plantas superiores os carotenoides estão acumulados nos cloroplastos das plantas verdes, onde ocorrem na sua forma livre não esterificada como misturas. Nas folhas verdes estes encontram-se sempre associados à clorofila, pigmento de cor verde em conteúdo elevado que acaba por encobrir a cor dos carotenoides, observando-se os amarelos característicos quando as folhas envelhecem e as clorofilas se degradam.

O mesmo acontece durante o amadurecimento das frutas, quando a cor verde dá lugar aos amarelos, laranjas e vermelhos dos carotenoides.

Nas flores foram identificados mais de 40 pigmentos exclusivos de pétalas e este número ascende aos 70 pigmentos nos frutos.²¹ As flores de cor laranja forte podem conter licopeno, as de cor laranja mais ténue podem ter betacaroteno e as flores amarelas (**Figura 3**) podem conter xantofilas com elevado grau de grupos oxigenados.²²

Mais de 750 carotenoides foram identificados na natureza, contudo, apenas 50 estão presentes na dieta humana. Os mamíferos, incluindo os seres humanos, não têm a capacidade de sintetizar diretamente nenhum dos carotenoides, mas podem modificar os carotenoides presentes nas plantas ingeridas através da alimentação. Embora se saiba que algumas bactérias os possam sintetizar, a microflora da maioria dos animais (com exceção dos ruminantes) ocorre na parte distal do trato digestivo, onde a absorção dos carotenoides é quase inexistente. Todos os carotenoides encontrados nos tecidos de mamíferos são, portanto, derivados de fontes dietéticas.²⁷

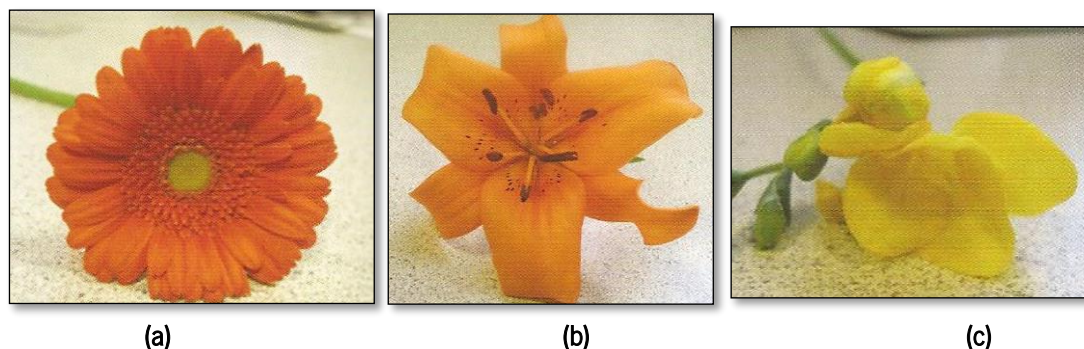


Figura 3: Carotenoides dão cor amarela e laranja a: (a) *Gerbera hybrida*; (b) *Lilium*; (c) *Freesia*.²²

2.1.1.1. Estrutura Química de Carotenoides

Os carotenoides podem ser divididos quimicamente em duas grandes classes:

- Os carotenoides formados apenas por hidrocarbonetos insaturados, denominados **carotenos**, tais como o **licopeno**, **alfacaroteno** e o **betacaroteno**.

Nestes carotenoides, as cadeias carbonadas presentes numa ou em ambas as extremidades da molécula podem ser lineares ou cíclicas e não apresentam oxigénios.

- Os carotenoides oxigenados, denominados **xantofilas**, são constituídos por um ou mais grupos funcionais com átomos de oxigénio nos anéis terminais da cadeia, tal como a **luteína** ou a **criptoxantina**.^{24,25}

Os carotenoides são substâncias compostas por 40 átomos de carbono (C_{40}) (tetraterpenos) em estruturas formadas por 8 unidades isoprenoides (**Figuras 4 e 5**), cuja ordem é invertida no centro da molécula (C_5).²⁶ O sistema extenso de ligações duplas conjugadas confere aos carotenoides cores que se estendem do amarelo ao vermelho (licopeno) (380 nm até aos 500 nm).

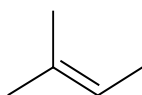


Figura 4 - Grupo isopreno (ip) característico dos isoprenoides.²¹

Todos os carotenoides podem ser considerados derivados do licopeno (**Figura 5**) ($C_{40}H_{56}$), um carotenoide não cíclico que contém onze ligações duplas conjugadas, dispostas linearmente, e constituído apenas por carbono e hidrogénio.

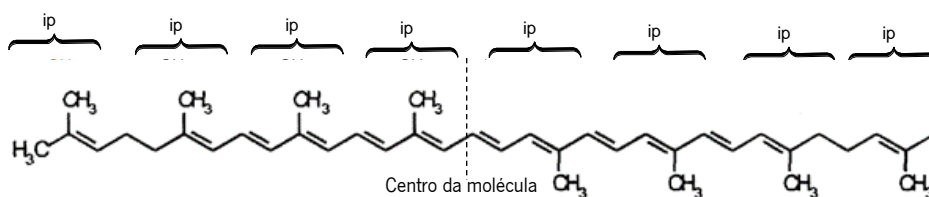


Figura 5 - Estrutura química do licopeno, evidenciando as unidades isoprénicas.²¹

As diversas estruturas dos carotenoides são obtidas através de sistemas complexos de reações químicas, que incluem reações de ciclização, hidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo e isomerização ou a combinação destes processos.²¹

Os carotenoides podem ser lineares, como o licopeno (**Figuras 5 e 7a**), ou podem ter um anel numa das extremidades da cadeia (**Figura 6**), como o γ -caroteno, ou em ambas as extremidades como o α -caroteno, β -caroteno, luteína (**Figura 7 b,c**) ou a β -criptoxantina.²⁴

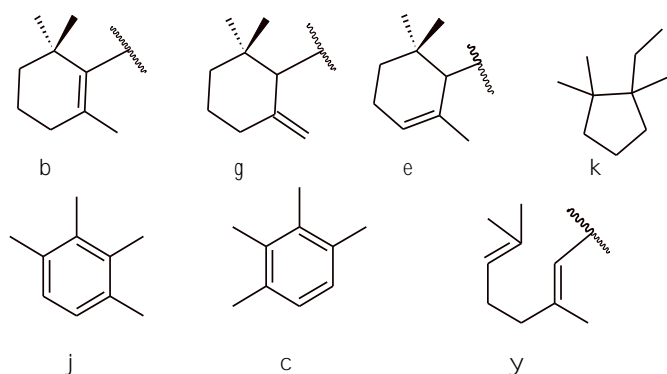


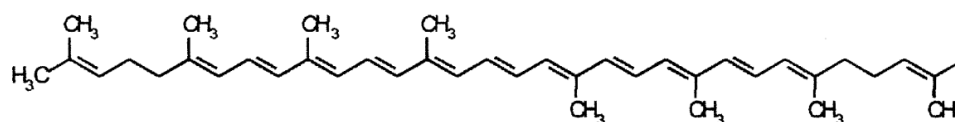
Figura 6 – Grupos terminais da cadeia carbonada presentes na estrutura química de carotenoides.

O espectro de absorção de uma molécula de um dado carotenoide é determinado pelo seu sistema poliénico conjugado e restantes características estruturais. Cada ligação dupla conjugada aumenta o comprimento de onda máximo de absorção em 7 a 35 nm.²²

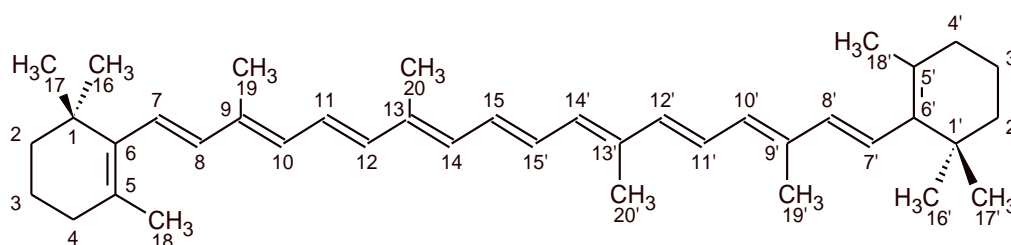
O **betacaroteno** (**Figura 7b**) é o carotenoide responsável, por exemplo, pela cor laranja das cenouras ou da abóbora. A deslocalização dos seus eletrões, fracamente ligados, permite-lhe

serem excitados por luz de energia relativamente baixa, absorvendo na zona do azul e chegando aos nossos olhos com a cor laranja.

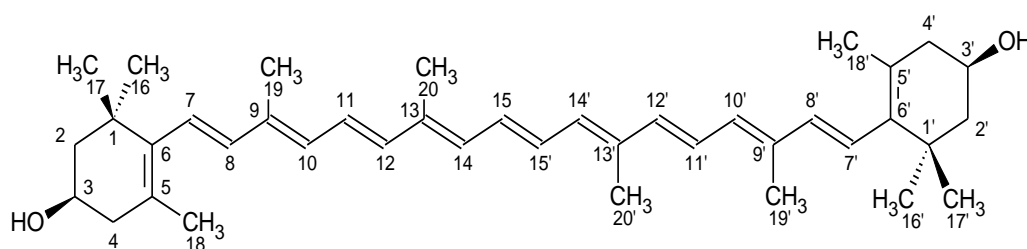
Pode ainda ser encontrado em muitos outros vegetais como a batata-doce e mesmo em legumes verdes como os espinafres, couves ou brócolos. Também está presente em diversas frutas como manga, damasco e melão e mesmo em produtos de origem animal como a gema de ovo.



(a)



(b)



(c)

Figura 7 - Estruturas químicas de carotenoides: (a) licopeno; (b) β -caroteno; (c) luteína.^{24,25}

O betacaroteno apresenta atividade antioxidante e é considerado um agente anticancerígeno, ajudando a prevenir o cancro e outras doenças. Depois de ingerido é convertido no nosso corpo em vitamina A e, por essa razão, é conhecido como precursor da vitamina A ou provitamina A. Esta é uma vitamina multifuncional com um papel chave em muitos processos fisiológicos, como por exemplo, visão, reprodução, crescimento embrionário, diferenciação celular e função cerebral.²⁴ O betacaroteno é considerado a principal fonte dietética da vitamina A no corpo humano.²⁹

O **licopeno** é o pigmento natural mais difundido e é responsável pela cor vermelha de muitas variedades de frutos, nomeadamente, tomate, laranja, papaia, goiaba e melancia (**Tabela 1**).

A sua estrutura química (**Figura 7a**) é a de um hidrocarboneto tetraterpénico, com treze ligações duplas carbono-carbono, onze das quais conjugadas. O elevado grau de conjugação faz com que seja um dos antioxidantes naturais mais importantes.^{30,31}

Tabela 1 - Conteúdo de licopeno em frutas e vegetais.²⁵

Material	Licopeno (mg/100 g base húmida)
Tomate fresco	0,72 – 20
Melancia	2,3 – 7,2
Goiaba (rosa)	5,23 – 5,50
Toranja (rosa)	0,35 – 3,36
Papaia	0,11 – 5,3
Cenoura	0,65 – 0,78

O licopeno é comercialmente disponibilizado na forma de extrato de tomate, ou em pó obtido através da síntese química. O licopeno natural é produzido, principalmente, por extração e concentração da polpa de tomate cultivado especificamente para esse fim. Embora seja muito caro, as tendências de mercado apontam para uma resposta crescente do licopeno natural devido não só à sua origem, mas também à presença de outros pigmentos, tais como, betacaroteno, fitoeno e o fitoflueno, que se acredita, atuarem sinergeticamente com o licopeno.³²

2.1.1.2. Função dos Carotenoides / Papel na Saúde Humana

A cor que os carotenoides proporcionam às flores, frutos, sementes e algumas algas, tem um papel importante na reprodução dado que atraem insetos/animais que dispersam os polens, sementes e esporos, tal como já foi referido.

Têm também funções no processo de fotossíntese assessorando as clorofilas na absorção de luz e exercendo um papel de fotoproteção contra os danos oxidativos.²¹ Nos mamíferos são precursores da vitamina A e nos peixes são essenciais nas respostas fototrópicas (reação a estímulos luminosos).

A biodisponibilidade dos carotenoides presentes nas frutas, legumes e verduras é diferente, sendo esta afetada pelas características do próprio alimento e sua matriz, pela relação

tempo/temperatura, processamento dos alimentos, tipos de carotenoides (as xantofilas apresentam uma biodisponibilidade superior aos carotenos), interações com outros carotenoides, processos de absorção, metabolismo e/ou transporte dos carotenóides.²⁴

Estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em frutas e verduras estão associadas a uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas, embora a prova definitiva de que suplementos antioxidantes possam prevenir estas doenças não tenha sido obtida ou consistentemente suportada pelos testes de intervenção encontrados na literatura. Assim, apesar de não haver prova científica definitiva, é prudente e aconselhável, em termos de saúde pública, aumentar o consumo de alimentos vegetais e seguir uma dieta similar à denominada “dieta do Mediterrâneo”. O efeito protetor desses alimentos tem sido atribuído, em parte, à presença de compostos antioxidantes, de entre os quais se destacam o betacaroteno, vitamina C e vitamina E, além dos compostos fenólicos. Para além destes, também estão presentes na dieta humana o alfacaroteno, a luteína, a betacriptoxantina, a zeaxantina e o licopeno. A quantidade de licopeno presente no sangue tem-se mostrado inversamente proporcional à incidência do tumor da próstata e, por essa razão, é altamente procurado pelas indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética.³¹

O termo antioxidante tem natureza multiconceptual. No entanto, de maneira geral, ‘antioxidante’ pode ser definido como uma família heterogénea de moléculas naturais, que quando estão presentes em baixas concentrações relativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo.²⁹

Nos antioxidantes naturais de baixo peso molecular (antioxidantes “químicos”) devem incluir-se algumas vitaminas (C, E e A), carotenoides, flavonoides, outros polifenóis, furanoides e tiois.²⁹

A melhor estratégia nutricional para promover a saúde e reduzir o risco de doenças crônicas é a obtenção de nutrientes de uma grande variedade de alimentos.

2.1.1.3. *Extração de Carotenoides*

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis e, normalmente, são extraídos com solventes orgânicos como o clorofórmio, hexano, acetona, benzeno ou éter de petróleo.²⁵

No caso específico do licopeno, por ser muito hidrofóbico, é um pigmento muito insolúvel em água, etanol e metanol. As ligações duplas conjugadas tornam o pigmento instável e sensível à luz, calor, oxigénio e ácidos. Assim, a sua extração em laboratório deve ser realizada em atmosfera inerte e baixa luminosidade, devendo evitar-se o aquecimento das soluções. Para evitar a sua

oxidação e isomerização durante o processo de extração, podem ser utilizados antioxidantes (quinol) e /ou agentes neutralizantes, como por exemplo o carbonato de cálcio.

Depois da extração, alguns autores recomendam fazer a saponificação para a remoção de outros lípidos não desejáveis, clorofilas ou impurezas, uma vez que, em geral, o licopeno é estável em meio alcalino. A purificação das frações obtidas pode ser realizada através de cristalizações fracionadas com éter de petróleo ou acetona, a baixa temperatura.²⁵

2.1.2. Flavonoides

Os flavonoides constituem a classe mais importante de pigmentos florais de plantas fenólicas. São compostos de baixo peso molecular largamente distribuídos nas folhas, sementes e pétalas. Protegem as plantas contra a radiação ultravioleta, agentes patogênicos e predadores, e atuam como agentes antioxidantes e quelantes de metais.³³

As flores possuem diferentes classes de flavonoides que atuam, fundamentalmente, como pigmentos e copigmentos, contribuindo para as diferentes cores das pétalas. São normalmente encontrados nos vacúolos das células das plantas verdes superiores não havendo, no entanto, evidências de participação direta na fotossíntese. É conhecido o seu papel na regulação dos genes das plantas e no metabolismo de crescimento.³⁴

2.1.2.1. *Estrutura Química de Flavonoides*

Quimicamente, os flavonoides são caracterizados pela presença de uma estrutura comum constituída por dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico (C6-C3-C6) que determinam o núcleo flavânico (**Figura 8**).

Os dois anéis aromáticos A e B possuem um ou mais grupos hidroxilo, ligados frequentemente nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5', podendo ser metilados, acilados ou sulfatados, obtendo-se assim uma grande diversidade destes compostos. Quando se formam os flavonoides glicosilados, as ligações glicosídicas encontram-se normalmente nas posições 3, 5 ou 7.^{22,34}

A unidade C (C3), pode surgir na natureza em cadeia aberta (chalconas e di-hidrochalconas) ou na forma de um anel heterocíclico de pirano (antocianinas, flavanonas, flavonas e flavonois).

As di-hidrochalconas e as flavanonas são menos comuns relativamente às flavonas e flavonois.

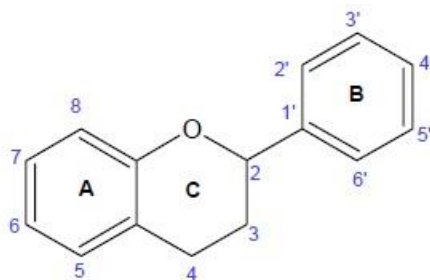


Figura 8 - Representação da estrutura química de um flavonoide.

Os sistemas aromáticos conjugados levam a uma intensa absorção na região ultravioleta e visível do espectro, na zona de comprimentos de onda de 250 a 270 nm, 330 a 350 nm e 520 a 550 nm.^{21,22}

Estudos realizados mostram que os resultados benéficos dos flavonoides para a saúde são atribuídos ao seu poder antioxidante e quelante, tendo demonstrado uma capacidade particular para inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) levando a efeitos cardioprotetores.³³

2.1.2.2. Antocianinas

As antocianinas (do Grego *anthos*, flor; *Kyanos*, azul), terminologia usada inicialmente para descrever o pigmento azul da *Centaurea cyanus*, representam, juntamente com os carotenoides, a maior classe de pigmentos do reino vegetal.³⁵ Encontram-se largamente distribuídas em raízes, caules, folhas, flores e frutos de plantas superiores.

Constituem o maior grupo de flavonoides e são responsáveis pela diversidade de cores do reino das plantas, como por exemplo, maçãs, amoras, rabanetes, beringelas, uvas e morangos, sendo também generalizada a sua presença como corante vermelho nos sumos de frutos, vinho e geleias.³⁶

As antocianinas formam o grupo mais importante de pigmentos de fácil incorporação em meio aquoso, tornando interessante o seu uso como corantes naturais solúveis em água.⁴ São visíveis ao olho humano pelo facto de absorverem a luz na região visível do espectro, proporcionando uma ampla gama de cores que vão desde o laranja brilhante, vermelho, carmim, malva, magenta, púrpura, roxo e azul, dependendo das condições do meio onde se encontram, nomeadamente, pH, luz, temperatura, copigmentação e a presença de oxigénio.³⁷

As antocianidinas são derivados poli-hidroxiladas e/ou polimetoxiladas do catião flavílio (**Figura 9**), que tomam a designação de antocianina quando um ou mais grupos hidroxilo formam ligações glicosídicas com unidades de açúcar.

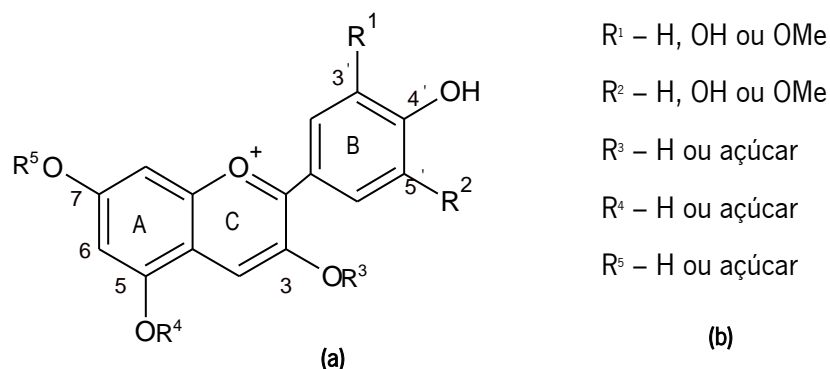


Figura 9 - (a) Estrutura básica de antocianinas com a indicação da numeração dos átomos de carbono; (b) Grupos substituintes.³⁸

Das 17 antocianidinas conhecidas, apenas 6 (**Tabela 2**) são identificadas em plantas superiores: *Pelargonidina* (*Pg*), *Peonidina* (*Pn*), *Cianidina* (*Cy*, **Figura 10**), *Malvidina* (*Mv*), *Petunidina* (*Pt*) e *Delfinidina* (*Dp*).³⁹ Estas seis principais antocianidinas derivam do catião flavílio por adição de grupos substituintes hidroxilo, e metilação destes hidroxilos, nas posições 3' e 5' do anel B, possuindo todas um grupo OH na posição 4'.^{36,38}

Tabela 2 - Estruturas de antocianidinas comuns a partir do catião flavílio.^{21,38,40}

Antocianidina	Estruturas das antocianidinas naturais		Cor visível	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (em MeOH:HCl)
	R ¹	R ²		
Pelargonidina	H	H	Vermelho, laranja, salmão	520
Cianidina	OH	H	Magenta, carmesim	535
Peonidina	OMe	H	Magenta	532
Delfinidina	OH	OH	Purpura, azul, malva	546
Petunidina	OMe	OH	Purpura	543
Malvinidina	OMe	OMe	Purpura	542

Os grupos hidroxilo livres, nas posições 5,7 e 4' são essenciais para a formação da cor dos pigmentos de flores e frutos

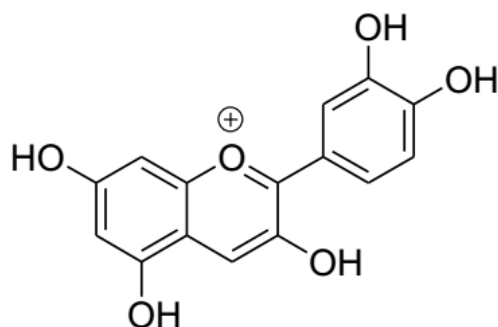


Figura 10 - Estrutura da cianidina como exemplo de uma antocianidina.

As antocianinas diferem entre si, não só pelo número de grupos hidroxilo e/ou metoxilos presentes nos três anéis, mas também pela natureza, número e posição de açúcares ligados à estrutura e pela natureza e número de ácidos aromáticos ou alifáticos ligados à molécula de açúcar (**Figura 12**).³⁹

As classes mais importantes de glicosídeos são os 3-monoglicosídeos e os 3,5-diglicosídeos e ainda, menos frequentemente, os 3,7-diglicosídeos. Os açúcares presentes são, principalmente, moléculas de glucose, galactose, ramnose e arabinose.

A par da adição das moléculas de açúcar, ocorre frequentemente a adição de grupos acilo: ácidos aromáticos, como o ácido *para*-cumárico, cafeico ou ferúlico (ácidos hidroxicinâmicos) ou os ácidos alifáticos, como o ácido acético, oxálico ou malónico (**Figura 11**). Pode ocorrer a acilação aromática e alifática na mesma molécula, formando-se estruturas poliaciladas.^{36,40}



Figura 11 - Ácidos comuns que se ligam às antocianinas glicosadas:(a) ácido malónico;(b) Ácido *p*-cumárico.⁴⁰

As antocianidinas glicosadas (antocianinas) mais comuns na natureza são a *cianidina*, a *delfinidina* e a *pelargonidina*, sendo as antocianinas 3-glucosídeo mais difundidas do que as antocianinas 3,5-diglicosídeo ou 3,7-diglicosídeo.³⁹ A estrutura química da figura 12 é um exemplo

de uma antocianina diglicosilada, com uma molécula de ácido malónico ligada pela unidade de glucose do carbono-3 da antocianina.

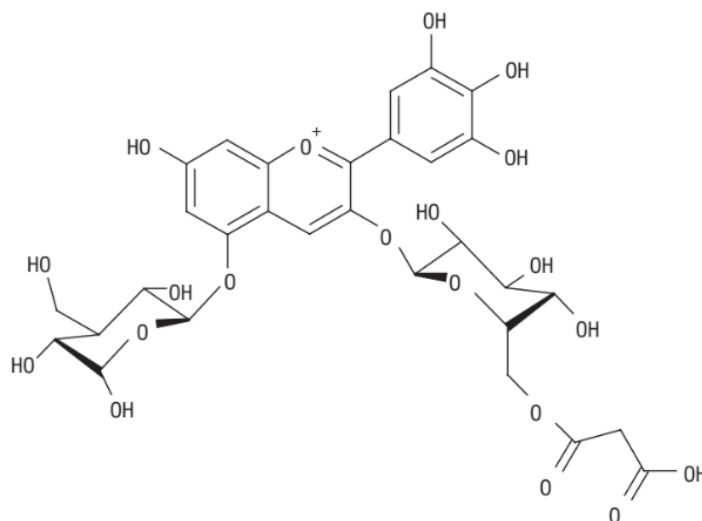


Figura 12 - Estrutura química da antocianina *delphinidina-3-malonilglucosideo-5-glucosideo*.⁴⁰

As antocianinas podem sofrer hidrólise ácida para se transformarem na sua correspondente antocianidina (**Figura 13**).

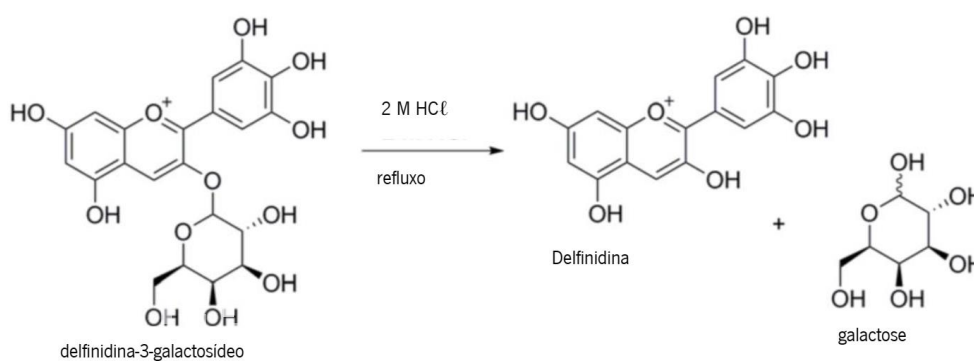


Figura 13 – A delphinidina-3-galactosideo e os produtos da sua hidrólise: a delphinidina (antocianidina) e a galactose.³⁸

Em geral, as antocianidinas são menos solúveis comparativamente ao seu glicosideo.⁴⁰

As antocianinas são sensíveis às variações de pH, as quais afetam diretamente a cor e a sua estabilidade química, potenciando o seu uso como indicadores ácido-base naturais.

A maior parte das antocianinas ocorrem em meio aquoso como uma mistura de quatro espécies moleculares em equilíbrio, o catião flavílio (AH^+) e as estruturas secundárias: a base anidra quinoidal (azul), a pseudobase carbinol (incolor) e a chalcona (incolor ou levemente amarela) (Figura 14).^{37,40}

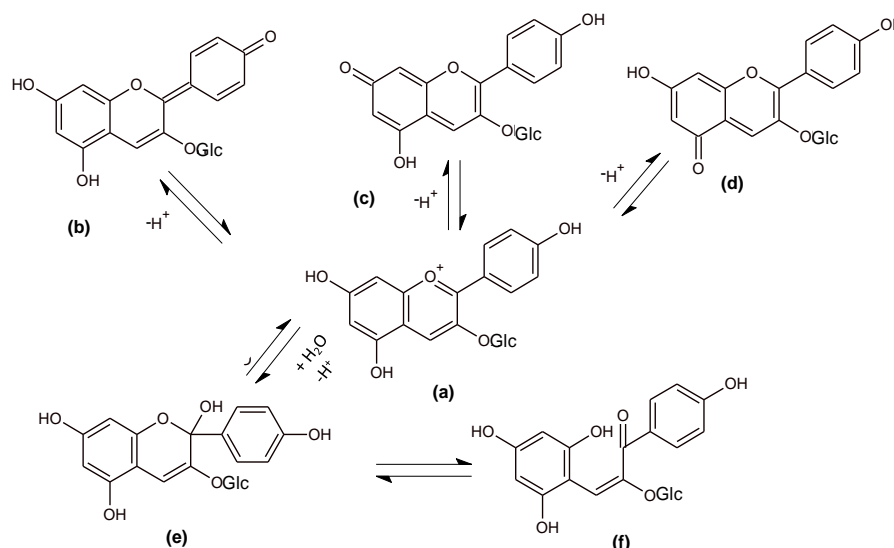


Figura 14 – Transformação estrutural de antocianinas: pelargonidina 3-glucosídeo em solução aquosa a diferentes valores de pH. (a) catião flavílio (cor vermelha); (b), (c), (d) bases quinoidais (cor azul); (e) pseudobase carbinol (incolor); (f) pseudobase chalcona (incolor ou levemente amarela) (pH >7).³⁶

Em soluções ácidas (pH < 2), a estrutura química dominante é o catião flavílio, de cor vermelha (Figura 14, a). Com o aumento do valor de pH, ocorre uma rápida desprotonação do catião flavílio e há o deslocamento do equilíbrio para três possíveis estruturas quinoidais de cor azul (Figura 14 b, c ou d).^{37,40}

O catião flavílio (a) sofre hidratação, normalmente no C-2, para gerar uma pseudobase carbinol (e) que sofre a abertura do anel pirano por aumento adicional de pH (pH > 7) para dar uma chalcona (f). Esta conversão pode levar à destruição da antocianina.⁴⁰ Assim, em solução aquosa, a hidratação do catião flavílio leva ao desaparecimento da cor e ao estabelecimento de um equilíbrio entre as formas carbinol e a chalcona (Figura 14; e, f). À temperatura ambiente e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbinol e chalcona poderá ser muito lento. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da chalcona.^{36,37}

2.1.2.3. A Copigmentação de Flavonoides/Antocianinas

A copigmentação é um fenómeno que leva à alteração ou intensificação da cor dos pigmentos. Os copigmentos são em geral incolores, mas quando presentes em soluções antociânicas levam a interações que produzem efeitos hiperacrômicos ou desvios batocrômicos no espectro de absorção (UV-Vis). Os copigmentos podem ser, por exemplo, flavonoides, alcaloides, metais, ácidos orgânicos ou outras antocianinas.³⁵

As flavonas, flavonois e seus glicosídeos apresentam cores que variam do branco ao amarelo e diferem das antocianinas pela presença de um grupo carbonilo em C-4. A principal diferença entre estes dois tipos de pigmentos é a presença do grupo OH no C-3 dos flavonois.⁴¹ As flavonas, que podem apresentar uma cor que vai do amarelo pálido ao amarelo brilhante, e os flavonois, que são incolores ou amarelo pálido, podem atuar como copigmentos das antocianinas. No caso dos flavonois, estes podem alterar a cor final da flor pelo facto de serem amarelos e de se misturarem com o vermelho das antocianinas, resultando um tom alaranjado. Os complexos formados com os flavonois absorvem fortemente luz na região ultravioleta, podendo aparecer coloridos para os insetos que possam ver nesta zona do espectro. Por outro lado, os flavonois podem competir com as antocianinas durante o processo de síntese, diminuindo a concentração final das antocianinas.²² Assim, as antocianinas coloridas (**Figura 15**) presentes nas pétalas encontram-se, quase invariavelmente, acompanhadas pelos incolores flavonois e flavonas, que funcionam como copigmentos, sendo, por isso, essenciais para a cor que apresentam, para além de as protegerem contra a degradação.³⁷

A maioria das delphinidinas glicosídeas são de cor malva e, em geral, a mudança para a cor azul requer a presença de flavonas como copigmentos e, ocasionalmente, de um ou mais catiões metálicos.³⁶

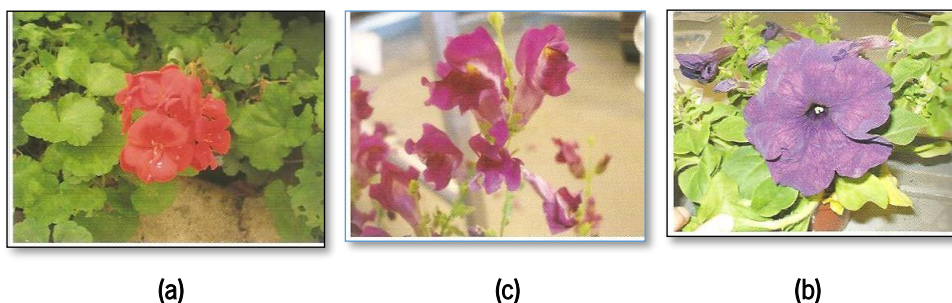


Figura 15 - Antocianinas dão cor rosa, magenta e púrpura a (a) *Pelargonium* (pelargonidina); (b) *Antirrhinum majus* (cianidina) e (c) *Petunia híbrida* (delfinidina e petunidina).²²

Para além da copigmentação e da variação do pH do meio, outros fatores podem contribuir para a menor estabilidade das antocianinas, levando à sua degradação, nomeadamente, a presença de luz intensa, temperatura superior a 25 °C, a presença de metais e do oxigénio molecular.³⁶

2.1.2.4. Extração e Separação de Flavonoides e Antocianinas

Dentro das várias classes de flavonoides as antocianinas são de fácil identificação por serem coloridas ao contrário dos flavonoides incolores.

Um aspeto preliminar importante na extração dos flavonoides é a seleção dos solventes. Esta tem de ser feita de acordo com as propriedades do(s) soluto(s) que se pretende(m) extrair.

Assim, agliconas mais polares ou flavonoides glicosilados, normalmente estáveis, podem ser extraídos a partir da planta seca e moída, a frio ou a quente, com álcoois puros, ou em misturas água/álcool, como por exemplo água/metanol ou água/etanol, ou ainda em misturas de álcool/acetona (1:5 a 1:1). Se a planta for fresca a quantidade de água pode ser reduzida (1:5).^{42,43}

Para a extração das antocianinas, realiza-se repetidamente a trituração e maceração em metanol ou etanol na presença de pequenas quantidades de ácido clorídrico (HCl) (0-10%) e à temperatura ambiente. Devido à toxicidade do metanol, o etanol é o solvente preferido. A utilização de uma elevada concentração de ácido clorídrico pode levar à degradação do pigmento. Esta degradação pode evitar-se com a adição de ácidos mais fracos como o ácido acético, cítrico ou tartárico. Em algumas plantas também pode ser considerada a adição de água (10-50%) para extração completa.^{37,42} Verificou-se experimentalmente que a extração com água sulfurada (1000 ppm SO₂) foi mais eficiente que a extração com a mistura de etanol, ácido acético e água porque, possivelmente, as antocianinas interagem com os iões HSO₃⁻ da solução, aumentando a solubilidade e difusão das antocianinas através da parede celular.³⁷

A acetona também pode ser utilizada como solvente de extração. Em comparação com o método do metanol acidificado, a acetona possibilita maior eficiência e uma extração mais reprodutível.³⁹

2.2. Extração e Separação de Pigmentos – Trabalhos Direcionados Para o Ensino

Os trabalhos publicados na área dos pigmentos naturais são muito centrados na extração dos pigmentos para fins comerciais e mostram que esta é uma área de interesse crescente para as indústrias alimentar e da saúde, no entanto, são limitados os trabalhos publicados no âmbito da extração e separação cromatográfica de pigmentos de pétalas e frutos, com finalidades didáticas.

A extração e separação das clorofilas e carotenoides presentes em folhas verdes constitui a atividade didática mais descrita por diversos autores,⁴⁴⁻⁵¹ mas são ainda poucos os trabalhos desenvolvidos no âmbito da extração e separação cromatográfica de carotenoides e flavonoides, para levar a cabo em sala de aula.

Goodrich *et al.* (1992)⁵² propõem a realização de uma experiência em microescala para a separação e análise dos carotenoides betacaroteno e licopeno do concentrado de tomate. A separação foi realizada através de uma coluna de cromatografia utilizando a alumina como fase estacionária e a análise foi realizada por espectrofotometria de UV-VIS. Nesta atividade, uma amostra de pasta de tomate foi extraída com uma mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (50:50). Os extratos líquidos obtidos, após filtração, foram combinados e lavados seguidamente com soluções de cloreto de sódio, carbonato de potássio e água. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e, após concentração sobre vácuo, o extrato foi aplicado numa coluna de cromatografia previamente empacotada com alumina, a seco ou macerada numa mistura de éter de petróleo/acetona 40-60 °C (99:1). O betacaroteno foi eluído da coluna com a mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (99:1) e a eluição do licopeno ocorreu com os mesmos solventes, na proporção 90:10.

Silveira & Evans (1995)⁵³ aplicaram a cromatografia *Flash* à separação de licopeno e betacaroteno da papa de cenoura e da pasta de tomate. Este método é apresentado como uma alternativa ao método clássico da cromatografia em coluna, na medida em que prevê a diminuição do tempo necessário à realização de todo o processo e uma menor decomposição dos carotenoides, dado que ficam menos sujeitos à exposição prolongada à luz, oxigénio, solventes e adsorventes. Nesta atividade, fez-se uma desidratação prévia da mistura da papa de cenoura para bebé e da pasta de tomate por maceração da suspensão em etanol a 95% durante, pelo menos, 5 minutos. Após eliminação do etanol, através de uma filtração a vácuo, o resíduo espremido e seco foi extraído com diclorometano sob refluxo. Em seguida, o solvente foi recuperado através da filtração a vácuo e a amostra foi submetida de novo à extração. O processo repetiu-se mais duas vezes. Após a lavagem das fases orgânicas resultantes com a salmoura e secagem com sulfato de sódio anidro, a solução foi filtrada e seca em evaporador rotativo. O resíduo solubilizado em éter de petróleo de baixo ponto de ebulição foi guardado em local escuro.

Para o empacotamento da cromatografia em flash, a fase estacionária utilizada foi a alumina lavada com ácido e éter de petróleo sob pressurização com ar comprimido, e o eluente foi depois recolhido e reutilizado. Após a aplicação da amostra, o betacaroteno foi eluído com uma mistura

de 2% de diclorometano em éter de petróleo 30-60 °C. A fração do licopeno foi eluída com diclorometano puro.

Okumura *et al* (2002)⁵⁴, baseados no procedimento de Harborne, realizaram a extração de pigmentos a partir de pequenas quantidades de flores por imersão e maceração numa solução etanólica de HCl (1 %) durante 40 minutos a 80 °C e evaporaram o solvente à temperatura ambiente. Para maiores quantidades, é recomendada a extração em etanol, durante 48 h, e a remoção do solvente sob vácuo. Este procedimento leva à hidrólise dos açúcares, obtendo-se as antocianidinas. Para obtenção das antocianinas, a extração deve ser realizada com metanol, sem ácido e sem aquecimento. O eluente utilizado na câmara de cromatografia, para o desenvolvimento dos cromatogramas, foi a mistura BAW [butanol, ácido acético, água (4:1:5)].

Jie Zhu *et al* (2008)⁵⁵ desenvolveram um método de extração que consideram ser ambientalmente benigno, extraindo o licopeno do molho de tomate sem recurso a solventes orgânicos. Utilizam um surfactante, CPS (do inglês, copolímero de *n*-butylacrylate, styrene e acrylic acid), preparado na forma de emulsão, à qual se juntou o molho de tomate. A mistura é colocada num balão de fundo redondo, equipado com um condensador e um controlador de ebulição, e é refluxada em banho de óleo a 120 °C durante 30 min. Arrefece-se a mistura até à temperatura ambiente e remove-se o resíduo sólido através de uma filtração a pressão reduzida. O filtrado é acidificado com ácido fosfórico (85%) até pH=1. O precipitado rosa de licopeno é removido através de uma filtração por gravidade. O filtrado pode ser reutilizado de novo como emulsão, através de uma alcalinização com uma solução de hidróxido de sódio até pH=9.

Miller & Vaughan (2009)³² propõem a exploração da estabilidade do licopeno através de uma experiência laboratorial preparada para alunos de 13 ou 14 anos, a realizar em 2 ou 3 sessões experimentais, sendo cada sessão de cerca de 3 h. A extração dos carotenoides é realizada sobre o tomate fresco (ou em pasta), lavado e cortado em pedaços pequenos. É levado a um homogeneizador de tecidos celulares e, de seguida, extraído com 2 volumes de clorofórmio. Após 15 minutos é feita uma filtração a vácuo (se for usada pasta de tomate e se a massa do extrato de material for inferior a 300 g poderá ser usada uma centrifugação a baixa velocidade). Leva-se o extrato a secar em evaporador rotativo e o resíduo resultante é dividido em 3 porções para a análise em HPLC e para o estudo da influência da luz sobre os carotenoides.

Dias e Ferreira (2015)⁵⁶ apresentaram uma abordagem simples e ecológica capaz de separar clorofilas, carotenoides e flavonoides de folhas frescas, verdes e vermelhas, de *Stromanthe sanguinea*. Investigaram a utilização de adsorventes não tóxicos para aplicação em técnicas de

cromatografia em coluna e em papel, como por exemplo, o amido de batata, e a utilização de solventes menos nocivos, todos materiais de uso do cotidiano. Na preparação do extrato cortaram folhas frescas em pequenos fragmentos e esmagaram num almofariz com um pilão. A extração dos pigmentos foi obtida por maceração em acetona e, após filtração, o extrato bruto foi tratado com um agente exsiccante (sulfato de sódio anidro ou cloreto de sódio). Após eliminação do sal por filtração, adicionaram fécula de batata comercial a uma porção da solução filtrada e verificou-se a evaporação completa da acetona ao fim de cerca de 5-10 minutos. Para a separação dos pigmentos, o extrato sólido obtido foi aplicado diretamente numa coluna constituída por uma seringa descartável de 20 mL, empacotada com fécula de batata até cerca de 3/4 da sua capacidade. Após a pré-eluição da coluna com éter de petróleo, colocaram o extrato sobre a parte superior da fécula e procederam à eluição com uma série de misturas de solventes orgânicos de polaridade crescente (série eluotrópica). O éter de petróleo 40-60 °C eluiu o betacaroteno; as misturas éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10 e 75:25) separam as xantofilas e clorofilas a e b; e o etanol deslocou as antocianinas presentes. A composição do extrato líquido foi analisada através da cromatografia em papel, usando como fase móvel uma mistura de éter de petróleo 40-60 °C e acetona (90:10).

3. Separação e Identificação de Pigmentos por Técnicas de Cromatografia

3.1. Princípio da Cromatografia

Os métodos cromatográficos são largamente aplicados na separação e identificação de pigmentos. Cromatografia em papel (CP), em camada fina (TLC), em coluna aberta (CC) e de elevado desempenho (HPLC), por exemplo, são técnicas de aplicação comum.

As técnicas de cromatografia foram desenvolvidas para análise e separação de um vasto e variado número de componentes orgânicos e inorgânicos. Para além de identificar a presença ou ausência de compostos, elementos ou iões numa amostra (análise qualitativa), permite também fazer a determinação quantitativa da composição química de uma mistura.⁵⁷

É uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas.

Os princípios básicos da cromatografia baseiam-se nas diferentes tendências que os componentes de uma mistura apresentam para serem adsorvidos numa superfície, ou dissolvidos num solvente.⁵⁸ A separação cromatográfica resulta da partição dos componentes de uma mistura entre duas fases, a fase estacionária, mantida em geral numa posição fixa, e a fase móvel que se move

através desta, numa dada direção. As propriedades destas duas fases determinam a sua interação com os constituintes da mistura e são a base da separação.⁵⁹

A migração diferencial dos componentes que surge do movimento dos solutos entre as fases móvel e estacionária, depende das propriedades físico-químicas das substâncias e do sistema cromatográfico. Este movimento é governado por interações reversíveis delicadas determinadas pela polaridade dos solutos, natureza da fase estacionária e solubilidade das moléculas nas duas fases. A massa molecular, a geometria e tamanho das partículas, são também alguns dos fatores que irão influenciar a distribuição dos solutos entre a fase móvel e a fase estacionária.⁶⁰

3.2. Classificação dos Métodos Cromatográficos

De entre as várias classificações existentes para os métodos cromatográficos, a classificação que diz respeito à natureza da fase móvel assume maior importância. Assim, o nome do método cromatográfico pode ser definido como *cromatografia gasosa* ou *cromatografia líquida*, consoante a fase móvel seja gasosa ou líquida (**Figura 16**).

Cada um destes métodos pode ainda ser dividido de acordo com a natureza da fase estacionária. Se a fase estacionária sólida tem propriedades de adsorção é chamada de *cromatografia de adsorção* e se a fase estacionária é um líquido suportado numa matriz inerte o processo é denominado *cromatografia de partição*.⁶⁰

A cromatografia também pode ser classificada em função do suporte da fase estacionária. Assim, e no que diz respeito à *cromatografia líquida*, esta pode ser realizada em:

- *Coluna*: a fase estacionária é empacotada numa coluna de vidro, plástico ou metal, chamada coluna de cromatografia, ao longo da qual o fluxo de solventes é levado a cabo por simples interação gravítica (*cromatografia de baixa pressão ou cromatografia líquida clássica*), ou por ação de uma força mais intensa gerada por uma bomba (*cromatografia de alta pressão ou cromatografia líquida de alta precisão*).
- *Planar*: a fase estacionária presente numa folha de material celulósico, como o papel (*cromatografia em papel*) ou numa camada adsorvente, fina, espalhada numa folha de vidro, plástico ou alumínio (*cromatografia em camada fina*).⁵⁷

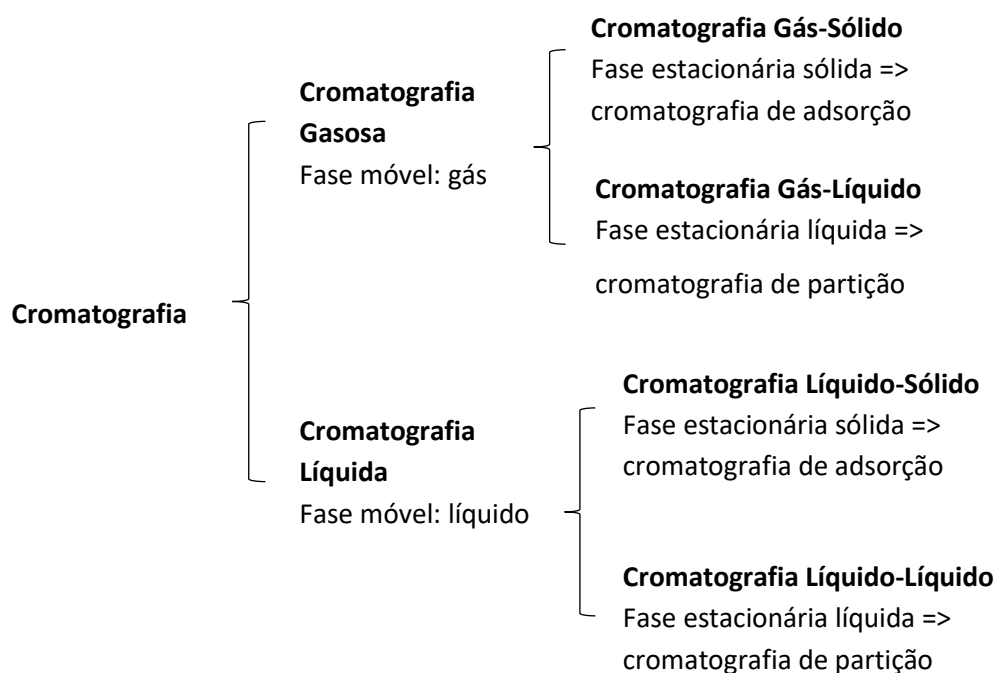


Figura 16 - Classificação geral dos métodos cromatográficos em função da natureza das fases móvel e estacionária (adaptado).⁶⁰

A classificação também pode ser uma referência à forma como a fase móvel flui. Neste caso, incluem-se a cromatografia a uma e a duas dimensões e a cromatografia radial.⁶⁰

Tal como já foi referido, as separações cromatográficas dependem das interações entre os componentes da amostra, a fase estacionária e a fase móvel. Dependendo do tipo de interações que possam ocorrer entre os solutos e a fase estacionária, estabelecem-se aqueles a que se chamam modos ou mecanismo de separação que, por si mesmos, podem formar uma base de classificação: cromatografia de *adsorção*, *partição*, *permuta iónica*, *permeação em gel*, *exclusão molecular ou afinidade*.⁵⁷

Finalmente, a técnica cromatográfica pode ser classificada de acordo com a forma de introduzir a amostra na fase estacionária e a forma como esta vai migrar através do sistema, originando as denominações de cromatografia de desenvolvimento, eluição (as mais comuns), deslocamento e análise frontal.

As separações cromatográficas, dos pigmentos, desenvolvidas neste trabalho, ocorreram por mecanismos de adsorção e partição, pelo que se passam a descrever em detalhe estas duas técnicas.

3.2.1. Cromatografia de Adsorção em Coluna; Cromatografia Líquido-Sólido.

Na cromatografia de adsorção os componentes da mistura são adsorvidos por uma fase estacionária sólida. O fracionamento de misturas contendo espécies não iônicas, solúveis em solventes orgânicos, é essencialmente determinado por diferenças de polaridade dos componentes da mistura a separar.

Se o adsorvente é um material polar, as moléculas não polares como, por exemplo, os hidrocarbonetos terão pouca afinidade pela superfície adsorvente e não irão ficar retidas. Ao contrário, as moléculas com grupos funcionais polares irão ter uma forte afinidade com o adsorvente e estabelecer interações fortes, ficando adsorvidas.

Cada soluto adquire o seu próprio equilíbrio entre a adsorção sobre a superfície do sólido e a sua solubilidade no solvente. A espécie menos solúvel no solvente, ou melhor adsorvida pela fase estacionária, move-se mais lentamente, resultando numa separação em bandas onde se concentram os diferentes solutos.

Dado que as forças entre as moléculas dos solutos e adsorvente dependem dos efeitos de polaridade, a cromatografia por adsorção é mais indicada para a separação de misturas de moléculas de diferentes polaridades, por exemplo álcoois, cetonas ou ésteres, do que para a separação de membros de séries homologas onde os efeitos da adição de um grupo $-CH_2-$ na cadeia hidrocarbonada produz diferenças pouco significativas nas forças intermoleculares.⁵⁷

A ordem de eluição de moléculas polares numa fase estacionária polar obedece à ordem de polaridade dos grupos funcionais dos solutos: hidrocarbonetos < hidrocarbonetos halogenados < éteres < aminas terciárias < ésteres < cetonas, aldeídos < aminas primárias < amidas < álcoois < ácidos carboxílicos.⁶¹

Para os adsorventes apolares a ordem será inversa.

3.2.2. Cromatografia de Partição Planar

A cromatografia em papel e a cromatografia em camada fina são exemplos de cromatografia de desenvolvimento que ocorre por um mecanismo de partição de solutos, que é baseado nas diferenças de solubilidade dos componentes na fase estacionária líquida e na fase móvel líquida.⁶⁰

O movimento da fase móvel através da fase estacionária ocorre por ação capilar, de acordo com as afinidades dos componentes, e permite o desenvolvimento do cromatograma. Observa-se a separação diferencial dos diferentes componentes ou solutos ao longo da fase estacionária.

Normalmente, o líquido fixado na matriz estacionária é água ou outro solvente polar. Por exemplo, a natureza celulósica do papel permite-lhe absorver quantidades apreciáveis de água, que irá constituir a fase estacionária líquida e irá interagir com a fase móvel, também líquida. Os componentes da amostra são distribuídos entre a fase estacionária e a fase móvel, migrando mais lentamente aqueles que apresentam maior capacidade para formar ligações de hidrogénio com a água.⁶²

Se os componentes separados não são visíveis no papel deve-se, por exemplo, pulverizar com um componente que o torne visível ou observar à luz ultravioleta.

A razão entre as distâncias percorridas pelos solutos, desde o ponto de partida até a frente do solvente, caracteriza a posição de cada componente e é dada pelo Fator de Retenção, R_f :

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pelo soluto}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

Os valores de R_f são sempre inferiores à unidade. A distância que cada soluto percorre ao longo do papel, deveria corresponder sempre à mesma fração da distância percorrida pelo solvente, ou seja, o valor de R_f deveria ser constante para esse mesmo soluto. Contudo, a posição do soluto raramente corresponde a um ponto, mas sim uma mancha e nesse caso considera-se o valor da distância percorrida pelo soluto desde o ponto de aplicação até ao ponto médio da mancha. Se a mancha do soluto é pequena ocorreu uma separação nítida, mas se a mancha é extensa, a separação é difusa e o resultado da separação será inadequado para a análise quantitativa.⁶⁰

3.3. A Fase Estacionária: O amido

Os adsorventes utilizados na fase estacionária distinguem-se em adsorventes polares, como o óxido de ferro(II), óxido de alumínio, sílica gel e hidratos de carbono (amido, açúcar, celulose) e os adsorventes não polares como: carvão ativado e algumas resinas orgânicas.⁶¹

Neste trabalho, a fase estacionária utilizada foi o amido, dando seguimento ao trabalho já iniciado por Dias (2015)^{47,56}, concretizando-se assim um dos objetivos propostos que foi a utilização de materiais acessíveis e ecológicos.

O amido ($C_6H_{10}O_5$)_n é um hidrato de carbono comestível, renovável e biodegradável, cuja cristalinidade granular e a elevada massa molecular o tornam num polímero bastante inerte.⁶³ Depois da celulose é a biomolécula mais abundante da Terra, constituindo uma fração importante da alimentação do Homem e a maior reserva de energia das plantas.^{62, 64}

Os grãos de amido podem ser isolados de raízes, folhas, tubérculos, sementes, frutos e pólen, porém, as principais fontes comerciais são milho, batata, arroz, trigo, mandioca, aveia, ervilha, cevada, etc.⁶³

Industrialmente o amido pode ser extraído e refinado por processos de moagem húmida, peneiração e secagem. Pode ser usado tal como é extraído da planta (amido nativo) ou após sofrer uma ou mais modificações químicas, para alcançar propriedades específicas (amido modificado).⁶⁴ Após extração da planta, o amido torna-se num pó de farinha branco, insolúvel em água fria.

Dependendo da sua origem botânica, o amido pode apresentar propriedades diferentes, tais como: forma, tamanho, composição, distribuição e cristalização dos grânulos.

Microscopicamente, o pó é constituído por grânulos brancos, de diâmetro entre 2 a 100 μm e densidade relativa 1,5.⁶⁴ Os formatos podem ser regulares (por exemplo: esférico, ovoide ou angular) ou bastante irregulares (**Figuras 17 e 18**).⁶⁵



Figura 17 - Formas dos grânulos de amido de diferentes origens vegetais.⁶⁵

O amido é biossintetizado e armazenado pelas plantas na forma de pequenos grânulos semicristalinos sendo estes, basicamente, constituídos por duas macromoléculas glicosídicas, a amilose e a amilopectina, polímeros que não existem livres na natureza.⁶³

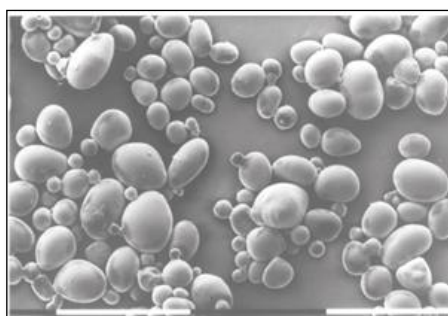


Figura 18 - Fotomicrografia de grânulos de amido de batata.⁶⁶

A amilose (**Figura 19**) é um polímero linear constituído por unidades de D-glucose, estabelecendo entre si ligações α -glicosídicas nas posições 1,4. O número de unidades de glucose por cada molécula de amilose pode variar entre 500 a 5000 unidades, tendo tendência a formar estruturas helicoidais. A amilopectina (**Figura 20**) é uma estrutura altamente ramificada, de 20 a 25 unidades de glucose unidas por ligações D- α -(1 \rightarrow 4) na cadeia linear (como na amilose), e interligadas por ligações D- α -(1 \rightarrow 6) em ramificações que ocorrem, aproximadamente entre cada 22 unidades de glucose.^{63,64}

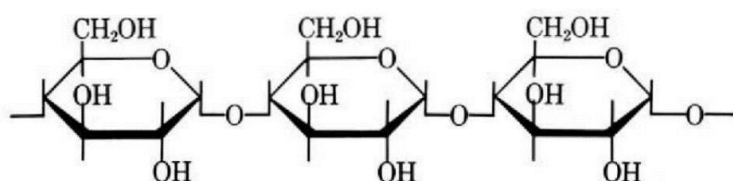


Figura 19 – Estrutura química da amilose.⁶⁷

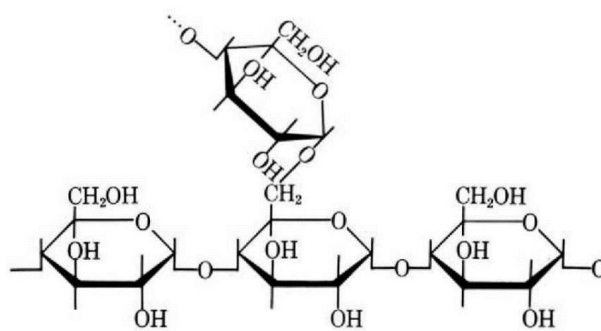


Figura 20– Estrutura química da amilopectina.⁶⁷

Na maioria dos tipos de amidos comuns, o peso percentual da amilopectina estará entre 72 e 82 % e da amilose entre os 18 e 28 %.⁶⁴ O amido de batata, por exemplo, pode apresentar, em média, entre 11,9 % a 20 % de amilose, no entanto, vários fatores podem influenciar estes valores, nomeadamente a estado de desenvolvimento da planta/tubérculo.⁶⁸

Os grânulos de amido são compostos por estruturas lamelares nas quais alternam regiões cristalinas e regiões amorfas (**Figura 21**). As regiões amorfas contêm zonas menos ordenadas de ramificações rígidas de amilopectina e amilose/amilopectina.

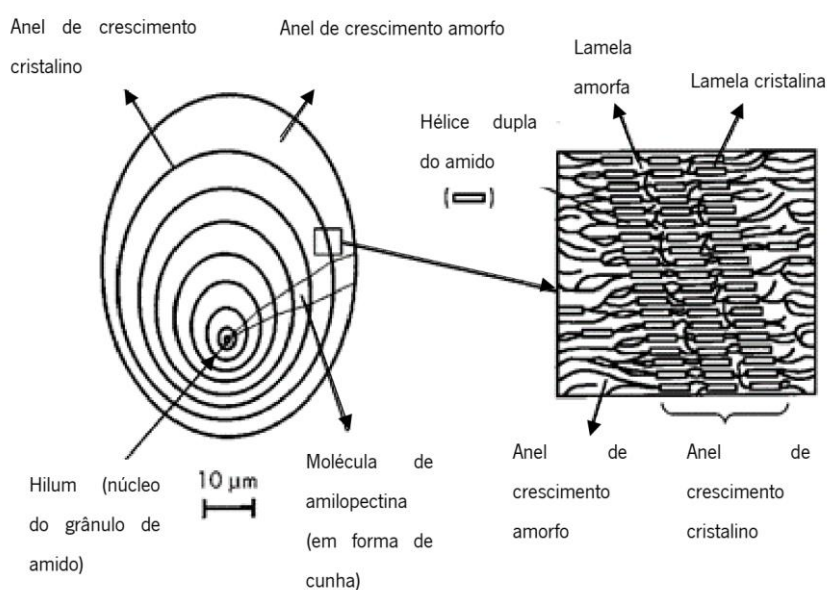


Figura 21 – Esquema de um grânulo de amido de batata: estrutura de anéis de crescimento cristalinos e amorfos, em camadas alternadas. As zonas de crescimento cristalino são subdivididas em camadas concêntricas de lamelas cristalinas e amorfas, alternadamente (imagem à direita).⁶⁹

Em geral, nos grânulos de amido, a amilose é amorfa, no entanto, também pode formar, com a amilopectina, hélices duplas nas cadeias laterais e cristalizar. A molécula de amilopectina cresce a partir do ponto da origem do grânulo (hilum) até à sua superfície, representando o grande tamanho da molécula (**Figura 21**).⁶⁹

Sendo o amido um adsorvente polar irá ter particular afinidade pelas moléculas de água, sendo esta intensamente adsorvida pelas suas moléculas. À temperatura ambiente o amido poderá conter até cerca de 20 % em peso de água.⁶⁹ A água entra de forma reversível na estrutura do amido, entrando mais rapidamente nas camadas amorfas do que nas camadas cristalinas.⁶⁹ A superfície ativa do adsorvente estará ocupada pelas moléculas de água tornando-o menos capaz de absorver outras moléculas menos polares.⁶¹

Quando aquecidos em excesso de água, os grânulos incham e se se atingir a temperatura de gelatinização (entre 59 °C a 69 °C para o amido de batata) a hélice desenrola-se e as estruturas ordenadas quebram, aumentando a viscosidade.⁶⁸

Para além da água, há outros componentes menores que estão associados aos grânulos de amido, podendo estes ser de três tipos: fragmentos da parede celular, componentes da superfície

(enzimas, proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos) e componentes internos, principalmente os lípidos. A proporção destes componentes depende da origem vegetal do amido.⁶⁴

3.4. Os Solventes de Eluição

No processo de separação de componentes de uma mistura por cromatografia, uma substância orgânica é mais fortemente adsorvida por um solvente apolar do que num solvente polar. Para que a substância, adsorvida pela fase estacionária, seja deslocada pelo solvente e eluída através da coluna, este deve ter uma afinidade mais elevada para com o adsorvente.

Assim, a maior ou menor facilidade com que uma substância é eluída pelo solvente determina a série eluotrópica da eluição. Na tabela 3 lista-se um conjunto de solventes, organizados em função do seu poder de eluição relativamente a um dado adsorvente polar.⁶¹

Tabela 3 - Série eluotrópica.⁵⁹

Série eluotrópica		
1 - Éter de petróleo	7 - Clorofórmio	13 - Butanol
2 - Ciclohexano	8 - Éter dietílico	14 - Etanol
3 - Sulfureto de carbono	9 - Tetra-hidrofurano	15 - Metanol
4 - Tetracloroeto de carbono	10 - Acetato de etilo	16 - Água
5 - Dicloroetileno	11 - Acetona	17 - Ácido acético
6 - Benzeno	12 - Metiletilcetona	18 - Piridina

No início da série encontram-se os solventes menos polares que apresentarão menor afinidade para com fases estacionárias polares, deslocando as substâncias não polares da amostra cujos componentes se pretendem separar. A série termina com os solventes de maior polaridade.

Para adsorventes não polares, como por exemplo o carvão ativado, a série será invertida.

A ordem da série de eluição depende da fase estacionária assim como dos componentes da mistura a separar.

Analisando esta ou outras séries eluotrópicas, utilizadas na maioria dos processos de separação cromatográficos, verifica-se o uso quase inevitável de solventes orgânicos perigosos, não só para a saúde humana como também para o ambiente.

Nesta área, múltiplas ações globais junto da indústria química têm sido levadas a cabo pelo Instituto da Química Verde (GCI, Green Chemistry Institute) da Sociedade Americana de Química (ACS, American Chemical Society), no sentido de juntar esforços na procura de processos de

síntese mais verdes, que possam substituir os solventes mais nocivos e poluentes por solventes mais ecológicos.¹³

No que diz respeito ao Ensino, apesar do aumento do número de propostas de atividades experimentais com recurso a solventes menos perigosos, nomeadamente a substituição dos solventes orgânicos por outros menos prejudiciais, como a água, há ainda um caminho grande a percorrer na mudança de mentalidades e de costumes. Segundo **Machado (2017)**, num estudo realizado sobre segurança dos solventes sugeridos nas atividades experimentais propostas para a disciplina de química no Ensino Secundário, em Portugal, mostrou que, e citando “o programa e manuais escolares prescrevem solventes de que uma parte substancial são perigosos ou muito perigosos, aconselhando-se a sua substituição”.¹³ Neste estudo a análise dos perigos foi realizada através de dois instrumentos de avaliação: Guias de segurança de solventes publicados pelas indústrias farmacêuticas (em especial o **Guia GSK**, GlaxoSmithKline) e uma ferramenta de apresentação gráfica dos perigos das substâncias químicas, **ferramenta SHE** (**S** – Safety, segurança física; **H** – Human Health, saúde humana; **E** – Environment, ambiente). Esta ferramenta usa as fichas de dados de segurança dos produtos químicos (**SDS**, Safety Data Sheet). De uma forma geral, verificam-se discrepâncias entre as duas avaliações, dado que estas não ocorrem sempre no mesmo sentido, sendo que na avaliação realizada com a ferramenta SHE, na maioria dos casos, aponta para um nível de perigosidade superior.¹³

O estudo mostrou a existência de problemas de segurança que envolvem riscos de manuseamento elevados e não aconselhados no ensino laboratorial de química a este nível de ensino. Verifica-se que alguns solventes, não sendo propostos pelos programas curriculares, vêm mencionados em manuais ou substituídos por outros igualmente perigosos. É o caso dos solventes diclorometano, éter dietílico, pentano, metano e xileno que, de uma forma geral, são considerados como muito perigosos nas duas avaliações (Guia GSK e ferramenta SHE). Os solventes que são sugeridos, como o pentano, xileno, hexano, éter de petróleo e o tetracloreto de carbono, são considerados perigosos para o ambiente o que envolve a gestão cuidada dos resíduos, outro problema frequente nas escolas.¹³

É necessário que os programas e manuais escolares sejam convergentes no sentido da promoção da segurança laboratorial, propondo experiências que utilizem reagentes/solventes mais benignos e mais seguros. É também importante que os docentes estejam conscientes da necessidade de inculcar nos alunos e de aplicar nas suas práticas letivas opções que zelem pela saúde e pelo bem-estar físico e ambiental de todos.

Neste trabalho, e para não fugir ao tema proposto, procurou-se selecionar solventes, que no conjunto, a sua avaliação de segurança fosse a mais verde e a menos nociva possível. Ressalva-se que, a utilização dos solventes orgânicos, em particular os solventes apolares, no processo de extração dos pigmentos e nas séries eluotrópicas aplicadas foi inevitável, dada a natureza lipossolúvel de algumas classes de pigmentos.

CAPÍTULO II

Resultados e Discussão

O presente capítulo reúne os resultados obtidos no decorrer de todo o trabalho experimental, e sobre os quais se realizou a respetiva análise e discussão. Encontra-se dividido em duas partes principais:

Parte A – Resultados obtidos na extração e separação de carotenoides do tomate.

Parte B – Resultados obtidos na extração e separação de pigmentos em flores: carotenoides e flavonoides.

O objetivo desta investigação envolveu a delineação de atividades experimentais que, para além de serem capazes de extrair e separar os pigmentos presentes em plantas, estivessem adaptadas, em termos de materiais e de tempo, à utilização em sala de aula ou numa disciplina de Projeto, ao longo do ano letivo, tanto a nível do ensino secundário como no ensino básico.^{1,70,71}

Nas atividades laboratoriais elencadas nas Metas Curriculares/Aprendizagens Essenciais para os níveis de ensino obrigatório, os princípios da cromatografia não são explorados, apesar de serem abordados os processos físicos de separação, a nível do 7º e 12º ano de escolaridade.⁷²⁻⁷⁵ No entanto, o recurso a técnicas básicas de cromatografia vai ao encontro das aprendizagens que se pretende alcançar e constituem técnicas simples que não requerem a utilização de equipamentos sofisticados. Considera-se que a introdução das técnicas de cromatografia contribuiria para aumentar o interesse dos alunos pela química, porque são atividades simples e atrativas. Sendo as substâncias a separar moléculas coloridas, os princípios destas técnicas expressam-se macroscopicamente através da cor e irão certamente captar a atenção dos alunos.

Por outro lado, a extração/separação de substâncias do quotidiano estimulará ainda mais a curiosidade científica e permitirá ao aluno estabelecer e compreender a relação entre a química e o dia a dia, alcançando assim aprendizagens mais significativas.

Tendo em conta a necessidade de inculcar nos alunos práticas e recursos mais sustentáveis, pretendeu-se desenvolver uma técnica para a separação de pigmentos através de uma coluna de cromatografia com enchimento de fécula de batata (amido). Este enchimento constituirá uma alternativa aos tradicionais enchimentos de sílica ou alumina que, além de mais barato e de fácil aquisição, é insolúvel em água e em solventes orgânicos e completamente inofensiva sob o ponto de vista da saúde humana e do ambiente.

Os procedimentos realizados visaram, assim, o estudo e otimização da utilização da fécula de batata comercial como adsorvente no processo de separação de pigmentos vegetais através de uma coluna de cromatografia em coluna, utilizando uma gama de eluentes de verdura aceitável. Analisou-se o comportamento e a eficácia deste adsorvente na separação dos pigmentos betacaroteno e licopeno presentes num concentrado de tomate e também de flavonoides e carotenoides, presentes nas pétalas de flores. Este comportamento determinará o sucesso destas separações por cromatografia em coluna e será objeto de análise e discussão no presente trabalho.

PARTE A - Extração e Separação de Carotenoides do Concentrado de Tomate (CT)

1. Os Pigmentos do Tomate

O tomate (*Solanum Lycopersicum*) é um fruto que pertence à família *Solanaceae* e ao género *Lycopersicum*. Esta fruta inclui mais de 3000 espécies produzidas para fins alimentares, medicinais ou ornamentais, ocupando uma larga variedade de *habitats*. Sendo originário da costa oeste da América do Sul, pensa-se que foi trazido para a Europa pelos espanhóis em meados do século dezasseis.⁷⁶

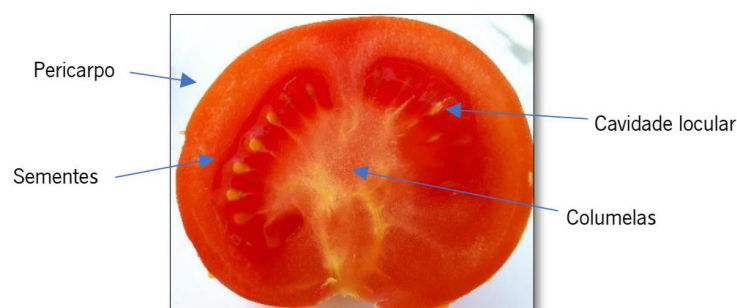


Figura 22 - Secção transversal de um tomate de dois lóculos.

A fruta do tomate é constituída pelo pericarpo (pele, paredes internas e septo), sementes, columela ou placenta e cavidades locais. Os lóculos são preenchidos com células parenquimatosas que circundam as sementes.

É um fruto que normalmente contém entre 5 a 10 % de matéria seca, da qual 75 % é solúvel e cerca de 1 a 3 % dessa matéria é constituída por pele e sementes. Cerca de metade do total da matéria seca do tomate reduz-se a açúcares e cerca de 10 % são ácidos orgânicos, principalmente ácido cítrico e málico.²⁵

Grande parte do tomate processado é consumido na forma de molhos, sumo, pasta ou puré.

O facto de possuir baixo teor em gorduras e calorías, ser uma boa fonte de proteínas, fibras e vitaminas A e C, betacaroteno, potássio e licopeno, leva a que o tomate seja considerado um alimento saudável. O tomate e seus derivados são uma das maiores fontes de licopeno e representam um dos mais importantes aportes de carotenoides para a dieta humana.

Os principais constituintes desta fruta são os carotenoides (betacaroteno e principalmente licopeno), mas também possuem vitaminas, compostos fenólicos e glicoalcaloides.⁷⁶

O licopeno é o carotenoide responsável pela sua cor vermelha característica, que é uma boa medida da sua qualidade e constitui cerca de 80 a 90 % dos pigmentos presentes. A quantidade de licopeno presente depende da sua variedade, maturidade e das condições ambientais em que o fruto amadurece.³² Em geral, por cada 100 g de tomate fresco podem ser encontrados 3 a 5 mg de licopeno. As variedades mais vermelhas podem conter até 15 mg/100 g de material, enquanto as mais amarelas apenas 0,5 mg/100 g de tomate.²⁵ Os alimentos que mais contribuem para a ingestão de licopeno são o sumo/pasta de tomate, *ketchup* e sopas.

Mais de 21 pigmentos da classe dos carotenoides foram já identificados e quantificados no tomate. A distribuição das principais espécies de carotenoides presentes no tomate, é apresentada na **tabela 4**.

Tabela 4 - Distribuição dos carotenoides presentes no tomate.²⁵

Espécies de Carotenoides	Cor	Ligações duplas conjugadas	Composição (%)
Licopeno	Vermelho	11	80 - 90
α -caroteno	Amarelo	9	0,03
β -caroteno	Laranja	9	3 - 5
γ -caroteno	Amarelo	7	1 - 1,3
ξ - caroteno	Amarelo	7	1 - 2
Fitoeno	Incolor	3	5,6 - 10
Fitoflueno	Incolor	5	2,5 - 3,0
Neurosporeno	Laranja	9	7 - 9
Luteína	Amarela	10	0,011 - 1,1

A cor do tomate pode ser mais ou menos alaranjada dependendo da concentração do betacaroteno e do neurosporeno, que são pigmentos de cor laranja. Poderá, igualmente, tornar-se mais amarelada devido à cor amarela de outros pigmentos presentes, nomeadamente o γ -caroteno e o ξ - caroteno.

O fitueno e o fitoflueno são incolores.

O licopeno surge na forma de vários isómeros geométricos, sendo a forma *all-trans* a que predomina no tomate fresco e aquela que é termodinamicamente mais estável. Durante o processamento do tomate ocorre a isomerização *trans-cis* (mono ou poli), sendo o isómero 5-*cis*-licopeno o mais encontrado nos alimentos processados à base de tomate.²⁵

A indústria do tomate tem demonstrado particular interesse na produção de variedades de tomate com alto teor em licopeno e no desenvolvimento de processos industriais que aumentem o teor de licopeno em produtos derivados do tomate.³⁰

Uma alternativa promissora para o aumento da produção do licopeno natural passa pelo aproveitamento da pele e bagaço do tomate, que contém entre 3 a 5 vezes mais licopeno do que a sua polpa.⁷⁷ O licopeno constitui cerca de 70 a 80% dos carotenos da pele e sementes presentes nos desperdícios do tomate, enquanto que o betacaroteno e o fitueno 3,7% e 5,3% respetivamente. Apresentam elevada atividade antioxidante, podendo ser usados nos cosméticos, aplicações farmacêuticas, bebidas vegetais, entre outros. De forma semelhante às proantocianidinas e pectinas já comercializadas e obtidas a partir da semente da uva e das cascas de citrinos ou bagaço de maçã, respetivamente. Este aproveitamento veio também responder ao crescente interesse pelas questões ambientais e pelas questões de sustentabilidade, que levaram à necessidade de elaborar novas estratégias para a gestão de resíduos agroindustriais.⁷⁷

2. Extração de Carotenoides

Tendo em vista a investigação de métodos cromatográficos simples e amigos do ambiente para a separação e análise de pigmentos do tomate com fins didáticos, foram selecionadas a cromatografia em papel e a cromatografia em coluna de amido, por se tratar de técnicas muito simples e mais sustentáveis na medida em que os adsorventes são muito acessíveis, não são tóxicos e são também biodegradáveis. A fonte de licopeno escolhida foi o concentrado de tomate, em detrimento de outros derivados do tomate, como a polpa ou mesmo o tomate em cru (também testado). Esta escolha deveu-se ao seu reduzido conteúdo em água porque facilitava o processo de extração do licopeno e do betacaroteno.

Para a identificação dos pigmentos presentes no extrato líquido e análise da composição das frações recolhidas da coluna de cromatografia, recorreu-se à cromatografia em papel, realizada em câmaras saturadas com diferentes solventes.

Para a separação dos pigmentos por cromatografia em coluna, numa primeira fase, pretendeu-se fazer uma avaliação do comportamento do amido de batata como adsorvente de modo a encontrar a melhor sequência/proporção de solventes a utilizar na eluição da coluna. Na segunda fase, o estudo centrou-se na otimização do tempo necessário e do volume de solventes utilizados para realizar o processo.

2.1. Ensaios preliminares

Para a separação e análise dos pigmentos do tomate, foi necessário começar pela preparação de extratos adequados para serem utilizados nas técnicas de cromatografia em papel e em coluna. Neste sentido e tendo em conta a estrutura química dos principais pigmentos, o licopeno e o betacaroteno, foram realizados vários ensaios experimentais nos quais se testou a solubilidade destes pigmentos em diferentes solventes, de modo a encontrar o melhor solvente de extração. Os ensaios preliminares de extração dos carotenoides envolveram o tratamento direto do concentrado de tomate com solventes de baixa polaridade. Iniciou-se com o acetato de etilo e o éter de petróleo 40-60 °C, em ensaios separados. Formaram-se misturas de duas fases em que os líquidos sobrenadantes apresentaram cores amarelo ou amarelo-alaranjado muito ténues, enquanto o resíduo pastoso mantinha uma cor ainda muito vermelha (**Figura 23**). Estes resultados demonstraram que a extração foi pouco eficiente, sugerindo que os problemas de imiscibilidade observados poderiam estar relacionados com a presença ainda significativa de água no concentrado de tomate.



Figura 23 - Resíduo sólido de tomate após extração com éter petróleo 40-60 °C, sem desidratação.

Na tentativa de promover a miscibilidade com a água residual da amostra, recorreu-se à acetona como solvente de extração, adicionando diretamente a acetona sobre o tomate. Verificou-se que a acetona não extraiu o licopeno e pensou-se em adicionar um co-solvente como o éter de petróleo ou outro solvente mais apolar para tornar a extração mais eficiente.

Foram testadas misturas de acetona/éter de petróleo 40-60 °C, nas proporções 1:1 e 1:2, e misturas de acetato de etilo/acetona, nas mesmas proporções, adicionando diretamente o solvente sobre o tomate. A coloração amarela das fases líquidas sobrenadantes e a coloração avermelhada do concentrado de tomate demonstrou que nenhuma das misturas extraiu eficientemente o licopeno. Os resultados obtidos podem ser analisados na tabela 5.

Tabela 5 - Ensaios preliminares de extração, realizados diretamente sobre o tomate.

Solventes de Extração	Cor da Solução
Acetona	Amarelo
Acetato etilo	Amarelo
Éter de petróleo 40-60°C	Amarelo
Acetona + acetato etilo (1:1)	Amarelo-laranja (ténue)
Acetona + éter de petróleo 40-60°C (1:1)	Amarelo
Acetona + éter de petróleo 40-60°C (1:2)	Amarelo
Acetato etilo+ etanol (2:1)	Laranja-avermelhado
Acetato etilo +acetona (1:1) + Sulfato sódio anidro	Laranja-avermelhado

No entanto, os resultados referenciados nas duas últimas linhas da tabela 5 mostram que, ao adicionar o etanol ou um agente excicante, como o sulfato de sódio anidro, a mistura tornou-se mais avermelhada e a cor do resíduo sólido avermelhado do concentrado de tomate, em flocos, começou a clarear. A adição do etanol resolveu o problema da imiscibilidade entre a água e os solventes apolares, solubilizando a água residual do concentrado de tomate e melhorando a acessibilidade dos solventes orgânicos na extração dos carotenoides. Dado que se formaram duas fases imiscíveis, foi necessário proceder, neste caso, à sua separação numa ampola de decantação para separar a fase aquosa (mais vermelha) da fase orgânica (mais amarela).

Nas etapas experimentais que se seguiram, testaram-se diferentes abordagens alternativas para diminuir a interferência da água e assim otimizar o processo de extração. Com base nos resultados anteriores e de acordo com o trabalho descrito por Silveira & Evans⁵³, decidiu-se proceder a uma desidratação prévia da amostra do tomate com etanol, para facilitar a extração dos pigmentos. A adição de etanol à amostra do concentrado de tomate seguida de agitação forte para aumentar a miscibilidade dos líquidos, resultou sempre na obtenção de uma fase líquida de cor amarelada e de um resíduo sólido de cor laranja avermelhada, indicativos da insolubilidade do licopeno em etanol.

A lavagem com etanol foi repetida várias vezes para arrastar toda a água do concentrado. Num dos procedimentos, avaliou-se o efeito da temperatura colocando a mistura de etanol e tomate num banho-maria, a 40 °C, durante aproximadamente 5 minutos, seguindo-se a filtração a vácuo. Na análise da cor dos extratos sólidos e do filtrado não se observaram alterações significativas após aquecimento em banho-maria, pelo que esta etapa não voltou a repetir-se.

O resíduo sólido obtido após desidratação da amostra de tomate com o etanol, foi submetido a ensaios de extração dos pigmentos numa seleção de solventes cuja verdura se procurou que fosse o mais aceitável possível. Os solventes selecionados foram o etanol, a acetona, o acetato de etilo e o éter de petróleo.

Na tabela 6 apresentam-se os resultados com base na coloração das soluções obtidas após extração e filtração dos extratos líquidos por gravidade.

Tabela 6 - Ensaio de extração, realizados sobre o resíduo de tomate obtido por desidratação com etanol.

Solventes de Extração	Cor da Solução
Éter de petróleo 40-60°C	Laranja-avermelhada
(1) Acetona;(2) éter de petróleo (1:1)	Laranja-avermelhada
Acetato etilo	Laranja-avermelhada
(1) Acetato etilo; (2) acetona (1:1)	Laranja-avermelhada tênue
(1) Acetato etilo; (2) etanol (2:1)	Laranja-vermelho intenso

Os resultados mostraram que o resíduo previamente desidratado, quando tratado sob forte agitação com o solvente ou misturas de solventes selecionados, levou à obtenção de extratos líquidos com bastante cor.

Relativamente à atuação e eficácia relativa dos solventes no processo de extração, as colorações das soluções mostraram-se semelhantes. No entanto, verificou-se que ocorreu a formação de cristais bem visíveis de licopeno sobre as paredes do gobelé em que o éter de petróleo tinha sido o solvente de extração, evidenciando uma maior capacidade de extração do pigmento por este solvente. Comparou-se, lado a lado, a capacidade de extração do licopeno pelo éter de petróleo (**Figura 24**) a partir da pasta de tomate e a partir do seu resíduo desidratado, verificando-se uma eficiência consideravelmente maior quando se partiu de uma amostra de concentrado desidratada.

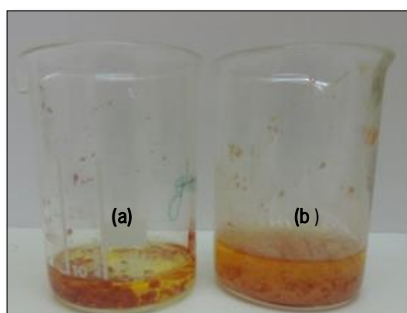


Figura 24 – Extração dos pigmentos do tomate com éter de petróleo 40-60 °C: (a) sem desidratação prévia; (b) após desidratação com etanol.

No entanto, a observação da cor amarela do filtrado/decantado durante a desidratação prévia com etanol foi indicativa de que ocorreu a extração simultânea de pequenas quantidades dos pigmentos amarelos possivelmente o betacaroteno. Concluiu-se então que a desidratação por lavagem do tomate com o etanol, conduzia à perda de betacaroteno e outros carotenoides mais amarelos por dissolução.

Com base nesta observação, averiguou-se a possibilidade de extrair seletivamente o betacaroteno com uma mistura de etanol/acetona (95:5) e de retirar o licopeno com éter de petróleo no passo seguinte. Verificou-se que o filtrado obtido com a mistura de etanol/acetona apresentava uma cor alaranjada indicadora da solubilização do betacaroteno e também do licopeno, embora o resíduo sólido do concentrado de tomate ainda mantivesse uma cor alaranjada. Esta mistura de solventes não separou o betacaroteno do licopeno, uma vez que a acetona solubiliza, em alguma extensão, todos os pigmentos. Por outro lado, apesar do etanol não ser um bom solvente para o licopeno, também não revelou ser um bom solvente para o betacaroteno. Concluiu-se então que não seria possível separar, por extração seletiva, nestas condições, estes dois pigmentos do tomate.

Na tentativa de encontrar um método de extração mais simples, eficiente e ecológico, experimentou-se a utilização de agentes desidratantes sólidos durante o processo de extração. Os primeiros sólidos selecionados foram o cloreto de sódio e o sulfato de sódio anidro por serem sais higroscópicos de toxicidade reduzida. Pensou-se também em utilizar adsorventes naturais como o amido, por ser um biopolímero abundante e sustentável com elevada afinidade para a água, dado que os grupos OH do amido interagem facilmente com a pequena molécula de água, provocando a sua hidratação.

Assim, a **primeira abordagem** envolveu a extração dos pigmentos do concentrado na presença do sulfato de sódio anidro, adicionado imediatamente após a adição faseada dos solventes de extração (**Tabela 7**). Para melhorar a eficiência do processo de desidratação, repetiu-se o procedimento adicionando ainda duas espátulas de amido de batata ao sulfato de sódio anidro.

Tabela 7- Extração dos pigmentos do tomate na presença de agentes desidratantes.

Agentes desidratantes	Solventes	Cor da fase líquida extraída
Sulfato de sódio anidro	(1) Éter de petróleo 40-60°C (2) Acetona ^a	Laranja-vermelho intenso
Sulfato de sódio anidro e Amido	(1) Éter de petróleo (2) Acetona ^a	Laranja-vermelho intenso

^a Volume igual dos dois solventes (1) e (2).

Analisando os resultados da tabela 7, verifica-se que a ação dos solventes sobre o tomate na presença dos agentes desidratantes originou extratos líquidos com cor laranja-avermelhado forte, indicativa de uma boa concentração de licopeno.

2.2. Extração otimizada

O processo foi então otimizado com a introdução de algumas alterações. Assim, em primeiro lugar adicionou-se uma quantidade de sal sobre a amostra do concentrado (**Figura 25; 1**) e, após trituração, adicionou-se o amido até obter uma proporção 1:3 dos dois sólidos(**Figura 25; 2**). Este procedimento também foi realizado com sal de cozinha (refinado), sendo os resultados obtidos idênticos.

Depois da trituração, colocaram-se os solventes de extração começando pela maceração com a acetona (**Figura 26; 3**) e seguindo-se a adição de um volume igual de éter de petróleo 40-60 °C para obter uma mistura na proporção 1:1 (**Figura 26; 4**). Após filtração, foi obtido um extrato líquido bastante laranja que indicou a presença de uma quantidade considerável de licopeno dissolvido (**Figura 26; 5**).

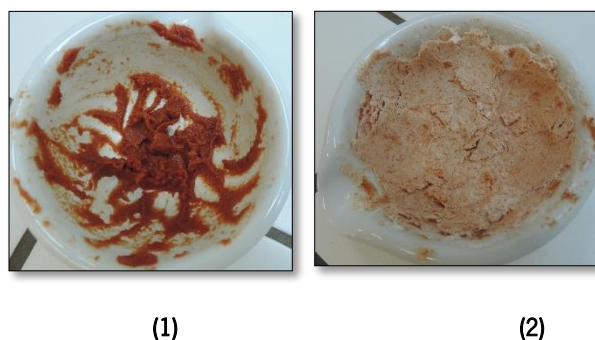


Figura 25 - Etapas da desidratação do tomate: (1) adição de Na_2SO_4 ; (2) adição de amido.

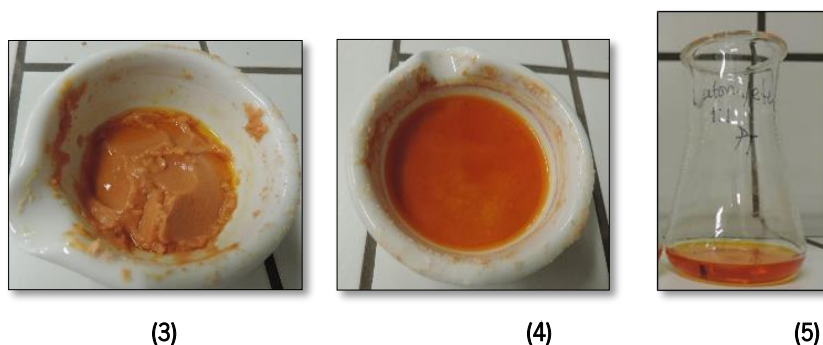


Figura 26 - Etapas da extração de pigmentos do tomate após desidratação: (3) acetona; (4) éter de petróleo 40-60 °C (1:1); (5) extrato líquido após filtração.

Este procedimento foi ainda realizado com uma mistura de acetona/éter de petróleo 40-60 °C (1:2). Nestas condições conseguiram-se extratos líquidos de cor mais intensa e foi esta a proporção de solventes que passou a ser utilizada.

A extração com éter de petróleo 40-60 °C/acetona na presença dos agentes desidratantes sólidos mostrou ser um método bastante eficiente, já que se obtiveram extratos líquidos bem avermelhados a par de um resíduo sólido esbranquiçado, sinal de que os pigmentos foram extraídos.

Este método permitiu a obtenção de extratos líquidos mais concentrados e proporcionou maior rapidez no processo de execução. A adição do sal e do amido de batata diminuiu o gasto de solventes e o desperdício de pigmentos, tendo-se mostrado uma boa alternativa à desidratação com o etanol.

Para além do extrato líquido, preparou-se também um extrato sólido para aplicação na coluna de cromatografia. A amostra de tomate foi desidratada, seguindo o procedimento descrito anteriormente, em que se adicionou diretamente ao concentrado o sulfato de sódio anidro e o amido de batata, na proporção 1:3. Foi obtido um resíduo sólido alaranjado seco e solto, após trituração, tal como mostra a figura 27.



Figura 27 - Extrato sólido obtido por tratamento do tomate com Na_2SO_4 e amido.

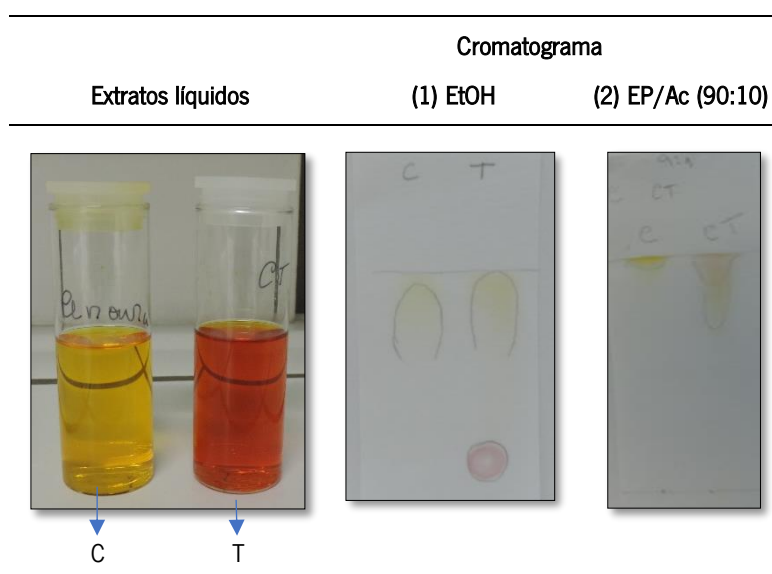
3. Separação de Carotenoides por Cromatografia

3.1. Cromatografia em Papel

Uma vez obtido um extrato líquido satisfatório a partir do concentrado de tomate, recorreu-se à cromatografia em papel para análise dos pigmentos constituintes. O extrato líquido foi aplicado em tiras de papel de filtro seguindo-se a eluição em duas câmaras cromatográficas saturadas com dois tipos de eluente: um mais polar e outro menos polar. Os sistemas eluentes selecionados foram o etanol e uma mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10). Na câmara em que o eluente utilizado foi a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) ocorreu migração

equivalente de todos os pigmentos, verificando-se que a mancha laranja do licopeno e a amarela do betacaroteno se apresentavam sobrepostas e posicionadas na frente do solvente (**Tabela 8**). A câmara de etanol originou um resultado excelente uma vez que separou o licopeno dos restantes pigmentos, pois a mancha vermelha que o identifica ficou retida no ponto de aplicação. Apesar do licopeno e do betacaroteno apresentarem polaridades semelhantes, ocorreu a precipitação seletiva do licopeno à superfície do papel devido à insolubilidade deste pigmento no etanol, impedindo a sua migração. Verifica-se assim uma separação muito eficaz do betacaroteno, que se apresenta como uma mancha amarela na frente do solvente. A atribuição desta mancha amarela ao betacaroteno foi, seguidamente, confirmada com um padrão do betacaroteno. O padrão de betacaroteno utilizado foi um extrato de cenoura obtido pelo mesmo método. Compararam-se os dois extratos lado a lado e os resultados mostraram a identidade de manchas amarelas, tal como demonstram as imagens apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 - Extratos líquidos de cenoura (C) e do tomate (T); cromatogramas obtidos em câmaras de: (1) Etanol; (2) Éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10)



Com base nestes resultados, conclui-se que a cromatografia em papel realizada em etanol apresenta-se como uma técnica simples, eficiente, económica e ecológica para análise dos carotenoides no concentrado de tomate.

3.2. Cromatografia em Coluna

Na fase seguinte, averiguou-se a possibilidade de separar os carotenoides presentes no tomate através da cromatografia em coluna de amido de batata. Para o efeito, planeou-se uma série de procedimentos experimentais que permitissem avaliar o comportamento deste adsorvente na eluição dos pigmentos através da coluna. Tendo por base os resultados obtidos na técnica da cromatografia em papel, foram selecionados os solventes éter de petróleo e etanol para a eluição dos pigmentos.

Numa primeira fase, a coluna utilizada foi uma seringa descartável de 50 mL. O empacotamento da coluna foi realizado com o amido seco, sobre o qual se colocou a amostra de concentrado na forma de extrato sólido.

Foram realizados vários ensaios preparando-se as colunas pelo mesmo método e fazendo-se variar os eluentes utilizados.

A eluição da banda amarela atribuída aos carotenos fez-se com etanol puro ou com uma mistura de acetona/etanol 1:1. Para a eluição da banda laranja do licopeno foi selecionado o éter de petróleo ou o acetato de etilo. A tabela 9 mostra o resultado de três ensaios, que correspondem à eluição dos pigmentos do tomate (T) ao longo das três colunas (C_{T1} , C_{T2} , C_{T3}), apresentando-se os eluentes utilizados e a cor das frações recolhidas.

Tabela 9 - Eluição dos pigmentos do extrato sólido de tomate em seringas de 50 mL.

Coluna *	Eluentes	Bandas observadas	Frações recolhidas
C_{T1}	(1) Etanol	Amarela	Amarela
	(2) Éter de petróleo 40-60°C	laranja	Laranja avermelhado
C_{T2}	(1) Etanol	Amarela	Amarela
	(2) Acetato de etilo	Laranja acastanhada extensa	Laranja-avermelhado
C_{T3}	(1) Acetona/ Etanol (1:1)	Amarelo-laranja + vermelho	Amarelo-laranja
	(2) Éter de petróleo 40-60°C	Laranja	Laranja-vermelho

*Todas as colunas foram empacotadas com 25 g de amido de batata.

De acordo com a tabela 9, os resultados mostraram que durante a eluição com etanol o licopeno não é deslocado, uma vez que fica retida uma banda vermelha no topo da coluna, enquanto que os carotenos são moderadamente arrastados ao longo da coluna na forma de bandas amarelas (**Tabela 9, C_{T1} e C_{T2}**). Assim, pode concluir-se que o etanol solubiliza o betacaroteno e os outros pigmentos de cor amarela, deixando o licopeno seletivamente depositado na superfície do amido,

na forma de microcristais vermelhos. Apesar da molécula do betacaroteno ser quimicamente apolar possui um anel em cada extremidade da cadeia linear hidrocarbonada que, sendo uma estrutura flexível, deverá favorecer a interação com as moléculas de etanol. Em contrapartida, a molécula de licopeno não é solubilizada pelo etanol porque contém apenas unidades estruturais mais rígidas. O etanol deslocou eficientemente os pigmentos amarelos, mas verificou-se que a eluição foi muito lenta, exigindo tempos superiores a 1h e 30 min, facto que deve estar relacionado com a elevada afinidade do etanol para o amido da fase estacionária.

Após a eluição das bandas amarelas com etanol, a eluição com solventes como o acetato de etilo ou o éter de petróleo fez deslocar bandas de cor laranja, atribuídas ao licopeno. Verificou-se que as frações recolhidas apresentaram colorações laranja-avermelhadas sucessivamente mais intensas e o processo de eluição com este solvente foi muito rápido, demonstrando que o éter de petróleo arrasta facilmente a banda laranja do licopeno. Tal facto deve estar relacionado, não só com a elevada solubilidade do licopeno em éter de petróleo, mas também com a reduzida afinidade deste solvente apolar para a fase estacionária.

A eluição com o acetato de etilo revelou-se um processo mais lento, comparativamente à eluição com éter de petróleo.

Foram obtidas frações bastante concentradas observando-se que, à medida que o solvente evaporava, ocorria formação de microcristais vermelhos de licopeno, não só nos frascos das soluções recolhidas, como também na extremidade da seringa. Assim, verificou-se que o licopeno apresentava o seu vermelho característico na forma cristalina, enquanto que a forma solubilizada originava soluções com uma coloração laranja.

Na tentativa de diminuir o tempo de eluição com o etanol, avaliou-se o efeito da utilização da acetona como co-solvente do etanol (**Tabela 9, C₁₃**). Verificou-se que a acetona fez aumentar a velocidade de deslocamento do etanol através da coluna, mas observou-se também que a primeira banda eluída já apresentava a cor laranja típica do licopeno. A análise desta fração por cromatografia em papel, em câmara de etanol, confirmou que, para além da mancha amarela típica do betacaroteno, o cromatograma apresentava também uma pequena mancha vermelha típica de licopeno. Assim, concluiu-se que a presença de acetona promoveu a eluição do licopeno e não permitiu uma boa separação dos dois pigmentos.

Sabendo que o etanol dissolve seletivamente o betacaroteno, separando-o do licopeno, e que a presença da acetona faz aumentar a rapidez de eluição, averiguou-se se haveria alguma proporção da mistura dos eluentes etanol/acetona, inferior à proporção utilizada (1:1), que permitisse

solubilizar, de forma mais rápida e seletiva os carotenos amarelos na coluna. Assim, para a eluição da primeira fração, testaram-se misturas de acetona/etanol nas proporções: 20:80, 10:90, 5:95, 1:99 para a eluição em quatro colunas diferentes (C_{T4} a C_{T7} , Tabela 10). No passo seguinte, o éter de petróleo 40-60 °C solubilizaria o licopeno.

Tabela 10 - Cromatografia em coluna, realizada em quatro seringas de 50 mL: Pigmentos amarelos eluídos com misturas de etanol/acetona em diferentes proporções.

Coluna *	Eluentes	Bandas observadas	Frações recolhidas
C_{T4}	(1) Acetona/ Etanol (20:80)	Amarelo ténue	Amarela, mais rápida
	(2) Éter de petróleo 40-60 °C	Alaranjada	Laranja
C_{T5}	(1) Acetona/ Etanol (10:90)	Amarelo ténue	Amarela, rápida
	(2) Éter de petróleo 40-60 °C	Alaranjada	Laranja
C_{T6}	(1) Acetona/ Etanol (5:95)	Amarelo forte	Amarela, lenta
	(2) Éter de petróleo 40-60 °C	Laranja	Laranja avermelhado
C_{T7}	(1) Acetona/ Etanol (1:99)	Amarelo forte	Amarela, muito lenta
	(2) Éter de petróleo 40-60 °C	Laranja acastanhada extensa	Laranja-avermelhado

*Todas as colunas foram empacotadas com 25 g de amido de batata.

Na **Figura 28** são apresentadas as imagens das frações recolhidas da coluna C_{T6} , por eluição com a mistura acetona/etanol (5:95) (fração de carotenos) e éter de petróleo (fração licopeno).

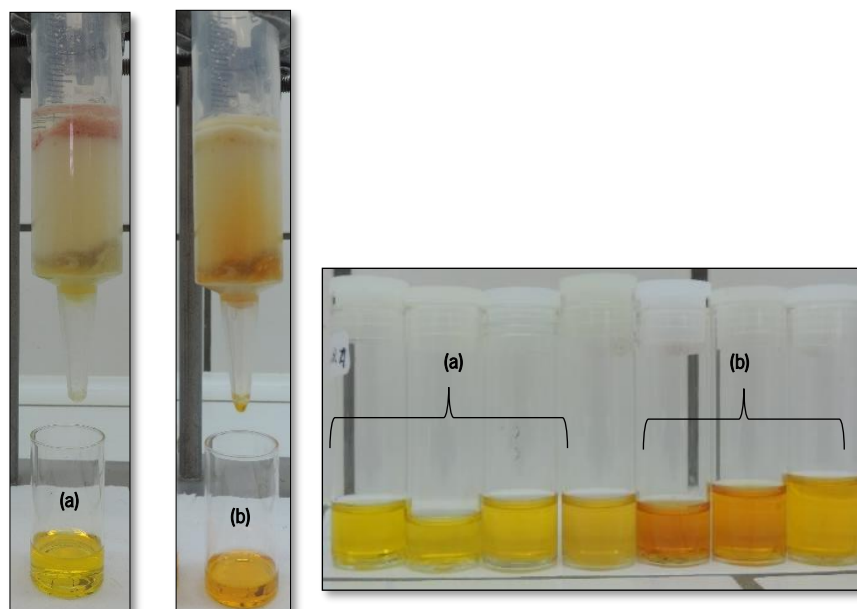


Figura 28 - Frações de pigmentos do tomate eluídas da coluna C_{T6} : (a) Frações com carotenoides amarelos; (b) Frações com licopeno.

A análise por cromatografia em papel, em câmara de etanol, mostrou que as frações eluídas nas três primeiras colunas continham pigmentos amarelos e vermelhos. Na coluna C₁₇, o tempo de eluição da mistura de solventes foi muito semelhante à eluição do etanol puro.

Os resultados deste estudo mostraram que, em todas as colunas em que a acetona foi utilizada como co-solvente do etanol, ocorreu sempre solubilização simultânea de pigmentos. Assim, a diminuição da polaridade do etanol por adições sucessivas de acetona aumenta a velocidade de eluição, mas não separa os pigmentos.

Na fase seguinte manteve-se o etanol como primeiro solvente de eluição, para garantir a solubilização seletiva dos carotenos amarelos, mas investigaram-se outras alternativas para melhorar a eficiência da coluna em termos de tempo.

Decidiu-se então aumentar a volumetria da coluna de forma a aumentar a área de superfície exposta, diminuindo a altura da fase estacionária. Alterou-se também o empacotamento a seco para um empacotamento da coluna a húmido, introduzindo o amido de batata na coluna na forma de uma suspensão em etanol.

Para comparar a eficiência de uma coluna de 100 mL relativamente à coluna de 50 mL, foram realizadas experiências paralelas contabilizando os volumes de eluentes utilizados, assim como o tempo necessário para a eluição das bandas dos pigmentos.

A eluição foi iniciada com etanol (EtOH), procedendo-se de seguida a uma lavagem com acetona (Ac) e terminou-se com éter de petróleo 40-60 °C (EP). A lavagem com acetona arrastou sempre uma pequena quantidade de licopeno além de outros pigmentos e, por isso, a fração recolhida foi desprezada.

Os resultados estão resumidos nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Cromatografia em coluna de um extrato de tomate, realizada em seringas de 50 e 100 mL.







Colunas (mL)	Fase estacionária (Amido)		Série de eluentes		
			(1) EtOH	(2) Ac	(3) EP
50 C ₁₈	25 g ^a	Volume (mL)	25	10	20
		Tempo Eluição (min)	90	20	30
100 C ₁₉	25 g ^a	Volume (mL)	25	10	20
		Tempo Eluição (min)	60	20	30
C ₁₁₀	15 g ^b	Volume (mL)	18	8	20
		Tempo Eluição (min)	45	15	20

^a Em 10 mL de etanol, 4,00 g de extrato de tomate sobre o amido; ^b Em 6 mL de etanol, 2,00 g de extrato de tomate.

Os resultados evidenciados nas tabelas 11 e 12 mostraram que, utilizando uma coluna de 100 mL e a mesma massa de fase estacionária (25 g), o tempo da eluição com etanol foi significativamente melhorado. Quando se reduziu a altura da fase estacionária (15 g), a eluição foi ainda mais rápida, como previsto.

Tabela 12 – Cromatografia em seringa de 100 mL com diferentes alturas de fase estacionária:

(a) C_{T9}, 25 g; (b) C_{T10}, 15 g

Eluentes							
EtOH		Ac	EP 40-60 °C	EtOH		Ac	EP 40-60 °C
							
(a)			(b)				

A análise das frações recolhidas (**Figura 29**) permitiu obter o cromatograma apresentado na figura 30. Este cromatograma mostra que a fração amarela contém apenas a mancha amarela de carotenos. Na fração mais alaranjada recolheu-se unicamente o licopeno, uma vez que se observam apenas as manchas avermelhadas no ponto de aplicação.

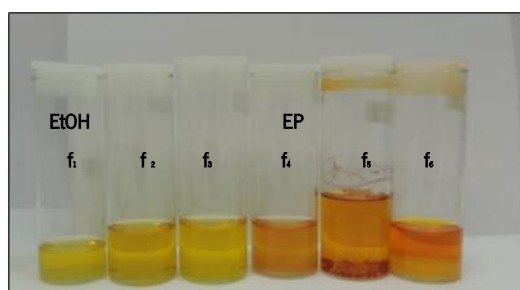


Figura 29 - Frações eluídas em seringa de 100 mL (C_{T10}), com etanol (f₁, f₂ e f₃) e éter de petróleo 40-60 °C (f₄, f₅ e f₆).

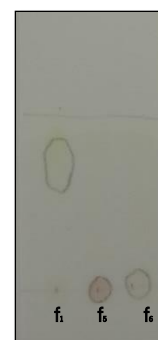


Figura 30 – Cromatograma das frações 1, 5 e 6, da figura 29, obtido em câmara de etanol.

Adicionalmente, foi também avaliada a eluição da banda do licopeno com acetato de etilo. Para testar este solvente, preparou-se uma outra coluna (C_{TII}) com um empacotamento de 15 g de amido, em que se substituiu o éter de petróleo por acetato de etilo. Não se verificaram diferenças significativas no desempenho destes dois solventes.

Os resultados deste estudo mostraram que os carotenoides amarelos e o licopeno presentes no tomate podem ser seletivamente separados por cromatografia em coluna de amido de batata por eluição sucessiva com etanol, acetona e éter de petróleo, num período de tempo de aproximadamente 90 minutos.

Esta separação, para além de simples e eficiente, apresenta um colorido muito apelativo para ser aplicada como ferramenta pedagógica. Para além disso, é um método muito ecológico na medida em que utiliza materiais acessíveis e sustentáveis podendo constituir uma atividade de Química Verde a implementar numa aula do Ensino Secundário.

PARTE B – Extração e Separação de Pigmentos de Pétalas de Flores

A segunda parte do trabalho experimental centrou-se na extração e separação dos pigmentos de pétalas de várias flores, utilizando a cromatografia em coluna aberta e a cromatografia em papel. Procurou-se selecionar flores constituídas por diferentes classes de pigmentos, de modo a permitir a extração e separação de pigmentos de natureza química diversa, nomeadamente carotenoides, flavonoides e antocianinas. Não foi uma procura fácil e nem sempre bem-sucedida.

1. Extração de Pigmentos

As primeiras extrações de pigmentos foram realizadas com pétalas de rosas, utilizando-se o etanol como solvente de extração. No entanto, tendo em conta que numa flor podem ser encontradas diferentes classes de pigmentos, considerou-se que a extração poderia ser otimizada com a utilização da acetona.

A escolha da acetona justificou-se pelo facto de se pretender um solvente universal para a obtenção de extratos de diferentes flores. Sendo um solvente de polaridade intermédia, é capaz de promover a miscibilidade com a água presente nos tecidos vegetais, levando a um espetro de atuação mais alargado, na medida em que pode solubilizar tanto carotenoides como flavonoides, incluindo as antocianinas. Em geral, a acetona é um solvente utilizado nos laboratórios das escolas e, comparativamente com outros solventes, é menos nocivo.

Apesar da extração de flavonoides, nomeadamente das antocianinas, ser beneficiada quando realizada em meio ácido, dado que protege a cor, optou-se pela não acidificação do meio extrativo, uma vez que os ácidos poderiam danificar os carotenoides eventualmente presentes nas pétalas e levar à hidrólise das ligações glicosídicas nos flavonoides.

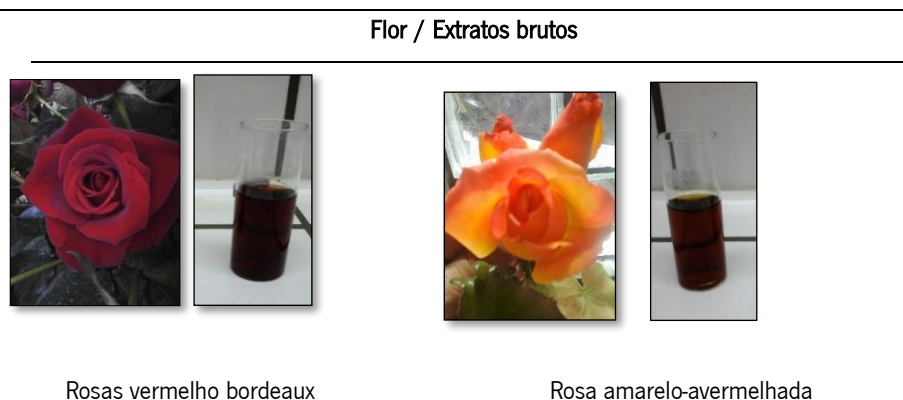
As flores foram sempre colhidas ou adquiridas de véspera. Nas preparações iniciais, as pétalas chegaram a ser previamente trituradas com a trituradora e colocadas a macerar no solvente durante a noite. No entanto, estes procedimentos foram colocados de lado, uma vez que as horas de maceração poderiam levar à alteração das características dos pigmentos. Optou-se por deixar as pétalas resguardadas em papel e preferiu-se a operação manual de trituração, já que esta se mostrou eficaz no processo de extração.

Assim, em geral, as pétalas foram retiradas da flor e acondicionadas entre folhas de papel, para promover a sua secagem durante a noite. Nas horas seguintes, foram cortadas em pequenos fragmentos e trituradas com o solvente de extração. A maceração das pétalas ocorreu ao abrigo da luz durante 20 a 30 minutos, após a qual se realizou uma filtração por gravidade para obtenção dos extratos líquidos.

Após o tempo de maceração referido, os resíduos sólidos mostraram descoloração apreciável e satisfatória. Os extratos líquidos obtidos (**Tabela 13**) apresentaram, geralmente, uma boa coloração.

Cada extrato líquido foi seguidamente analisado por cromatografia em papel, para a caracterização das principais classes de pigmentos presentes na flor.

Tabela 13 - Flores e extratos brutos líquidos.





Amores-perfeitos



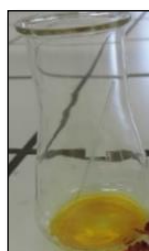
Tagetes laranja-acastanhado



Dália amarela



Dália amarelo-vermelhada



Lantanas amarelo-vermelhadas



Lantanas amarelas



Petúnias



2. Separação Cromatográfica

2.1. Análise dos Pigmentos por Cromatografia em Papel

As separações cromatográficas foram realizadas entre 1 a 6 horas após extração dos pigmentos das pétalas, de forma a evitar a deterioração dos extratos brutos líquidos.

A cromatografia em papel permitiu caracterizar a composição dos extratos líquidos das pétalas, identificando-se as classes de pigmentos presentes em cada flor, através da sua cor e polaridade.

Observou-se o diferente comportamento dos pigmentos em contacto com eluentes de natureza diversa, avaliando a correspondente capacidade de separação.

No sentido de encontrar fases móveis com as características desejadas para a separação das diferentes classes de pigmentos, preparam-se várias câmaras cromatográficas com diferentes misturas de solventes para serem testadas como sistemas de eluentes. As câmaras foram preparadas antes de iniciar a aplicação da amostra no papel de cromatografia, de forma a que a atmosfera da câmara ficasse saturada com os vapores dos solventes para obter uma melhor separação.

A origem celulósica do papel de cromatografia, formado por um polímero linear de glucose com ligações β -1,4-glicosídicas, proporciona uma superfície polar que é similar à da sílica gel usada na cromatografia em camada fina. A água adsorvida pela celulose torna a sua superfície ainda mais polar.

A tabela 14 resume os primeiros resultados obtidos na cromatografia em papel de extratos cetónicos de pétalas de rosas de cor vermelho escuro (bourdeux) e rosas de cor amarelo avermelhadas. Começou-se por utilizar para fase móvel uma mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (EP/Ac) por ter demonstrado deslocar facilmente os carotenoides na cromatografia em papel da folha de planta.⁵⁶ Para deslocar os flavonoides optou-se por recorrer à mistura butanol/ácido acético/água (4:1:5) [BuOH/CH₃COOH/H₂O (4:1:5)], (BAW), por ser a mistura eluente mais frequentemente descrita na literatura para analisar esta classe de pigmentos.^{36,47,56}



A análise dos cromatogramas permitiu relacionar a polaridade com a estrutura dos pigmentos, de modo a identificar as classes de pigmentos presentes e a prever o processo de eluição na cromatografia em coluna.

A mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) não deslocou nenhum dos pigmentos presentes nos dois tipos de rosa, ficando todos retidos no ponto de aplicação. Dado que não se observaram manchas coloridas ao longo do papel, concluiu-se que não existiam pigmentos da família dos carotenoides nos tipos de pétalas das rosas analisadas.

Na câmara BAW todos os pigmentos da rosa amarela foram arrastados, surgindo uma banda amarela na proximidade da frente do solvente e uma outra banda na proximidade do ponto de aplicação.

Na rosa vermelha, observou-se uma única banda rosada. Com base nestes resultados conclui-se que a rosa vermelha contém apenas antocianinas enquanto que a rosa amarela contém essencialmente flavonoides amarelos e algumas antocianinas.

Tabela 14 - Resultados obtidos na cromatografia em papel a partir de extratos de pétalas de rosas.

Flor *	Eluentes		Atribuição da mancha
	EP 40-60°C /Ac (90:10)	BAW *	
Rosas vermelho bordeaux 	Todos os pigmentos retidos no ponto de aplicação.	1 mancha rosada, ligeiramente afastada do ponto de aplicação	Antocianinas
Rosas Amarelo avermelhada * 	Todos os pigmentos retidos no ponto de aplicação.	1 mancha castanha próximo do ponto de aplicação 1 mancha amarela próximo da frente do solvente.	Antocianinas Flavonoides



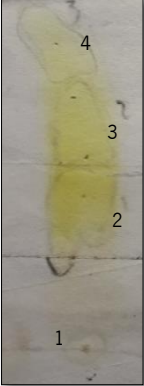
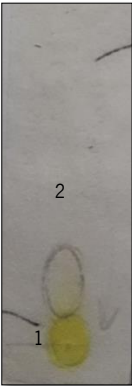
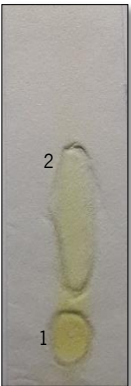
* Extração em acetona; * Flores adquiridas em florista; * BuOH/CH₃COOH/H₂O (4:1:5)

O tempo necessário para a eluição dos pigmentos através do papel foi muito diferente nos dois eluentes. A mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) foi bastante rápida (cerca de 15 minutos), enquanto que a câmara com a mistura BAW necessitou de muito mais tempo (cerca de 2 horas).

Sobre um outro extrato líquido, preparado a partir de uma dália amarela rajada de um tom castanho, por extração das pétalas com acetona comercial, foram realizados cromatogramas em misturas de eluentes diferentes: éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10), BAW, Forestal [CH₃COOH/HCl (conc)/H₂O, (10:3:30)] e água (**Tabela 15**).

Fazendo a leitura da tabela 15, tal como nos pigmentos das rosas, os pigmentos da dália amarela devem pertencer à classe dos flavonoides, uma vez que não foram solubilizados pela mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) e ficaram retidos no ponto de aplicação do cromatograma. Verificou-se ainda que nas duas câmaras mais polares, água e Forestal, estes pigmentos amarelos foram pouco deslocados e deslocaram-se mais na câmara BAW (de menor polaridade). Isto pode significar que os pigmentos da dália, não sendo moléculas apolares, também não são suficientemente polares para serem deslocados pela água e pelo Forestal. Assim as cores da dália podem corresponder a flavonoides amarelos que surgem mais alaranjados devido à presença dos rosados das antocianinas.

Tabela 15 - Cromatograma de um extrato líquido de dalias amarelas com nervuras castanhas eluído com quatro eluentes diferentes.

Flor	Eluentes			
	EP 40-60°C/Ac (90:10)	BAW ^a	Forestal ^b	H ₂ O
Dália (pétalas amarelas com nervuras castanhas) 				
Luz UV	—————	(1) Azul no ponto de aplicação (2) laranja avermelhado; (3) castanho; (4) amarelo brilhante/verde	(1) Amarelo no ponto de aplicação (2) Azul fluorescente extenso	(1) Azul no ponto de aplicação (2) Verde
Vapores NH ₃	—————	(2), (3) laranja (4) amarelo	(1) Laranja na zona amarela do ponto de aplicação	—————

^aBuOH/CH₃COOH/H₂O (4:1:5); ^bCH₃COOH/HCl (conc)/H₂O (10:3:30)

A presença destas duas classes de flavonoides é apoiada pelos azuis fluorescentes que surgem na irradiação com luz UV e pelo vermelho obtido no teste colorimétrico ácido-base, na presença de ácido concentrado.

Nos diferentes cromatogramas realizados observou-se que a mistura eluente BAW não permitia distinguir inequivocamente os carotenoides dos flavonoides, uma vez que davam manchas da mesma cor e deslocamentos não muito diferentes. Esses resultados levaram à preparação de outras misturas eluentes, nomeadamente, as misturas de etanol/vinagre (1:1) e etanol/vinagre (2:1).

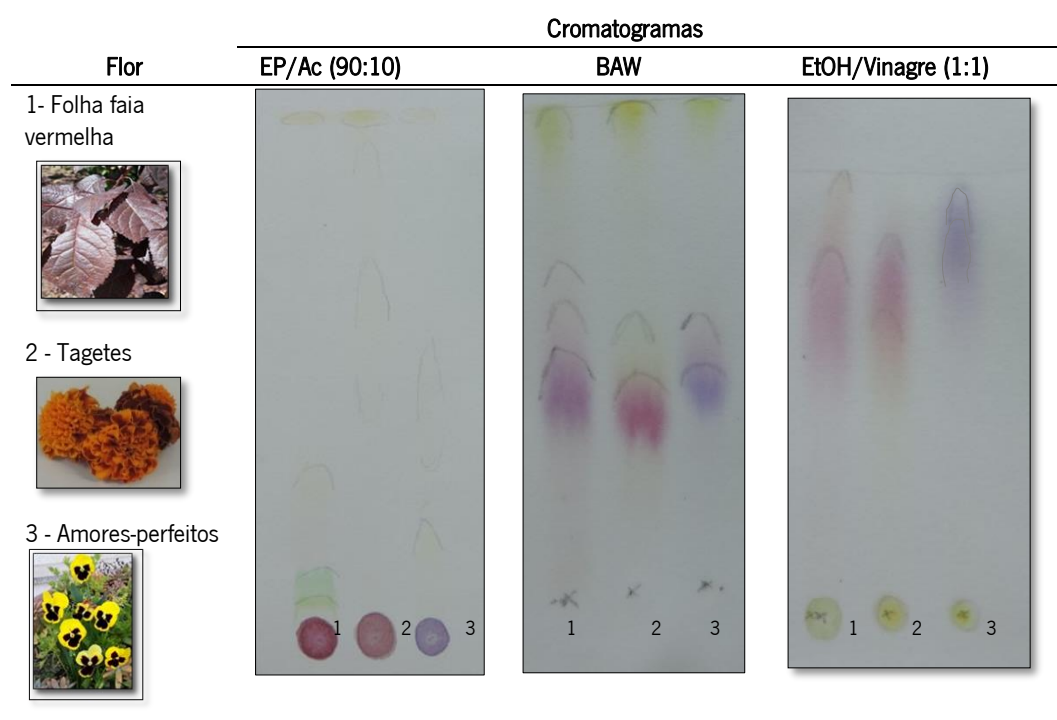
As tabelas 16, 17 e 18 dizem respeito aos resultados obtidos na cromatografia em papel dos pigmentos de outras flores nas câmaras etanol/vinagre (1:1), éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) e BAW. As câmaras Forestal e água foram preteridas, pois a câmara etanol/vinagre (1:1)

tem uma polaridade mais adequada à eluição dos flavonoides e, por isso, com capacidade de separação superior. Para além disso, o etanol e o vinagre são solventes bastante acessíveis e oferecem boas condições de segurança. Na câmara cromatográfica de éter de petróleo 40-60 °C /acetona (90:10) verifica-se sistematicamente que apenas se deslocam os carotenoides, enquanto os flavonoides e antocianinas ficam retidos no ponto de aplicação.

Na câmara de etanol/vinagre (1:1) observou-se que os pigmentos vermelhos das antocianinas e os flavonoides amarelos são deslocados ao longo do papel, enquanto os pigmentos amarelos da classe dos carotenoides ficam retidos no ponto de aplicação. Assim, uma vez que a ordem de eluição dos pigmentos na câmara cromatográfica de etanol/ vinagre (1:1) é contrária à ordem de eluição na câmara de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10), os resultados obtidos complementam-se. Deste modo, a análise dos pigmentos nestas duas câmaras permite a identificação da classe dos pigmentos presentes num determinado extrato, sendo particularmente útil para distinguir flavonoides de carotenoides.

A câmara BAW, com maior capacidade separativa, permite a caracterização total dos diferentes pigmentos.

Tabela 16 - Cromatogramas de extratos de: (1) Folha de faia vermelha, (2) Tagetes, (3) Amores-perfeitos. **Câmaras:** EP/Ac (90:10); BAW; EtOH/Vinagre (1:1).



Assim, pela análise dos cromatogramas apresentados na tabela 16, verifica-se a presença de carotenoides amarelos em todas as flores em estudo, uma vez que os cromatogramas obtidos na câmara de éter de petróleo/acetona (90:10) apresentam bandas amarelas muito tênues que migraram na frente do solvente e que são características da presença de carotenoides. Estas desapareceram do papel ao fim de algum tempo, apresentando-se mais visíveis no início da eluição. Na câmara etanol/vinagre (1:1) estes pigmentos amarelos surgem junto ao ponto de aplicação, confirmando-se a atribuição destas bandas à classe dos carotenoides.

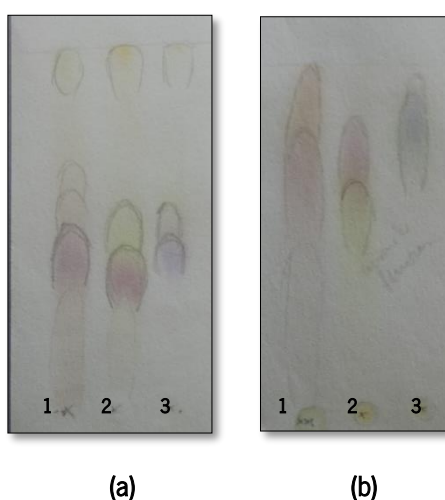


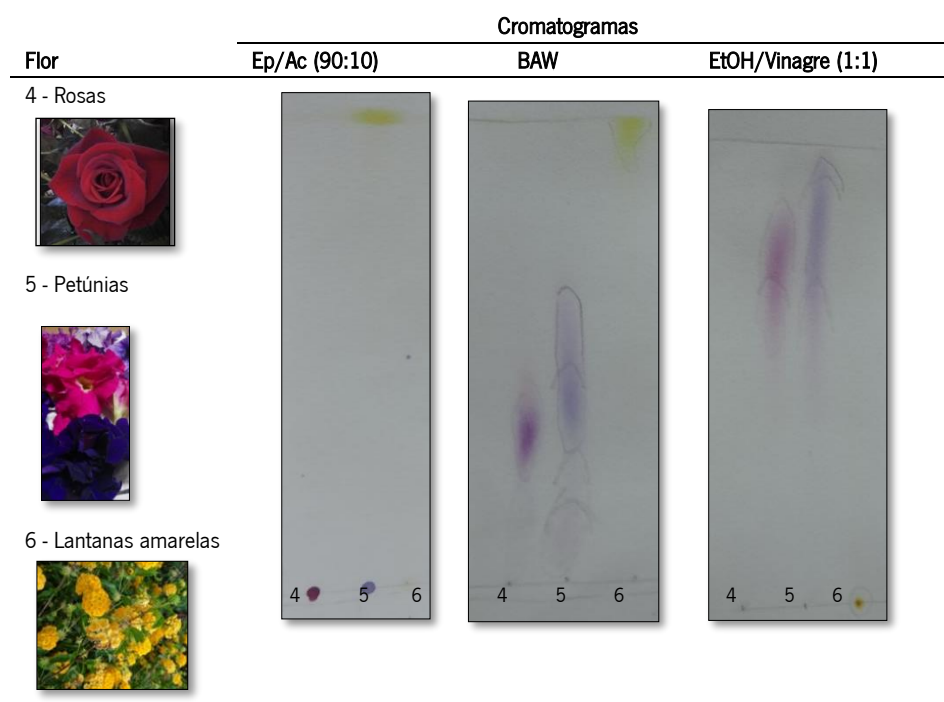
Figura 31– Cromatogramas revelados com vapores de amoníaco. Extratos de: (1) folha de faia vermelha, (2) tagetes, (3) amores-perfeitos em câmaras (a) BAW; (b) EtOH/vinagre (1:1).

As manchas de cor rosa e violeta deverão corresponder a antocianinas uma vez que não são deslocadas na câmara de éter de petróleo 40-60 °C/acetona e migram consideravelmente na câmara BAW e mais ainda na câmara de etanol/vinagre. Estas atribuições são apoiadas pela utilização do extrato da folha de faia vermelha como padrão de carotenoides e da antocianina cianidina.

Os cromatogramas da tabela 17 permitiram detetar a presença de antocianinas nas pétalas de petúnias e rosas, uma vez que surgem mais deslocados nas câmaras mais polares e retidos na câmara de éter de petróleo. Os cromatogramas das lantanas amarelas evidenciam carotenoides, uma vez que as manchas amarelas características se deslocaram na frente do solvente nas câmaras mais apolares (éter de petróleo 40-60 °C/acetona e BAW) e ficam retidos no ponto de aplicação na câmara mais polar (etanol/vinagre).

Tabela 17 - Cromatogramas de extratos de flores: (4) Rosas, (5) Petúnias, (6) Lantanas.

Câmaras: EP/Ac (90:10); BAW; EtOH/Vinagre (1:1).



Ao colocar o papel sob os vapores de amoníaco, figura 32, surge uma mancha amarela na câmara de etanol/vinagre que não tinha sido observada sob luz visível, indicando a presença de flavonoides amarelos, mais polares. Os verdes e os azuis fluorescentes indicam a presença de antocianinas.

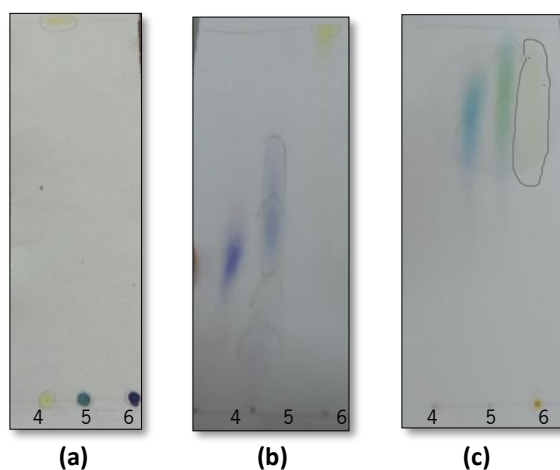
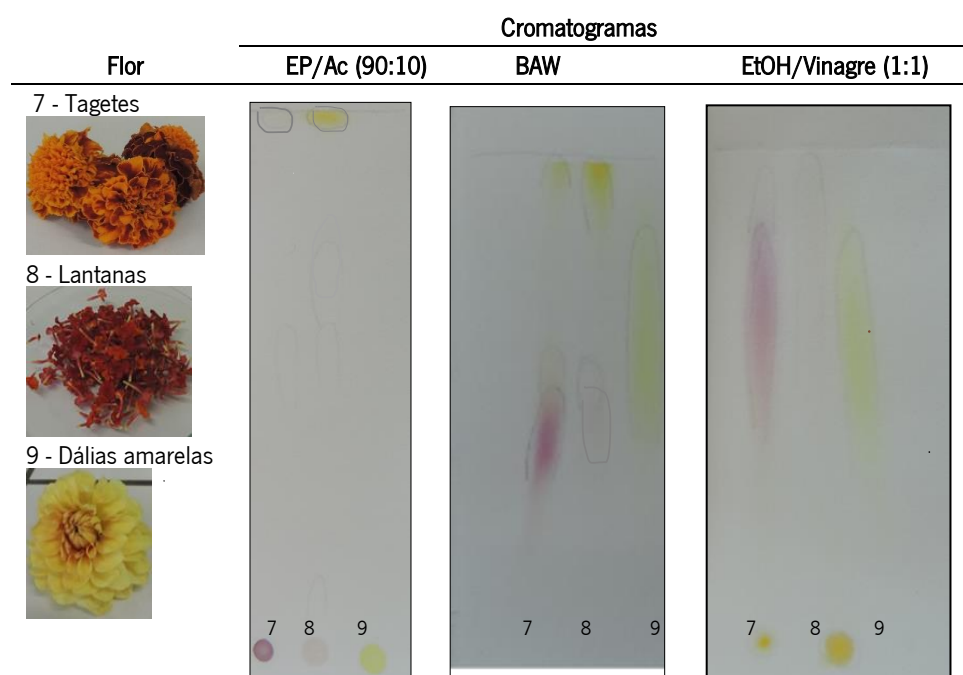


Figura 32 - Cromatogramas revelados com vapores de amoníaco. Extratos de: (4) rosas, (5) petúnias e (6) lantanas, em câmaras (a) Ep/Ac (90:10); (b) BAW; (c) EtOH/vinagre (1:1).

Os cromatogramas da tabela 18 confirmam que o amarelo das dalias não é devido à presença de carotenoides, mas sim de flavonoides, uma vez que as manchas amarelas são retidas na câmara de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) e deslocados nas câmaras mais polares. Já para os tagetes e lantanas, verifica-se que os pigmentos amarelos comportam-se de forma contrária aos amarelos das dalias nas três câmaras, indicando a presença de carotenoides. Pode ainda confirmar-se a presença de antocianinas nos tagetes e nas lantanas amarelo-avermelhadas.

Tabela 18 – Cromatogramas de extratos de flores: (7) Tagetes, (8) Lantanas amarelo-avermelhada, (9) Dalias amarelas. **Câmaras:** EP/Ac (90:10); BAW; EtOH/Vinagre (1:1)



Nos cromatogramas dos tagetes, obtidos nas câmaras BAW e etanol/vinagre (1:1), a mancha rosada atribuída aos pigmentos antociânicos parece estar sobreposta a uma outra mancha mais lilás da qual não se separou completamente. Esta sobreposição foi confirmada quando se colocaram os cromatogramas sob os vapores de amoníaco (**Figura 33**), distinguindo-se duas manchas diferentes, uma azul e outra verde.

Verifica-se ainda que a exposição aos vapores de amoníaco (**Figura 33**) revelou o alaranjado característico dos flavonoides, intensificado na luz UV, para além dos amarelos e verdes fluorescentes característicos dos restantes flavonoides.

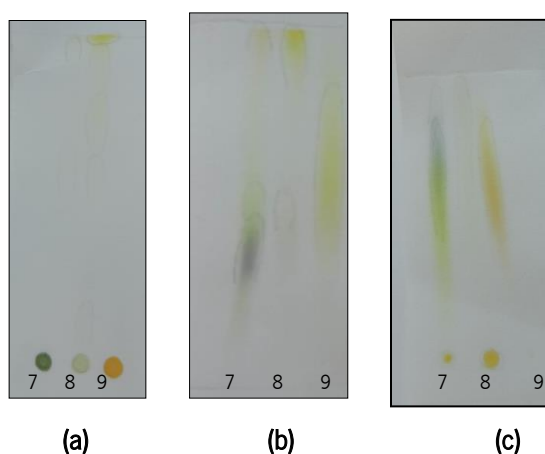


Figura 33 – Cromatogramas revelados com vapores de amoníaco. Extratos de (7) tagetes, (8) lantanas e (9) dalias amarelas, em câmaras (a) EP/Ac; (b) BAW; (c) EtOH/vinagre (1:1).

Com base nos resultados obtidos, pode afirmar-se que a cromatografia em papel realizada nas câmaras de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) e etanol/vinagre (1:1) permite identificar com bastante rigor as famílias dos pigmentos presentes em pétalas de flores.

Em paralelo, os extratos foram sempre analisados na câmara BAW, dado que este é o eluente mais utilizado nos trabalhos publicados na literatura. Na tentativa de comparar os resultados obtidos neste eluente com os dados reportados na literatura, foram também calculados os valores do Fator de Retenção (R_f) dos componentes dos extratos analisados, os quais se encontram resumidos na tabela 19.

Tabela 19 – Resultados obtidos na CP de extratos de flores e classes de pigmentos atribuídas.

Mancha no Cromatograma (luz visível)	$R_f \times 100$ (BAW)	Luz UV	Vapores NH_3	Pigmento/Flor
Rosada/lilás	19 15	Púrpura escuro	Rosa ténue/azul	Antocianinas / Rosas bourdeux e folha
Vermelha	36	Amarelo/verde	Amarelo/laranja	Antocianinas /
Castanha	38	Fluorescente		Folha, lantanas, dalias
Magenta	35 40	Azul	Verde	acastanhadas, tagetes
Rosa/lilás	53 51	Púrpura/amarelo fluorescente	Azul	Antocianinas /Folha, amores-perfeitos, petúnias
Amarela	50 59 54	Amarelo fluorescente Laranja/verde fluorescente	Amarelo, laranja/vermelho, castanho	Flavonoides /Dalias, tagetes
Amarela	93 94 88	Amarelo brilhante/verde fluorescente	Laranja	Flavonoides, Carotenoides /Folha, rosas amarelo-avermelhadas lantanas, amores-perfeitos

Verifica-se que, de um modo geral, os valores de R_f obtidos se comparam com os descritos por Harborne. Por outro lado, conjugando estes valores com os resultados obtidos na revelação das manchas com os vapores de amoníaco, pode comprovar-se a atribuição das manchas obtidas às diferentes classes de pigmentos.

2.2. Cromatografia em Coluna de Extratos de Flores

Neste trabalho pretendeu-se adaptar à separação dos pigmentos presentes nas pétalas de flores, uma coluna anteriormente desenvolvida para separação dos pigmentos das folhas.^{47,56}

As colunas utilizadas foram seringas descartáveis de 50 e 100 mL. Foi utilizado o amido de batata para a fase estacionária, uma vez que nos trabalhos anteriores este adsorvente mostrou ser um bom material alternativo dado que, para além de ser amigo do ambiente, apresentou uma elevada eficiência na separação de pigmentos de plantas.

Nas colunas realizadas em seringas de 50 mL, o empacotamento da fase estacionária foi realizado a seco, após o qual se fez a passagem de um volume do primeiro eluente da série eluotrópica, geralmente o éter de petróleo (pré-eluição).

Nas colunas em seringas de 100 mL, optou-se por introduzir a fase estacionária na forma de suspensão de amido, preparada imediatamente antes de iniciar a eluição, para evitar a pré-eluição. O extrato sólido de cada flor foi obtido adicionando ao extrato líquido o amido de batata e o sulfato de sódio anidro na proporção 2:1 (m/m), o que originou uma amostra seca e solta que foi aplicada sobre a fase estacionária.

Na eluição dos pigmentos optou-se, em geral, pela utilização de uma série completa de eluentes com polaridade crescente, para garantir a separação de pigmentos de polaridades diferentes e desenvolver um procedimento de eluição universal para todas as flores.


2.2.1. Pigmentos de Pétalas de Rosas Amarelo-avermelhadas e Rosas Bordeaux

A análise dos extratos líquidos de rosas, por cromatografia em papel, evidenciou unicamente a presença de pigmentos da classe dos flavonoides. Dependendo da cor da flor, foi possível identificar antocianinas e outros flavonoides amarelos.

No primeiro ensaio realizado em seringa de 50 mL, coluna de flores 1 (C_{F1}), utilizou-se um extrato sólido de **rosas amarelo avermelhadas**. O extrato líquido foi obtido por maceração das pétalas em etanol, durante a noite, e o extrato sólido foi preparado pela adição de uma porção de fécula de

batata ao extrato líquido. Neste ensaio pretendeu-se fazer uma primeira avaliação da separação dos pigmentos presentes nesta amostra com a série de eluentes escolhidos. (Tabela 20).

Tabela 20 – Eluição de pigmentos de rosas amarelo-avermelhadas^{a,b} em seringa de 50 mL (C_{F1}).

Flor	Eluentes – C _{F1}	Bandas
	(1) Éter de petróleo 40-60°C (pré-eluição) ^c	—————
	(2) Éter de petróleo 40-60°C/Acetona (75:25)	Não observada
	(3) Éter de petróleo 40-60°C /Acetona (50: 50)	Não observada
	(4) Acetona	Não observada
	(5) Etanol	Amarela ténue

^a Solvente de extração: etanol; ^b Adquiridas em florista; ^c imediatamente antes da colocação do EB

A eluição com misturas éter de petróleo 40-60 °C/acetona, em diferentes proporções, ou mesmo com a acetona, não arrastou bandas coloridas ao longo da coluna. As frações eluídas apresentaram-se praticamente incolores.

Neste ensaio, verificou-se que o tempo necessário para a passagem do etanol através da coluna de amido aumentou relativamente ao tempo de eluição com eluentes menos polares.

No ensaio seguinte (Tabela 21, C_{F2}), foram preparados extratos das mesmas **pétalas de rosas amarelo-avermelhadas**, utilizando-se como solvente de extração a acetona e não o etanol. Optou-se ainda por prescindir da passagem da mistura éter de petróleo 40-60 °C /acetona (75:25) dado que, nas colunas anteriores a fração resultante foi incolor. À passagem da mistura de éter de petróleo 40-60 °C /acetona (50:50) observou-se o deslocamento de uma banda de cor amarela suave. Seguiu-se uma banda castanha, eluída pela acetona, da qual resultou uma fração líquida acastanhada. O etanol deslocou uma banda praticamente incolor que não avermelhou em meio ácido.

Tabela 21 - Eluição de pigmentos de rosas amarelo- avermelhadas^{a,b}; coluna em seringa de 50 mL (C_{F2}).

Eluentes (C _{F2})	Bandas
(1) Éter de petróleo 40-60°C (pré-eluição) ^c	—————
(2) Éter de petróleo 40-60°C /Acetona (50:50)	Amarelo ténue
(3) Acetona	Castanha
(4) Etanol	Não observada
(5) Etanol/Água	Rosada

^a Extração: acetona; ^b Adquiridas em florista; ^c imediatamente antes da colocação do EB

Considerando que os pigmentos avermelhados retidos no topo da coluna poderiam não ser solúveis em etanol, adicionou-se uma mistura de etanol/água. Observou-se então o deslocamento de uma banda rosa, recolhida sob a forma de uma solução quase incolor, mas que avermelhou em meio ácido (HCl). Estes resultados demonstram que os pigmentos presentes nas pétalas de rosas são da classe das antocianinas. Verificou-se, no entanto, que estas antocianinas não foram deslocadas pela acetona, tal como tinha acontecido com as antocianinas presentes nas folhas, exigindo uma mistura de eluentes mais polar (etanol/água). Esta diferença de polaridade pode estar relacionada com o número de unidades de açúcar ligados à antocianidina.

Nos ensaios seguintes partiu-se de **rosas vermelho bordeaux**. As condições utilizadas para a separação dos pigmentos destas rosas foram selecionadas tendo em conta os resultados obtidos com as rosas amarelo-avermelhadas.

Assim, a primeira coluna (C_{F3}) foi preparada com um extrato sólido de pigmentos de rosas bordeaux (Tabela 22), obtido por extração com acetona. Na eluição da coluna, foi deslocada uma fração incolor com a mistura éter de petróleo/acetona (1:1), uma fração castanha com a acetona e uma fração incolor com etanol.

Tabela 22 - Eluição de pigmentos de rosas vermelho bordeaux ^{a,b} em seringa de 50 mL (C_{F3})

Eluentes (C _{F3})	Bandas
(1) Éter de petróleo 40-60°C (pré-eluição) ^c	_____
(2) Éter de petróleo 40-60°C /Acetona (1:1)	Não observada
(3) Acetona	Castanha
(4) Etanol	Não observada
(5) Etanol/Água	Levemente rosada
(6) Água	Rosada

^a Extração: acetona; ^b Adquiridas em florista; ^c imediatamente antes da colocação do EB

Em seguida, a mistura etanol/água (1:1) eluiu uma banda rosa mais ténue. Uma outra banda de cor rosa mais intenso foi eluída com a água. Estas duas frações devem, no entanto, conter o mesmo pigmento, que foi mais deslocado a partir do momento em que se introduziu a água pura. A maior limitação destes ensaios foi o facto da passagem do etanol e da mistura etanol/água terem sido extremamente demoradas, dada a elevada afinidade destes solventes para o amido da fase estacionária.

Realizou-se mais um ensaio com rosas **vermelho bordeaux** (C_{F4}) aplicando a série de eluentes do ensaio anterior e os resultados encontram-se resumidos na tabela 23. Nesta separação, recolheu-se uma primeira fração rosada na eluição com a acetona, ficando retida no topo da coluna uma

outra banda rosada que só foi deslocada na eluição com a água. Entre estas duas eluições passou-se etanol, mas não foram deslocadas antocianinas. No entanto, poderiam ter sido solubilizados flavonoides incolores. Não se detetaram carotenoides visíveis, uma vez que na eluição das primeiras frações com éter de petróleo ou misturas de éter de petróleo/acetona não se observou nenhuma coloração.

Todas as frações recolhidas foram submetidas a testes colorimétricos ácido-base (**Tabela 23**) para pesquisa de flavonoides e antocianinas. Para a pesquisa de antocianinas, investigou-se o aparecimento de coloração vermelha por adição de solução aquosa de HCl e o aparecimento de coloração azul, por adição de soluções de hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃) ou amoníaco (NH₃). Investigou-se também o efeito da adição de uma solução aquosa de hidróxido de sódio, NaOH, uma vez que revela a presença de flavonoides levando ao aparecimento de uma cor amarela intensa.

Tabela 23 - Frações de pigmentos de rosas vermelho bordeaux eluídas em seringa de 50 mL (C_{F4}).
Testes colorimétricos ácido-base.

	Eluentes (C _{F4})				
	EP/Ac (1:1)	Ac	EtOH	EtOH/H ₂ O(1:1)	H ₂ O
Fração eluída					
Teste colorimétricos ácido-base					

(1) HCl 0,75 M; (2) NaHCO₃ 0,25 M; (3) NH₃; (4) NaOH 1,5 M

Quando adicionadas umas gotas de amônia à fração eluída com a água, esta apresentou cor verde e não azul, como seria de esperar, evidenciando que as frações não contêm apenas antocianinas. Na presença de flavonoides amarelos, a cor azul ficou mascarada e observou-se cor verde. Assim, concluiu-se que esta fração seria composta por antocianinas, possivelmente diglicosiladas, e flavonoides incolores.

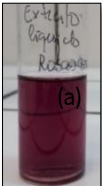

Dado que todos os ensaios anteriores foram caracterizados por tempos excessivamente longos, nos ensaios seguintes decidiu-se fazer alguns reajustamentos, não só a nível da volumetria da coluna

como também na escolha da série de eluição. Assim, usou-se uma seringa de 100 mL em vez de 50 mL e reduziu-se também a altura da fase estacionária. O etanol foi retirado, dado que durante a eluição das colunas anteriores não se observou nenhuma banda de pigmentos e as frações recolhidas foram sempre incolores. A passagem da água foi substituída por uma mistura de água com a acetona, para diminuir a polaridade do eluente e assim melhorar o tempo de eluição de antocianinas, sem constrangimentos para a solubilização de outros pigmentos.

Na última coluna preparada (C_{F5}), as condições foram otimizadas selecionando uma série de eluição que inclui apenas (Tabela 24) duas misturas de éter de petróleo 40-60 °C e acetona. O objetivo foi criar uma série de eluição completa que pudesse ser aplicada a uma gama alargada de flores, servindo também para investigar a presença de outras classes de pigmentos.

Como se pode observar na tabela 24, a eluição dos pigmentos das rosas ao longo da coluna foi mais rápida, comprovando que foi beneficiada pelos reajustamentos introduzidos.



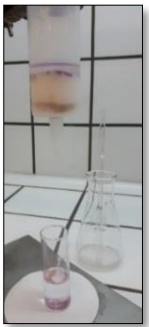

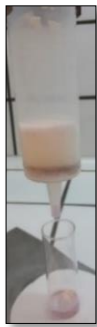
Tabela 24 - Eluição de pigmentos de rosas vermelho bordeaux, em seringa de 100 mL (C_{F5}).

Extratos		Eluentes (C _{F5})	Volume (mL)	Tempo (min)
líquido	sólido			
		(1) Éter de petróleo /Acetona (90:10)	12	4
		(2) Éter de petróleo/Acetona (75:25)	16	3
		(2) Acetona	22	15
		(3) Acetona/Água (1:1)	20	20

• Extração: acetona

Na coluna apenas se observaram duas bandas, uma ligeiramente rosada, muito tênue, deslocada pela acetona e outra muito corada de rosa que só foi eluída com a mistura acetona/água (1:1) (Tabela 25).

Tabela 25 –Eluição de pigmentos de rosas vermelho bordeaux em seringa de 100 mL (C_{F5}).

Eluentes				
EP/Ac (90:10)	EP/Ac (75:25)	Ac	Ac/H ₂ O (1:1)	
				

A análise por cromatografia em papel (câmara BAW) das frações recolhidas (**Figura 34**) demonstrou a presença de antocianinas nas amostras da fração eluída com acetona (fração 3) e da fração deslocada com acetona/água (1:1) (fração 5) através da sua cor vermelha característica em meio ácido.

Esta atribuição foi confirmada por exposição do cromatograma obtido aos vapores de amoníaco, uma vez que as manchas de cor vermelha ficaram azuis. Foi possível verificar ainda o aparecimento de manchas amarelas, ligeiramente mais deslocadas do que as antocianinas por irradiação dos cromatogramas com luz UV.

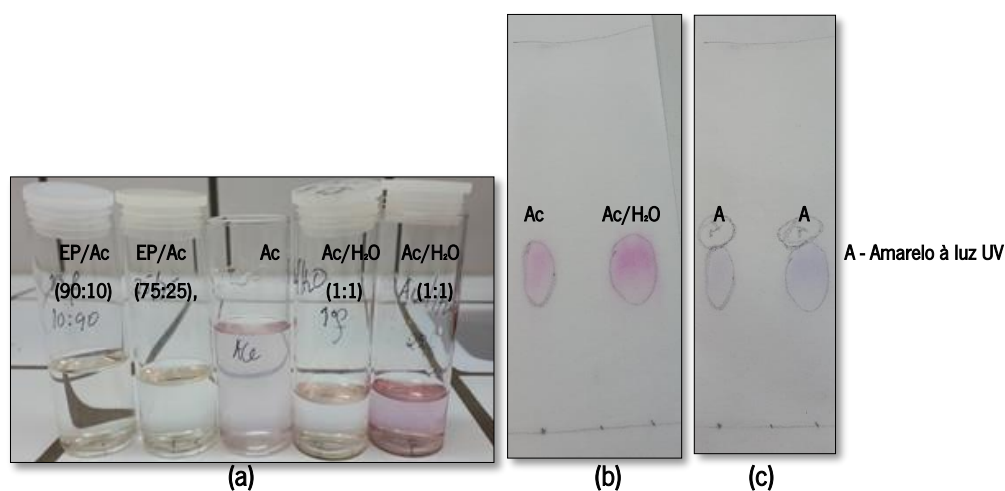


Figura 34 - (a) Frações de pigmentos de rosas bordeaux (C_{75}); (b) Cromatograma em câmara BAW das frações de acetona e acetona/água (1:1); (c) Cromatograma com vapores de NH_3 e luz UV.

Junto das manchas rosadas das antocianinas, observou-se uma zona amarela muito definida que surgiu por irradiação com luz UV. Estas manchas amarelas foram atribuídas à presença de flavonoides.

Realizaram-se ainda os testes colorimétricos das frações recolhidas (**Figura 35**) com soluções de ácido clorídrico, hidrogenocarbonato de sódio e hidróxido de sódio.

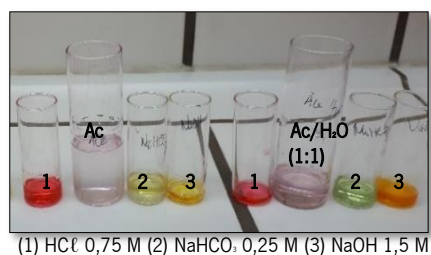


Figura 35 - Testes colorimétricos ácido-base das frações de pigmentos eluídas da coluna de rosas vermelho bordeaux.

O aparecimento de cor vermelho no teste do HCl e azul/verde no teste do hidrogenocarbonato de sódio confirmou a presença de antocianinas. O aparecimento de cor laranja acastanhado no teste do hidróxido de sódio confirmou a presença de flavonoides.

Após análise dos resultados, conclui-se que as pétalas de rosa possuem pigmentos da classe dos flavonoides, nomeadamente flavonoides amarelos e antocianinas.

A série de eluição utilizada nesta coluna mostrou-se perfeitamente adaptada em termos de tempo, eluentes e materiais utilizados à implementação em contexto de uma sala de aula.

2.2.2. Pigmentos de Pétalas de Amores-Perfeitos

Para a separação dos pigmentos presentes nas pétalas dos amores-perfeitos prepararam-se diferentes colunas, fazendo-se variar os solventes escolhidos para a série eluotrópica.

De acordo com os resultados previamente obtidos na análise do extrato líquido dos amores, por cromatografia em papel, a presença de carotenoides amarelos, menos polares, levou a que as séries de eluentes selecionadas para a coluna de cromatografia contemplasse eluentes apolares. Introduziu-se um solvente de polaridade intermédia, o acetato de etilo, na tentativa de que este deslocasse os flavonoides separadamente das antocianinas.

Começou-se por dois primeiros ensaios paralelos, realizados em seringas de 100 mL (C_{F6} e C_{F7}), para testar as condições de eluição dos pigmentos presentes utilizando eluentes escolhidos para o efeito (**Tabela 26**).

Tabela 26 - Eluição dos pigmentos de um extrato de amores-perfeitos ^{ab} em seringa de 100 mL (C_{F6} e C_{F7}).

Eluentes	Volume (mL)	
	C_{F6}	C_{F7}
(1) Éter de petróleo 40-60 °C	30	25
(2) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (90:10)	20	30
(3) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (75: 25)	10	10
(4) Acetato etilo	20	20
(5) Acetato etilo/Acetona (75:25)	-	20
(6) Acetona	40	40
(7) Água	20	20

Nesta eluição observou-se um deslocamento rápido de bandas de pigmentos amarelos mas, tal como já era esperado, os tempos de eluição foram aumentando à medida que aumentou a polaridade do eluente e verificou-se um atraso significativo na eluição com a água (cerca de 1 h).

Não foram contabilizados os tempos de eluição e, por isso, foi realizado mais um ensaio nas condições da coluna C_{F7} , medindo também os tempos de eluição (**Tabela 27**).

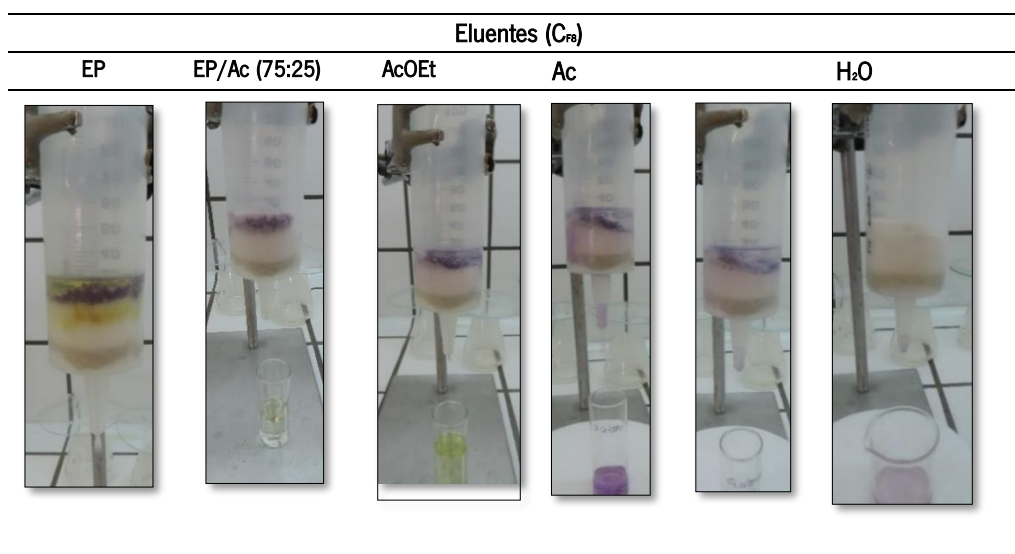
Tabela 27 - Eluição de pigmentos de um extrato sólido de amores-perfeitos ^{a,b} em seringa de 100 mL (C_{F8})

Eluentes (C_{F8})	Volume (mL)	Tempo (min)
(1) Éter de petróleo 40-60 °C	29	3
(2) Éter de petróleo/Acetona (90:10)	31	10
(3) Éter de petróleo/Acetona (75: 25)	10	8
(4) Acetato etilo	20	5
(5) Acetato etilo/Acetona (75:25)	20	13
(6) Acetona	40	10
(7) Água	30	50

^aExtração: acetona, ^b flor de jardim

Na coluna observou-se o deslocamento de bandas de pigmentos de cor amarelo forte e duas bandas de cor lilás, durante a eluição com éter de petróleo, acetona e água, respetivamente (**Tabela 28**). Verificou-se que os amarelos, mais apolares, foram eluídos com éter de petróleo e o acetato de etilo eluiu uma fração de uma cor amarelo mais ténue, cuja banda foi praticamente impercetível, suspeitando-se da presença de pigmentos amarelos da classe dos flavonoides, uma vez que apenas foram visíveis como amarelos fluorescentes na luz UV. A introdução de uma mistura da acetona com o acetato de etilo levou à eluição de uma fração cuja cor indicou a presença de antocianinas (lilás muito ténue). A eluição da primeira banda de cor lilás ocorreu com a acetona, sendo que a banda lilás mais retida na coluna foi eluída pela água. Na figura 36 são apresentadas as imagens das frações recolhidas neste ensaio.

Tabela 28 – Bandas de pigmentos de amores-perfeitos em seringa de 100 mL (C_{F8})



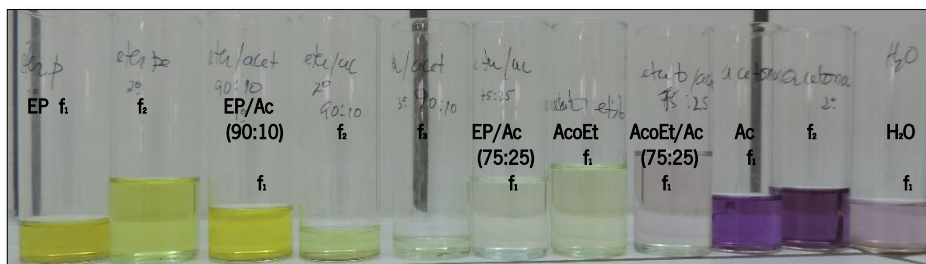


Figura 36 - Frações de pigmentos de amores-perfeitos eluídas em seringa de 100 mL (C_{F8}):

EP (f_1 e f_2); EP/Ac (90:10) (f_1, f_2 e f_3); EP/Ac (75: 25(f_1); AcOEt (f_1); AcOEt/Ac (75:25)(f_1); Ac (f_1 e f_2); H_2O (f_1)(Tabela 28).

As frações eluídas foram analisadas através de testes colorimétricos realizados com ácido (HCl, 0,75 M) e bases (NaHCO₃, 0,25 M e NaOH, 1,5 M). Os resultados dos testes são apresentados na tabela 29. A fração recolhida com acetato de etilo não apresentou a cor vermelha característica do catião flavílium quando a solução foi acidificada, sugerindo que este solvente não solubilizou as antocianinas (Tabela 29, a1). No entanto, obteve-se uma cor vermelha muito intensa e indicativa de uma maior concentração de antocianinas nas frações eluídas com acetona ou água (Tabela 29, b1, c1 e d2). Na presença de uma solução diluída de bicarbonato de sódio (Tabela 29, c2 e d2) observou-se uma cor verde sugerindo que estas mesmas frações, para além de antocianinas, deveriam conter ainda outros flavonoides amarelos.

Tabela 29 - Testes colorimétricos ácido-base das frações eluídas da coluna de amores-perfeitos (C_{F8}).

Fração de			
AcOEt	AcOEt/Ac (75:25)	Ac	H ₂ O
<p>(a)</p>	<p>(b)</p>	<p>(c)</p>	<p>(d)</p>
(1) HCl 0,75 M; (2) NaHCO 0,25 M; (3) NaOH 1,5 M			

No passo seguinte, preparou-se uma outra coluna (C_{F9}) e procedeu-se à eluição dos pigmentos do extrato de amores-perfeitos, eliminando a passagem do etanol e do acetato de etilo. Os resultados, apresentados na tabela 30, confirmaram que esta opção permitiu melhorar significativamente o tempo total de passagem dos eluentes. A última fração de antocianinas, apenas deslocada pela

água e normalmente mais demorada, foi eluída mais rapidamente (em cerca de metade do tempo) pela substituição da água por uma mistura de acetona/água.

Tabela 30- Eluição dos pigmentos de um extrato de amores-perfeitos ^{ab} em seringa de 100 mL (C₁₉).

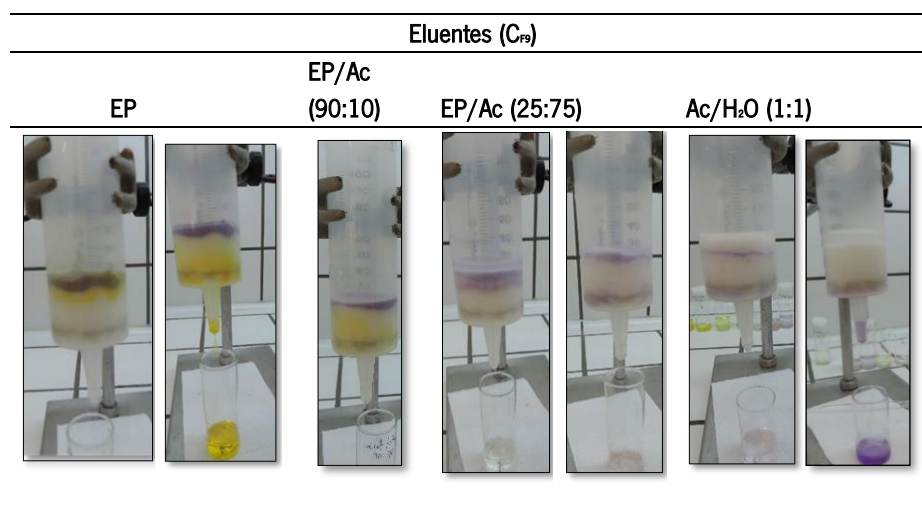
Eluentes (C ₁₉)	Volume (mL)	Tempo (min)
(1) Éter de petróleo 40-60°C	30	3
(2) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (90:10)	20	5
(3) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (75:25)	20	5
(4) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (50:50)	20	8
(5) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (25:75)	25	10
(6) Acetona	20	10
(7) Acetona/Água (1:1)	25	25

^aExtração: acetona, ^b flor de jardim

Estes resultados demonstram que o método melhorou bastante, em termos de tempo e consumo de solventes, otimizando-se assim o processo.

A tabela 31 apresenta as imagens das bandas coloridas eluídas na coluna e as respectivas frações recolhidas (**Figura 37**).

Tabela 31 – Bandas de pigmentos de amores-perfeitos em seringa de 100 mL (C₁₉).



Nestas imagens pode observar-se que o éter de petróleo 40-60 °C eluiu uma primeira banda de cor amarelo muito intenso, que deveria conter carotenos.

As frações resultantes da eluição com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) devem conter pigmentos da classe dos carotenoides, uma vez que na cromatografia em papel os pigmentos amarelos não foram deslocados pelo eluente.

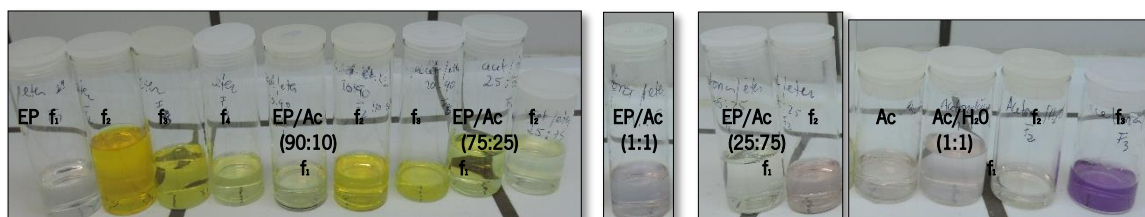
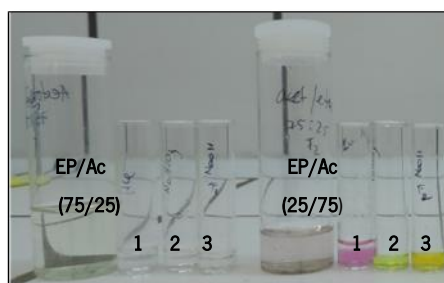


Figura 37 - Frações de pigmentos de amores-perfeitos eluídas em seringa 100 mL (C_{FR}): EP (f_1, f_2, f_3 e f_4); EP/Ac (90:10) (f_1, f_2 e f_3); EP/Ac(75:25) (f_1, f_2); EP/Ac(1:1); EP/Ac (25:75) (f_1, f_2); Ac; Ac/água (1:1) (f_1, f_2 e f_3).

A mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) deslocou uma segunda banda amarela que poderá conter pigmentos da classe das xantofilas.

A acetona eluiu uma banda lilás e uma outra banda lilás ficou retida sendo seguidamente deslocada com uma mistura de acetona/água (1:1).

Os testes colorimétricos ácido-base (**Figura 38**) confirmaram que foi eluída uma antocianina com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75), pois a solução avermelhou quando se adicionou HCl, reação característica da presença do catião flavílio.



(1) HCl 0,75 M; (2) NaHCO₃ 0,25 M; (3) NaOH 1,5 M

Figura 38 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações de pigmentos eluídos da coluna de amores-perfeitos com EP/Ac (75:25) e EP/Ac (25:75).

Na fração eluída com a mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) esta alteração de cor não se observou, concluindo-se que esta mistura de eluentes não desloca antocianinas (**Figura 39**).

Confirmou-se ainda a presença de antocianinas na fração eluída com acetona e acetona/água (1:1) pelo aparecimento de cor vermelha em meio ácido.

A cor verde das mesmas frações (**Figura 39**) em meio moderadamente alcalino são indicativas da presença de outros flavonoides, para além das antocianinas.

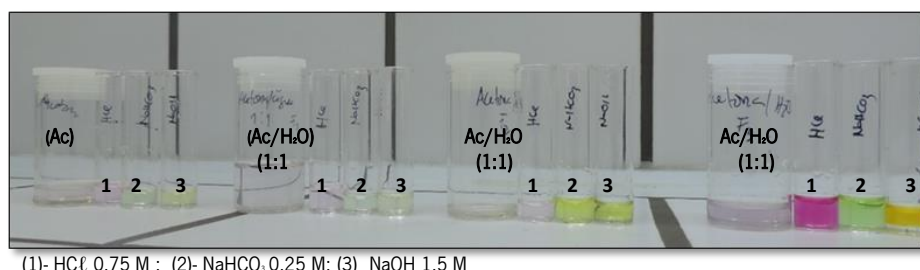


Figura 39 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações de pigmentos eluídos com acetona e acetona/H₂O (1:1).

Com base nos resultados obtidos pode afirmar-se que, nas pétalas dos amores-perfeitos podem ser encontrados pigmentos da classe dos flavonóides e pigmentos da classe dos carotenoides.

2.2.3. Pigmentos de Pétalas de Petúnias

O método desenvolvido foi ainda utilizado para analisar os pigmentos presentes em pétalas de petúnias. Foi preparado um extrato sólido por maceração de uma mistura de pétalas de petúnias em acetona. Seguidamente realizou-se a separação em coluna (C_{F10}) nas condições anteriormente otimizadas para os amores-perfeitos (**Tabela 32**). Prescindiu-se apenas da passagem com éter de petróleo puro, tendo em consideração que a análise do extrato por cromatografia em papel revelou apenas a presença de antocianinas. Os tempos de eluição das bandas separadas foi contabilizado e, como pode ser observado na tabela 32, este procedimento revelou-se bastante rápido.

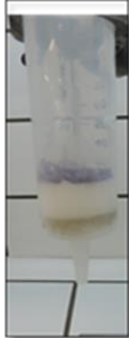




Tabela 32 - Eluição de pigmentos de um extrato sólido de petúnias ^{ab} em seringa de 100 mL (C_{F10})

Eluentes (C_{F10})	Volume (mL)	Tempo (min)
(1) Éter de petróleo 40-60 °C / Acetona (90:10)	10	4
(2) Éter de petróleo 40-60 °C / Acetona (75:25)	15	10
(3) Éter de petróleo 40-60 °C / Acetona (25:75)	25	15
(4) Acetona	30	20
(5) Acetona/Água (1:1)	30	20

^aExtração: acetona, ^b flor de jardim

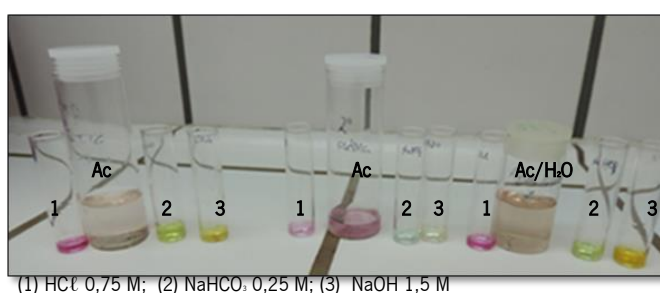
As duas primeiras frações, eluídas com as duas misturas de éter de petróleo 40-60 °C/acetona apresentaram-se incolores, comprovando que não estavam presentes pigmentos de menor polaridade (**Tabela 33**).

Tabela 33 - Eluição dos pigmentos de petúnias em seringas de 100 mL (C_{F10}).

Eluentes (C_{F10})				
EP/Ac (90:10)	EP/Ac (75:25)	EP/Ac (25:75)	Ac	Ac/H ₂ O (1:1)
				

Misturas de éter de petróleo com concentrações mais elevadas de acetona deslocaram uma primeira banda colorida das petúnias, mas esta só foi totalmente eluída com a introdução da acetona pura. A mistura de acetona/água (1:1) arrastou completamente a última fração de antocianinas (**Tabela 33**).

A presença de antocianinas foi comprovada pelos testes colorimétricos ácido-base, realizados sobre as frações de pigmentos recolhidas com a acetona e com a mistura de acetona/água (1:1), uma vez que estas frações avermelharam na presença de ácido clorídrico (**Figura 40**). Pode observar-se ainda que a segunda fração de pigmentos eluídos com acetona deu coloração azul ténue por reação com a solução alcalina de hidrogenocarbonato de sódio, indicando a presença de antocianinas puras.

**Figura 40** - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações de pigmentos de petúnias eluídas com acetona e acetona/H₂O (1:1) (C_{F10}).

A coloração verde, observada em meio levemente alcalino, voltou a aparecer na fração eluída com a mistura acetona/água (1:1) indicando a presença de flavonoides.

Realizaram-se também testes colorimétricos em meio fortemente alcalino (solução de NaOH) sobre as frações incolores eluídas com as misturas de éter de petróleo 40-60 °C /acetona nas proporções definidas na tabela 31 e não se observou a coloração amarela característica dos flavonoides (Figura 41).

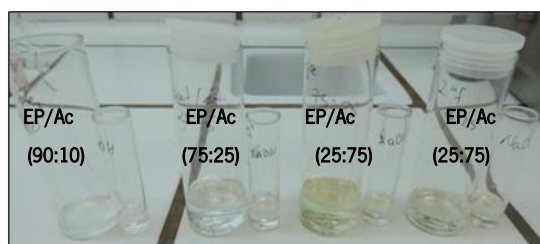


Figura 41 - Testes colorimétricos ácido-base realizados sobre as frações incolores eluídas da coluna de petúnia, na presença de uma base forte, NaOH 1,5 M.

Com base nos resultados obtidos pode concluir-se que a cor das pétalas das petúnias são o resultado da combinação de pigmentos da classe dos flavonóides e das antocianinas.

2.2.4. Pigmentos de Pétalas de Tagetes

Os tagetes são flores amarelo-alaranjadas (ou laranja avermelhado) com um odor forte característico. As pétalas destas flores foram também analisadas por cromatografia em papel e em coluna.

Para a extração dos pigmentos, as pétalas destas flores foram trituradas e maceradas com acetona. A partir do extrato líquido, obteve-se o extrato sólido por adição de um sal desidratante e amido de batata. Este extrato foi colocado na coluna sobre a fase estacionária de amido de batata, tal como em todas as outras colunas preparadas.

A análise prévia do extrato líquido por cromatografia em papel mostrou a presença de elevada quantidade de pigmentos amarelos, muito deslocados no papel em câmara de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10). Este facto indicou que os principais pigmentos dos tagetes são da família dos carotenoides, tal como referido na literatura (luteína e zeaxantina) ²¹.

Assim, para a separação em coluna (C_{F11}) dos pigmentos presentes nos tagetes seleccionou-se uma série solventes de eluição que incluiu eluentes apolares e polares. O aumento gradual da

polaridade dos eluentes levou a um aumento do tempo de eluição, tal como já era esperado (Tabela 34).







Tabela 34 - Eluição de pigmentos de um extrato sólido de tagetes ^{ab}, em seringa de 100 mL (C_{F11}).

Eluentes (C _{F11})	Volume (mL)	Tempo (min)
(1) Éter de petróleo 40-60 °C	20	2
(2) Éter de petróleo 40-60 °C /acetona (90:10)	20	5
(3) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (75:25)	20	10
(4) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (25:75)	20	15
(5) Acetona	20	15
(6) Acetona/Água (1:1)	30	25

^aExtração: acetona, ^b flor de jardim

No que respeita à visualização das bandas de pigmentos eluídas ao longo da coluna (Tabela 35), observaram-se duas bandas de coloração intensa, uma banda amarela, mais extensa, que eluiu facilmente com o éter de petróleo e outra banda de tom rosado, mais fina, que eluiu com a mistura acetona/água (1:1). As frações recolhidas (Figura 42) apresentaram a cor amarelo forte e castanho rosado, respetivamente.

Tabela 35- Eluição de pigmentos de tagetes em seringa de 100 mL (C_{F11}).

Eluentes (C _{F11})					
EP	EP/Ac (90:10)	EP/Ac (75:25)	EP/Ac (25-75)	Ac	Ac/H ₂ O (1:1)
					

As bandas resultantes da eluição com as misturas de éter de petróleo e acetona foram muito pouco perceptíveis, embora sugestivas da presença de pigmentos amarelos (Tabela 35). Nas frações recolhidas

obtiveram-se soluções de tonalidade amarela ténue na eluição com o éter de petróleo 40-60 °C /acetona (90:10) (**Figura 42, a**). À medida que a proporção de acetona foi aumentando, surgiram frações de coloração ligeiramente mais escura, evidenciando a possível solubilização de antocianinas.

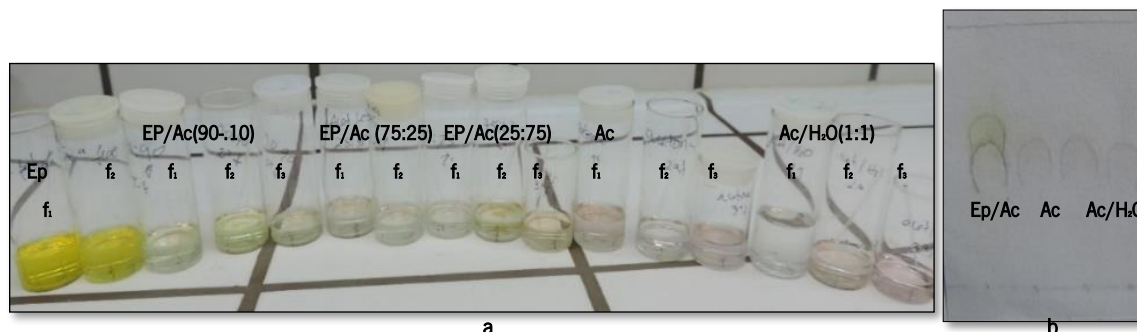


Figura 42 - (a) Frações de pigmentos de tagetes eluídas em seringa 100 mL (C_{F11}): EP (f_1, f_2); EP/Ac (90:10) (f_1, f_2, f_3); EP/Ac (75:25) (f_1, f_2); EP/Ac (25:75) (f_1, f_2, f_3); Ac (f_1, f_2, f_3); Ac/H₂O (1:1) (f_1, f_2, f_3); (b) Cromatograma em câmara BAW das frações: Ep/Ac (25:75), Ac (f_1), Ac/H₂O (1:1) (f_2, f_3).

O tom mais acastanhado da fração eluída com a mistura do éter petróleo/acetona (25:75) indicou a presença de uma mistura de flavonoides amarelos e antocianinas rosadas, que foi apoiada pelo cromatograma obtido em câmara BAW (**Figura 42 b**) e pela coloração vermelha em meio ácido, característica do catião flavílio (**Figura 43, a**).

A eluição com a mistura acetona/água (1:1) permitiu o arrastamento da última banda de pigmentos antociânicos, resultando numa solução ligeiramente rosada, cuja composição foi confirmada pelo cromatograma realizado (**Figura 42, b**) e pela coloração vermelha do catião flavílio em meio ácido (**Figura 43, b**). Em meio fortemente alcalino, foi observada a cor amarela característica das chalconas, resultantes da degradação das antocianinas (**Figura 43, a, b**).

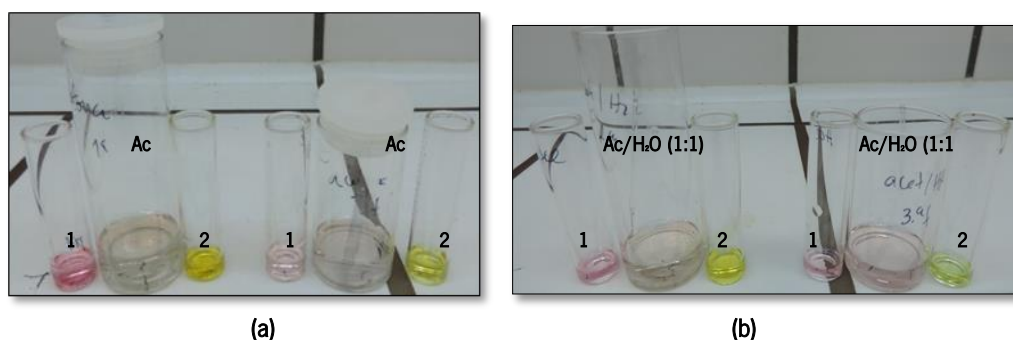


Figura 43 - Testes colorimétricos ácido-base: frações eluídas da coluna de tagetes (C_{F11}): (a) Ac; (b) Ac/H₂O (1:1), na presença de: (1) HCl 0,75 M; (2) NaOH 1,5 M.

Assim, a análise dos tagetes por cromatografia em papel e em coluna apresentou resultados concordantes, evidenciando que a cor dos tagetes será devida à presença de pigmentos carotenóides, flavonoides e antocianinas.

2.2.5. Pigmentos de Lantanas Amarelo-avermelhadas

A Lantana é uma planta rústica, com flores de várias cores predominando os tons amarelo, vermelho, laranja e branco.

Esta flor também foi selecionada para testar a reprodutibilidade do método da separação em coluna de amido uma vez que a análise dos pigmentos de lantanas amarelas e amarelo-avermelhadas por cromatografia em papel indicou a presença de pigmentos de polaridades distintas. Com as pétalas amarelo-avermelhadas foi preparado um extrato sólido para aplicação em coluna de cromatografia (C_{F12}). Este extrato foi obtido adicionando o sal e o amido de batata ao extrato líquido resultante da extração dos pigmentos com a acetona, sendo colocado sobre a fase estacionária após realizada a pré-eluição com éter de petróleo 40-60 °C.

Manteve-se a série de eluentes utilizada na separação de pigmentos dos tagetes, dado que os resultados da cromatografia em papel mostraram uma composição em pigmentos análogos nas duas flores.

Na separação dos pigmentos de lantanas em coluna de cromatografia, o tempo necessário para a sua eluição completa foi de 65 a 70 minutos, comparando com os tempos realizados na separação de pigmentos de outras flores (**Tabela 36**).

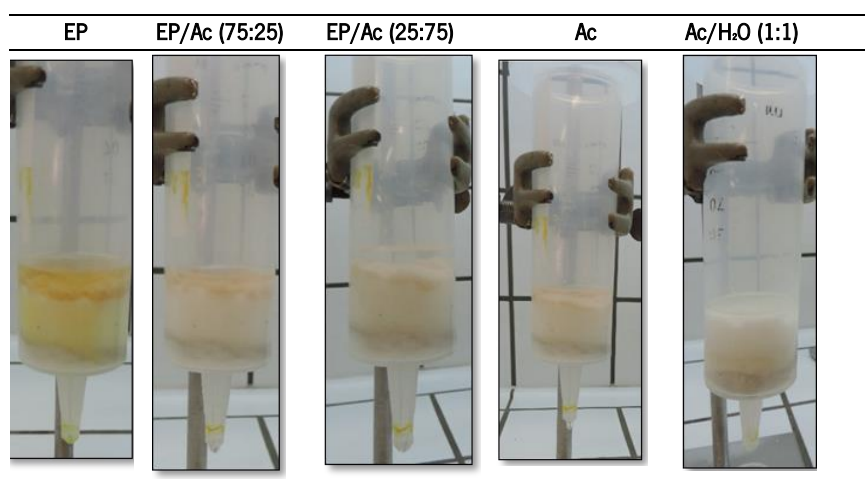
Tabela 36 - Eluição de pigmentos do extrato de lantanas amarelo-avermelhadas ^{ab}, em seringa de 100 mL.

Eluentes (C_{F12})	Volume (mL)	Tempo (min)
(1) Éter de petróleo 40-60 °C	35	5
(2) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (90:10)	20	5
(3) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (75: 25)	20	8
(4) Éter de petróleo 40-60 °C /Acetona (25:75)	10	5
(5) Acetona	20	15
(6) Acetona/Água (1:1)	30	30

^aExtração: acetona, ^b flor de jardim

Verificou-se que o éter de petróleo arrastou facilmente os pigmentos amarelos ao longo da fase estacionária (Tabela 37), observando-se uma banda de coloração amarelo forte que originou uma solução de cor amarela. Foi deslocada uma outra banda amarela na eluição com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/ acetona (90:10).

Tabela 37 - Frações de pigmentos de lantanas eluídas em seringa 100 mL (C_{F12}).



Durante a eluição com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) surgiu ainda mais uma banda de pigmentos com uma coloração muito tênue e da qual resultou uma solução amarelo tênue (Figura 44). Da eluição com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75) não resultou nenhuma banda colorida e os extratos recolhidos mostraram-se praticamente incolores.

As restantes soluções recolhidas, de tons castanho (Figura 44), dizem respeito a duas antocianinas distintas, as quais resultaram da eluição com a acetona e com a mistura de acetona/água (1:1).

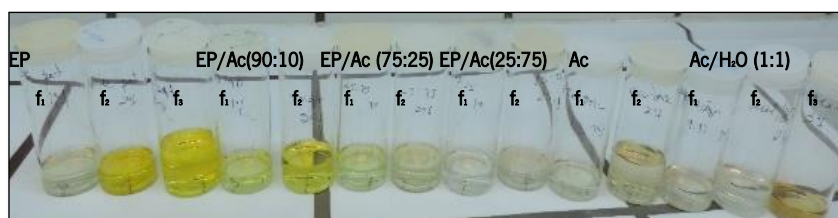


Figura 44 - Frações de pigmentos de lantanas eluídas em seringa 100 mL (C_{F12}); EP (f₁,f₂,f₃), EP/Ac (90:10) (f₁,f₂), EP/Ac (75:25) (f₁,f₂), EP/Ac (25:75) (f₁,f₂), Ac (f₁,f₂), Ac/H₂O (1:1) (f₁,f₂,f₃).

Esta última mistura de eluentes deu origem a três frações, sendo que as duas primeiras, de menor coloração, parecem ser ainda resultado da passagem da acetona. Apenas a terceira fração de pigmentos apresentou coloração apreciável com um tom amarelo-alaranjado, indicando a recolha de uma mistura de pigmentos da classe dos flavonoides e antocianinas (**Tabela 37**).

Estes resultados mostram que as cores das pétalas das lantanas vermelhas se devem à presença de carotenoides, flavonoides amarelos e antocianinas, demonstrando, mais uma vez, a eficiência e a reprodutibilidade deste método de separação.

CAPÍTULO III

Parte Experimental

Parte A – Extração e Separação de Carotenoides do Tomate

1. Materiais e Reagentes

Materiais adquiridos em supermercado e farmácias: concentrado de tomate em bisnaga, da marca Compal; fécula de batata, marca Cimarrom; seringas descartáveis de 50 e 100 mL, película de alumínio e acetona comercial.

Solventes e materiais adquiridos em casas da especialidade: Papel de filtro e papel de cromatografia marca Whatman, sulfato de sódio anidro, cloreto de sódio, areia lavada, algodão em rama, acetona pura, éter de petróleo 40-60 °C, acetato de etilo, etanol 99,8 % e água destilada;

Material/Equipamentos: Material diverso de laboratório, banho-maria, balança semi-analítica (\pm 0,01 g); hotte;

2. Extração de Carotenoides

2.1. Ensaio preliminares

Procedimento A – Testes de solubilidade: Num almofariz colocou-se a amostra de concentrado de tomate (4,00 g) e sobre a amostra foi colocado o solvente de extração (5 mL). Após a trituração da mistura de concentrado e solvente(s), decantou-se a fração líquida orgânica para um gobelé. Nos casos em que foram obtidas misturas de dois líquidos imiscíveis a separação das duas fases foi realizada em ampola de decantação.

Este procedimento foi repetido para cada solvente ou misturas de solventes testado(s), nomeadamente: acetato de etilo, éter de petróleo 40-60 °C, acetona, misturas de acetona/éter de petróleo 40-60 °C (1:1) e (1:2), acetato de etilo/acetona (1:1) e acetato de etilo/etanol (2:1).

Num outro ensaio, repetiu-se o procedimento anterior adicionando-se ao concentrado de tomate uma mistura de acetato de etilo/acetona (1:1) e uma espátula de sulfato de sódio anidro.

Observaram-se as cores dos líquidos decantados e dos resíduos sólidos resultantes.

Procedimento B - Desidratação prévia da amostra com etanol a frio: Num almofariz, colocou-se a amostra de concentrado de tomate (4,00 g) e etanol (5 mL). Após trituração forte (1 min), filtrou-se a suspensão por gravidade através de um filtro de pregas e recolheu-se o resíduo para o almofariz. Repetiu-se a operação adicionando mais etanol (5mL) sobre o resíduo sólido de tomate,

agitando energeticamente e filtrando o sólido pelo mesmo método. Este procedimento de desidratação foi repetido várias vezes e os resíduos de tomate foram colocados num gobelé para serem submetidos, separadamente, à extração com diversos solventes orgânicos.

Sobre cada amostra de tomate desidratado, adicionou-se o solvente ou a mistura de solventes (10 mL) para extração dos pigmentos: éter de petróleo 40-60 °C; acetato de etilo; acetona seguida do éter de petróleo 40-60 °C (1:1); acetato etilo seguido da acetona (1:1); acetato de etilo e etanol (2:1); mistura de etanol e acetona (95:5) seguida do éter de petróleo 40-60 °C (1:1).

As amostras foram submetidas à agitação vigorosa com a vareta e deixados a macerar durante 15 minutos resguardadas da luz. Os extratos líquidos foram obtidos através de uma filtração por gravidade com filtro de pregas e guardados em frascos de amostras.

Procedimento C - Extração com desidratação prévia da amostra com etanol em banho-maria: Num almofariz, colocou-se a amostra de tomate (4,00 g) e etanol (10 mL). Após trituração forte levou-se a mistura a aquecer em banho-maria, com agitação, a 40 °C, durante 5 minutos. Filtrou-se a suspensão a vácuo e recolheu-se o resíduo sólido para um gobelé, seguindo-se a extração com éter de petróleo 40-60 °C.

Procedimento D - Extração na presença de agentes desidratantes sólidos

Procedimento D₁: Num gobelé colocou-se a amostra de concentrado de tomate (4,00 g), adicionou-se a acetona (10 mL) e agitou-se com uma vareta de vidro, adicionando-se de seguida o éter de petróleo 40-60°C (10 mL). Juntou-se o sulfato de sódio anidro (2,00 g) e continuou a agitar-se energeticamente. Deixou-se em repouso (20 min) em local escurecido obtendo-se, seguidamente, o extrato líquido através de uma filtração por gravidade.

Repetiu-se o mesmo procedimento para os solventes acetato de etilo e acetona (1:1).

Procedimento D₂: Num gobelé colocou-se a amostra de concentrado de tomate (4,00 g) e a acetona (10 mL) seguida do éter de petróleo 40-60 °C (10 mL). Após agitação vigorosa (1 min.) acrescentou-se, sucessivamente, o sulfato de sódio anidro (2,00 g) e o amido de batata (6,00 g), agitando com a vareta de vidro de forma a envolver bem a mistura. Deixou-se em repouso durante 20 minutos, em local escurecido, após o qual se procedeu a uma filtração para a obtenção do extrato líquido do tomate.

2.2. Preparação dos Extratos (otimizados)

Procedimento A - Obtenção do extrato líquido de tomate (para aplicação em cromatografia em papel)

Num almofariz, colocou-se concentrado de tomate (2,00 g), adicionou-se sal refinado de cozinha (1,00 g) (ou sulfato de sódio anidro) e triturou-se a mistura com o pilão. De seguida, introduziu-se o amido de batata (3,00 g) e continuou-se a agitar a mistura até à obtenção de uma pasta seca. Sobre a pasta seca adicionou-se a acetona (10 mL), agitou-se com uma vareta de vidro e deixou-se macerar durante 5 min. Seguidamente, adicionou-se o éter de petróleo 40-60 °C (20 mL), agitou-se e deixou-se a macerar durante mais 15 minutos. Filtrou-se a mistura por gravidade, utilizando um filtro de pregas e recolheu-se o filtrado de cor laranja para um frasco de amostras. Este procedimento também foi previamente realizado utilizando a proporção acetona/éter de petróleo 40-60 °C (1:1).

Procedimento B - Obtenção do extrato sólido de tomate

Num almofariz com concentrado de tomate (2,00 g), adicionou-se sal refinado de cozinha (1,00 g) (ou em alternativa o sulfato de sódio anidro) triturando com o pilão. De seguida, introduziu-se o amido de batata (3,00 g) envolvendo-se bem a mistura até à obtenção de uma pasta seca.

Procedimento C - Preparação do extrato bruto de cenoura (padrão utilizado para a presença de betacaroteno)

Triturou-se uma cenoura pequena no triturador e colocou-se cerca de 4 minutos no micro-ondas para desidratar. Adicionou-se uma mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (10 mL), triturou-se com o pilão e deixou-se a macerar durante 20 minutos. Decantou-se a fase líquida para ser posteriormente aplicada na cromatografia em papel.

3. Separação de Carotenoides por Cromatografia

3.1. Cromatografia em Papel

Cortaram-se tiras de papel de filtro com, aproximadamente, 4 cm de largura por 10 cm de altura. Os extratos líquidos de cenoura e do tomate foram aplicados com um capilar de cromatografia a cerca de 1,5 cm das extremidades do papel. Depois de secar, introduziram-se as tiras de papel em cada uma das seguintes câmaras de cromatografia, previamente preparadas, de acordo com os seguintes procedimentos:

Procedimento A (Câmara de etanol): Forrou-se interiormente a superfície do vidro de um erlenmeyer com meio círculo de papel de filtro. Introduziu-se 10 mL de etanol puro e cobriu-se o erlenmeyer com um vidro de relógio.

A eluição das amostras nesta câmara demorou 20 minutos.

Procedimento B (Câmara de acetona/éter de petróleo 40-60°C (10:90)): Repetiu-se o procedimento anterior, substituindo o etanol por uma mistura de acetona/éter de petróleo 40-60°C (10:90).

A eluição das amostras nesta câmara demorou cerca de 5 minutos.

3.2. Cromatografia em Coluna

Na extremidade de uma seringa descartável (50 mL) colocou-se um pouco de algodão, seguido de uma fina camada de areia lavada do mar para a uniformização da superfície. Fez-se o empacotamento da seringa, previamente fixada num suporte universal, adicionando o amido de batata (25,00 g) e compactando-o, através de pequenas batidas sobre a seringa. Após uma eluição prévia com etanol (10 mL), aplicou-se a amostra de extrato sólido de tomate (4,00 g) no topo da fase estacionária, com o auxílio de uma espátula. Sobre o extrato, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, aplicou-se sucessivamente uma série de eluentes de polaridade decrescente, mantendo-se a amostra sempre em contacto com os solventes de forma a não secar.

A eluição das colunas realizadas decorreu de acordo com um dos seguintes procedimentos:

Método A (Colunas C_{T1} , C_{T2} e C_{T3}): A eluição da primeira banda amarela foi realizada com o etanol nas duas primeiras seringas (C_{T1} e C_{T2}). A segunda banda, cor de laranja, foi eluída com o éter de petróleo (coluna C_{T1}) ou com o acetato de etilo (coluna C_{T2}). As frações líquidas eluídas foram recolhidas separadamente para frascos de amostras.

Na terceira seringa (C_{T3}), o primeiro eluente foi uma mistura de acetona/etanol (1:1). Após eluição da banda amarela, seguiu-se a adição de éter de petróleo para a eluição da fração laranja de licopeno. As frações líquidas eluídas foram recolhidas separadamente para frascos de amostras.

Método B (Colunas C_{T4} , C_{T5} , C_{T6} e C_{T7}): A eluição dos pigmentos iniciou-se com uma mistura de acetona/etanol cujas proporções variaram de coluna para coluna: 20:80 (coluna C_{T4}); 10:90

(coluna C_{T5}); 5:95 (coluna C_{T6}); e 1:99 (coluna C_{T7}). De cada coluna, foi eluída a primeira fração, de cor amarela, e recolheu-se em frascos de amostras e devidamente rotuladas.

Na eluição da segunda banda de pigmentos utilizou-se éter de petróleo em todas as colunas (C_{T4} a C_{T7}), e foi obtida a fração laranja avermelhada, de cada coluna, que foi recolhida em frascos de amostras.

Método C (Colunas C_{T8}, C_{T9}, C_{T10} e C_{T11}): Foram preparadas três colunas em seringas de 100 e 50 mL. Colocou-se um pouco de algodão, no fundo de cada seringa, seguido de uma fina camada de areia lavada do mar e uniformizou-se a superfície.

Para a fase estacionária, fez-se o empacotamento da coluna com uma suspensão, previamente preparada, de amido em etanol. Em duas seringas, uma de 50 mL (C_{T8}) e outra de 100 mL (C_{T9}), introduziu-se cuidadosamente igual quantidade de suspensão de amido (25,00 g) em 10 mL de etanol.

Numa terceira seringa (C_{T10}) de 100 mL, aplicou-se uma menor quantidade de suspensão de amido (15,00 g) em 6 mL de etanol. Recolheu-se o etanol excedente através da ponta das seringas.

Seguidamente, procedeu-se à aplicação das amostras de extrato sólido de concentrado de tomate no topo da coluna: 4,00 g nas colunas C_{T8} e C_{T9} (50 mL e 100 mL) e 2,00 g na coluna de 100 mL (C_{T10}).

Em cada coluna, com uma pipeta de Pasteur, aplicou-se cuidadosamente o primeiro solvente de eluição, o etanol (entre 18 a 25 mL), não deixando secar a amostra do concentrado entre as várias aplicações. Recolheu-se a primeira banda de pigmentos, de cor amarela, para frascos de amostras.

Após a lavagem da coluna com acetona (8 a 10 mL), cuja fração eluída foi desprezada, seguiu-se a eluição com éter de petróleo 40-60 °C (20 mL) para deslocar a segunda banda de pigmentos, de cor laranja. Recolheu-se o líquido eluído para um frasco de amostras e rotulou-se.

Preparou-se uma quarta e última seringa (C_{T11}) de 100 mL introduzindo-se a suspensão de amido (15,00 g) em etanol (10 mL). Aplicou-se a amostra de extrato sólido de concentrado de tomate (2 g) sobre o topo da coluna de amido.

Com uma pipeta de Pasteur introduziu-se cuidadosamente o etanol (entre 18 a 25 mL) para a eluição completa da primeira banda de carotenoides amarelos, que foi recolhida separadamente e acondicionada em frascos de amostras.

Após a lavagem da coluna com acetona (8 a 10 mL) (volume eluído desprezado), foi utilizado o acetato de etilo (25 mL) para a eluição do licopeno. Recolheu-se e identificou-se o líquido eluído.

Procedimento otimizado para a separação na coluna: No suporte universal fixou-se no uma seringa de 100 mL, previamente preparada na base com o algodão e uma camada de areia lavada. De seguida, introduziu-se cuidadosamente uma suspensão de amido (15,00 g) em etanol (6 mL). Recolheu-se o etanol excedente através da ponta da seringa e colocou-se o extrato seco do concentrado de tomate (2,00 g) sobre o amido. Através das paredes da seringa, com ajuda de uma pipeta de Pasteur ou de uma vareta de vidro, adicionou-se o primeiro solvente de eluição, o etanol (18 mL), não deixando secar a amostra de concentrado de tomate entre as várias aplicações. Recolheu-se a primeira fração eluída, de cor amarela, para frascos de amostras devidamente identificados.

Continuamente realizou-se a passagem com a acetona (8 mL) e a fração recolhida foi desprezada.

Seguiu-se a passagem do éter de petróleo 40-60 °C (20 mL) para a eluição da segunda fração de pigmentos, de cor laranja, a qual foi recolhida em frascos de amostras, identificados e acondicionados em local escurecido.

PARTE B - Extração e Separação de Pigmentos de Pétalas de Flores

Materiais e Reagentes

Materiais adquiridos em supermercado e farmácias: vinagre, fécula de batata, marca Cimarron; seringas descartáveis de 50 e 100 mL.

Solventes e materiais adquiridos em casas da especialidade: Papel de filtro e papel de cromatografia marca Whatman; sulfato de sódio anidro, cloreto de sódio, areia lavada, algodão em rama; acetona pura; éter de petróleo 40-60 °C; acetato de etilo; água destilada; Butanol; ácido acético, soluções aquosas de ácido clorídrico, hidróxido de sódio, hidrogenocarbonato de sódio e amoníaco.

Material/Equipamentos: Material diverso de laboratório, balança semi-analítica ($\pm 0,01$ g); hotte; lâmpada UV ($\lambda = 254$ nm).

Flores: As pétalas de flores frescas, adquiridas em jardins e florista, pertencem às famílias: *Rosaceae* (rosas vermelhas), *Violaceae* (amores-perfeitos), *Caryophyllaceae* (tagetes), *Solanaceae* (petúnias), *Asteraceae* (dális), *Verbenaceae* (lantanas). Folha de faia vermelha (*Fagus sylvatica purpúrea*).

1. Extração de Pigmentos

Procedimento A – Preparação do extrato líquido em etanol: Retiraram-se as pétalas das flores (cerca de 8,00 g) e reduziu-se o seu tamanho com a ajuda da trituradora. Foi adicionado o etanol (50 mL), continuando a trituração manual. A mistura ficou a macerar durante a noite. No dia seguinte, realizou-se a separação das fases líquida e sólida através de uma filtração por gravidade e guardou-se o extrato líquido.

Procedimento B – Preparação do extrato líquido em acetona: Os extratos foram preparados de véspera retirando as pétalas da flor e acondicionando-as entre folhas de papel absorvente. No dia seguinte as pétalas de maiores dimensões foram previamente cortadas com a tesoura em pequenos pedaços e colocadas num almofariz (5,00 g), onde foram trituradas. Adicionou-se acetona (25 mL) e areia do mar lavada (uma espátula), continuando a trituração (cerca de 3 minutos) até obter uma pasta. Deixou-se a mistura a macerar entre 20 a 30 minutos à temperatura

ambiente, coberta com papel de alumínio. Após o tempo de maceração, a mistura foi filtrada por gravidade através de um filtro de pregas e recolheu-se o filtrado para um tubo de amostras. Este extrato líquido foi de seguida aplicado na cromatografia em papel. O restante líquido foi reservado para preparar um extrato sólido adequado à aplicação na cromatografia em coluna.

Procedimento C - Preparação do extrato sólido (método otimizado, aplicado em todas os ensaios realizados em seringas de 100 mL)

Sobre o extrato líquido de pigmentos (2 mL) (obtido segundo procedimento B do ponto 3.1.), adicionou-se o sulfato de sódio anidro (1,00 g) e agitou-se a mistura, adicionando-se seguidamente o amido de batata (2,00 g). Continuou a envolver-se a mistura até se obter um residuo sólido seco, por evaporação completa do solvente. Este extrato seco foi aplicado na coluna de cromatografia.

2. Separação Cromatográfica

2.1. Cromatografia em Papel

A cromatografia em papel foi realizada sobre os extratos líquidos obtidos a partir das várias flores e sobre as frações eluídas das colunas de cromatografia.

As câmaras de cromatografia foram previamente preparadas forrando a superfície interna do vidro de gobelé de 250 mL, com meio círculo de papel de filtro. Em cada câmara, introduziu-se uma mistura diferente de solventes (10 mL): **(a)** mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10); **(b)** mistura de BuOH/CH₃COOH/H₂O (BAW, 4:1:5); **(c)** mistura de CH₃COOH/HCl (conc.)/H₂O (*Forestal*, 10:3:30); **(d)** mistura de etanol/vinagre (1:1); **(e)** mistura de etanol/vinagre (2:1). Cobriu-se com um vidro de relógio, deixando que a atmosfera do balão ficasse saturada com os vapores dos solventes.

Para a obtenção do cromatograma, o extrato líquido foi aplicado, com um capilar de cromatografia, a cerca de 1,5 cm da extremidade do papel de cromatografia (4 cm × 10 cm), deixando secar o extrato entre cada aplicação. Após obtenção de aplicações com uma concentração de pigmentos adequada, introduziram-se as tiras de papel em cada uma das câmaras de cromatografia, **(a)** a **(e)** e terminou-se a eluição quando os eluentes atingiram 3/4 da altura do papel.

O desenvolvimento dos cromatogramas decorreu em intervalos de tempo bastante diferentes. Na câmara de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) a eluição demorou 10 minutos, nas

câmaras *BAW* e *Forestal* entre 1 h e 30 min a 2 h, e nas câmaras etanol/vinagre (1:1) e etanol/vinagre (2:1), entre 50 a 60 minutos.

Quando os cromatogramas foram retirados das câmaras, as manchas obtidas foram contornadas a lápis. Deixou-se secar o papel e determinaram-se os valores de R. Os cromatogramas foram, de seguida, observados sobre vapores de amoníaco e à luz UV.

2.2. Cromatografia em Coluna de Flores (C_F)

2.2.1. Colunas de Extratos de Rosas Bourdeux e Rosas Amarelo-avermelhadas

Procedimento A – Separação dos pigmentos de rosas amarelo-avermelhadas extraídos com etanol - C_{F1} (coluna de flores 1)

Na extremidade da seringa descartável (50 mL) colocou-se um pouco de algodão, seguido de uma camada de areia do mar lavada (cerca de uma espátula). Introduziu-se a fase estacionária pelo método do empacotamento da coluna a seco, adicionando o amido de batata (25,00 g) e dando pequenas batidas sobre a seringa, de forma a que o amido ficasse bem compactado e sem espaços de ar.

A amostra de pigmentos de rosas foi preparada adicionando o amido de batata (4,00 g) ao extrato líquido (2,5 mL) obtido na maceração das pétalas em etanol (Procedimento 1A), agitando e envolvendo a mistura até evaporação completa do solvente e obtenção de uma massa seca. Este extrato foi colocado sobre a fase estacionária, introduzindo-a na coluna imediatamente após a pré-eluição realizada com um pequeno volume do primeiro eluente da série eluotrópica, éter de petróleo 40-60 °C (10 mL).

A eluição dos pigmentos iniciou-se com a passagem da mistura éter de petróleo 40-60°C/acetona (75:25), seguido de uma mistura éter de petróleo 40-60°C/acetona (50:50) e depois eluiu-se com a acetona. As frações recolhidas apresentaram-se incolores. O etanol foi o último eluente e originou uma fração de pigmentos de cor amarelo muito ténue. Os volumes de eluentes utilizados não foram contabilizados e cada fração eluída foi recolhida em frascos de amostras e devidamente identificada.

Procedimento B – Separação dos pigmentos de rosas amarelo-avermelhadas e rosas bourdeux extraídos com acetona (colunas de flores 2 a 4)

Foram preparadas três colunas (C_{F2} , C_{F3} e C_{F4}) em seringa de 50 mL. A preparação das colunas e amostras de extrato sólido de pigmentos foram realizados de forma semelhante à descrita no item

anterior. Os extratos líquidos de pigmentos obtiveram-se pela maceração das pétalas de rosas em acetona, tal como descrito no procedimento B do ponto 1.

Nas eluições que a seguir se descrevem não foram contabilizados os volumes de eluentes utilizados. Cada fração eluída foi recolhida em frascos de amostras e devidamente identificada.

Eluição dos pigmentos de rosas amarelo-avermelhadas (C_{F2}): Realizou-se uma pré-eluição com éter de petróleo 40-60°C e introduziu-se, de seguida, a amostra de pigmentos na forma de extrato seco. A eluição dos pigmentos iniciou-se com a mistura de éter de petróleo 40-60°C /acetona (1:1), da qual resultou uma fração amarelo tênue. A eluição com acetona arrastou uma fração líquida acastanhada e com etanol recolheu-se uma fração incolor. Para finalizar a eluição, adicionou-se a mistura etanol/água e obteve-se uma solução rosada.

Eluição dos pigmentos de rosas bourdeux (Colunas C_{F3} e C_{F4}): Em cada coluna (50 mL), após a pré-eluição com éter de petróleo 40-60 °C, colocou-se o extrato seco de pigmentos sobre o amido. Seguidamente, realizou-se a eluição com a mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (1:1) e recolheu-se uma fração incolor para o frasco de amostras. A acetona foi o eluente seguinte tendo resultado na eluição de uma solução castanha. A aplicação da mistura etanol/água separou pigmentos que deram uma cor levemente rosada à fração recolhida e, por fim, a eluição com água trouxe uma outra fração mais rosada.

Procedimento C – Método otimizado aplicado a todas as colunas em seringa de 100 mL

Preparação da coluna/fase estacionária: Na extremidade da seringa descartável (100 mL) colocou-se um pouco de algodão, seguido de uma espátula de areia lavada do mar. Introduziu-se na coluna uma suspensão de amido (15,00 g) em éter de petróleo (10 mL) e recolheu-se o solvente em excesso na extremidade da seringa. De imediato, colocou-se no topo da fase estacionária a amostra do extrato sólido de pigmentos (preparada de acordo com o procedimento C do ponto 1) iniciou-se a introdução cuidadosa dos solventes, de acordo com a série eluotrópica definida para cada flor. Para cada fração eluída foi registado o volume de solvente utilizado e o tempo necessário à sua eluição completa.

Cada fração eluída foi recolhida em frascos de amostras e devidamente identificada.

Coluna de rosas vermelho bourdeux (C_{F5}): A eluição iniciou-se com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (12 mL), tendo-se recolhido uma fração incolor. De seguida, foi

introduzida na coluna a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (16 mL) resultando, também, na eluição de uma fração incolor. Com a adição da acetona (22 mL) ocorreu a separação de uma banda rosada originando uma solução rosa muito ténue. O último eluente introduzido foi a água (20 mL), que arrastou a banda rosada retida no topo da coluna e recolheu-se uma fração rosa mais forte.

2.2.2. Colunas de Extratos de Amores-perfeitos (C_{F6} , C_{F7} , C_{F8} e C_{F9}): Na série eluotrópica selecionada para cada uma das quatro colunas os três primeiros eluentes foram comuns, variando ligeiramente os volumes introduzidos. Assim, a eluição iniciou-se com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C (30, 25, 29, 30 mL, respetivamente), que deslocou uma banda amarela, tendo-se recolhido uma solução de pigmentos amarelos. A eluição com a mistura de éter de petróleo 40-60°/acetona (90:10) (20, 30, 31, 20 mL) separou uma outra banda amarela. De seguida, aplicou-se a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (10, 10, 10, 40 mL) e as frações recolhidas apresentaram um tom amarelo muito ténue ou mesmo incolor.

Os eluentes que se aplicaram a seguir variaram, de coluna para coluna, pelo que se passam a descrever-se separadamente.

Coluna de amores (C_{F6}): Após a eluição com a mistura de éter de petróleo 40-60°C/acetona (75:25), a adição do acetato de etilo (20 mL) deslocou uma fração levemente amarela, quase incolor. A eluição com a acetona (40 mL) arrastou uma fração de pigmentos levemente arroxeadada. Uma outra banda de coloração roxa mais forte foi seguidamente eluída com a água (20 mL).

Coluna de amores (C_{F7}): Após eluição com o éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) a eluição com o acetato de etilo (20 mL) originou uma fração amarelo ténue. Com a mistura de acetato de etilo/acetona (1:1) (20 mL) recolheu-se uma solução levemente arroxeadada e foram obtidas frações de um roxo mais intenso por eluição com a acetona (40 mL). A eluição com água (20 mL) deslocou uma outra banda de cor roxa ainda mais intensa.

Coluna de amores (C_{F8}): Com a passagem do acetato etilo (20 mL), obteve-se uma solução praticamente incolor. Introduziu-se seguidamente a mistura de acetato etilo/acetona (75:25) (20 mL) da qual resultou uma fração levemente rosada, seguida da acetona (40 mL), que originou uma fração roxa e, por fim, fez-se a eluição com água (30 mL) que deslocou outra banda roxa originando soluções roxas.

Coluna de amores (C_{F9}): Na última coluna, logo após a passagem com a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (40 mL) realizou-se a eluição com uma mistura de éter de petróleo 40-

60n°C/Ace (25:75) (25mL), resultando uma fração rosada muito ténue. Da eluição com a acetona (20 mL) recolheu-se uma solução roxa. Uma outra fração de coloração roxa muito intensa, resultou da eluição com a mistura acetona/água (1:1) (25 mL).

2.2.3. Coluna de Extratos de Petúnias (C_{F10}): Na coluna de petúnias, a série eluotrópica iniciou-se com a mistura éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (10 mL) e prosseguiu-se com as misturas de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (15 mL) e éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75) (25mL). A eluição completa com estes eluentes originou frações incolores. Seguidamente, a introdução da acetona (30 mL) na coluna levou à recolha de uma fração rosada, o mesmo acontecendo com a mistura de acetona/H₂O (1:1) (30 mL), que foi o último eluente da série.

2.2.4. Coluna de Extratos de Tagetes (C_{F11}): A primeira fração de pigmentos, de cor amarela, obteve-se com a eluição do primeiro eluente, o éter de petróleo 40-60 °C(20 mL). Seguidamente, a eluição com as misturas de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (20 mL) e éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (20 mL) levou à recolha de duas frações incolores. Seguindo a sequência de eluentes da série eluotrópica deu-se continuidade à eluição, introduzindo-se na coluna a mistura de éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75) (20mL) que arrastou uma solução levemente rosada. Na etapa seguinte, recolheu-se outra fração de cor rosada mais intensa por eluição com a acetona (20 mL). A mistura de acetona/H₂O (1:1) (30 mL) deslocou uma outra banda mais estreita de cor rosa, obtendo-se uma solução de cor rosada.

2.2.5. Coluna de Extratos de Lantanas (C_{F12}): A eluição com éter de petróleo 40-60 °C(35 mL) levou à recolha de uma fração de tonalidade amarelo forte. As misturas de eluentes que se seguiram, éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (20 mL), éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (20 mL) e éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75) (10mL) levaram à recolha de frações de tonalidade amarelo ténue. A eluição com a acetona (20 mL) seguida da eluição da mistura de acetona/H₂O (1:1) (30 mL) permitiu a recolha de frações de cor acastanhada.

2.3. Testes Colorimétricos Para Pesquisa de Flavonoides

Das frações de flavonoides recolhidas da coluna retirou-se, separadamente, com uma pipeta de Pasteur uma alíquota de líquido (1 mL) para um frasco de amostras. Adicionaram-se duas gotas de soluções ácida ou básica, nomeadamente, solução de ácido clorídrico (0,75 M), solução diluída de hidrogenocarbonato de sódio (0,25 M), solução de amoníaco (25%) e solução de hidróxido de sódio (1,5 M). Observou-se a cor obtida em cada fração.

2.4. Teste de Vapores de Amoníaco/Luz UV

Observaram-se os cromatogramas à luz UV e analisaram-se as cores presentes.

Na hotte, colocou-se o cromatograma sobre a boca de um frasco de solução de amoníaco.

Observaram-se as alterações de cor dos pigmentos quando receberam os vapores de amoníaco.

Seguidamente, colocaram-se os cromatogramas à luz UV e fez-se o registo das cores.

CAPÍTULO IV

Proposta de Atividades

Atividade 1

Atividade Laboratorial

Título: Extração e Separação dos Pigmentos do Tomate por Cromatografia

Questão-problema: Porque é que o tomate é vermelho?

1. Objetivos

- Estudo dos conceitos: polaridade de moléculas, ligações intermoleculares, solubilidade de pigmentos, miscibilidade de solventes, hidrocarbonetos e sustentabilidade.
- Utilização de técnicas de cromatografia.

2. Introdução

O licopeno é um pigmento que pertence à família dos carotenoides e é o principal responsável pela cor vermelha, característica do tomate maduro ou dos produtos derivados do tomate. Constitui cerca de 80 a 90 % do total de pigmentos presentes no tomate fresco. Também podem ser encontrados outros carotenoides, como o β -caroteno ou a luteína (carotenoide oxigenado classificado como xantofila). O licopeno aparece como microcristais cuja luz por eles refletida dá ao tomate a coloração vermelha intensa.

Quimicamente os carotenoides apresentam uma estrutura tetraterpenoide de 40 átomos de carbono, unidos por unidades isoprenoídes opostas no centro da molécula, podendo apresentar entre 3 a 15 ligações duplas conjugadas na cadeia de carbono (**Figuras 1**).

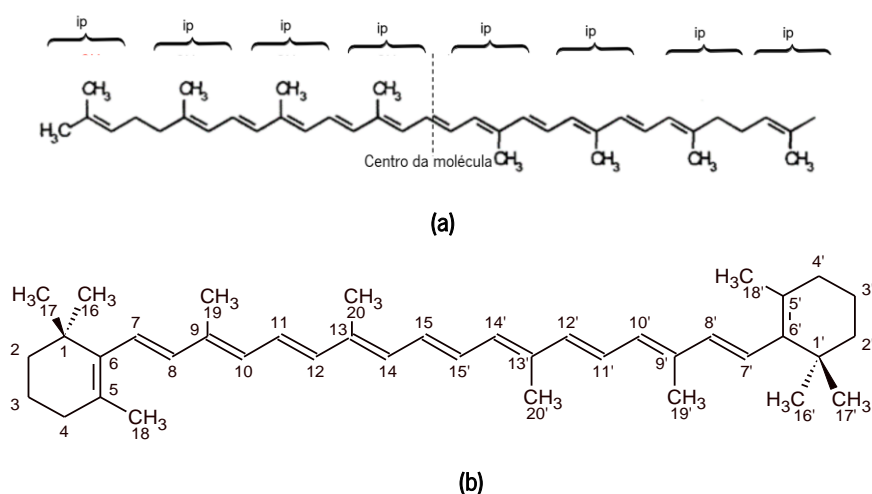


Figura 1 – Estruturas químicas de carotenoides: (a) licopeno, (b) β -caroteno.

O Licopeno é lipossolúvel, o que significa que não é solúvel na água. É normalmente extraído com solventes orgânicos como o hexano, acetona ou éter de petróleo.

3. Metodologia

- O trabalho deverá ser realizado em duas partes, ocupando duas aulas de 100 min em semanas consecutivas. No entanto, também poderá ser realizada apenas uma das partes numa única aula.
 - 1.ª aula – Extração e identificação dos carotenoides do tomate por cromatografia em papel.
 - 2.ª aula – Separação dos pigmentos do tomate em coluna de cromatografia.
- Os alunos devem organizar-se de forma a que as diferentes tarefas propostas na atividade, possam ser distribuídas pelos colegas do grupo. Os grupos devem de ser constituídos por três ou quatro alunos.
- Todos os registos de passos e resultados obtidos devem constar no seu caderno.
Os alunos devem usar bata e seguir as indicações que dizem respeito às advertências de perigo e segurança.

4 - Proposta de Procedimento Experimental

Quantidade	Materiais/Equipamentos	Reagentes
1	Seringa descartável de 100 mL	Concentrado de tomate
2	Almofariz e pilão	Sulfato de sódio anidro ou sal refinado
2	Funil de vidro	Fécula de batata (amido)
3	Provetas 10 mL	Acetona pura
1	Provetas 20 mL	Etanol 99,8 %
1	Provetas 5 mL	Éter de petróleo 40-60 °C
1	Suporte universal, garra e noz	
3	Capilares de cromatografia	
4	Gobelés 250 mL	
2	Gobelés de 100 mL	
2	Varetas de vidro	
4	Vidro do relógio	
2	Espátula	
3	Pipetas de Pasteur	
6	Frascos de amostras	
2	Erlenmyer	
1	Balança digital	
	Papel de filtro (90-110) mmØ	
	Algodão	
	Areia lavada	

Película de alumínio

Lápis e caneta de acetato

Perigo e Segurança: Tendo em conta os materiais e reagentes a utilizar, proceder à leitura atenta dos perigos/advertências e cuidados de segurança a respeitar na realização da atividade.

Reagente/solvente	Código Perigos / Advertências
Acetona	H225/ Líquido e vapores facilmente inflamáveis; H319/ Provoca irritação ocular grave; H336/ Pode provocar sonolência ou vertigens.
Etanol	H225/ Líquido e vapores facilmente inflamáveis; H319/ Provoca irritação ocular grave
Éter de petróleo	H224/ Líquidos e vapores extremamente inflamáveis; H304/ Pode ser mortal por ingestão e penetração vias respiratórias; H315/ Provoca irritação cutânea; H350/ Pode provocar cancro; H336/ Pode provocar sonolência ou vertigens; H411/Tóxicos para organismos aquáticos.
Sulfato de sódio anidro	Não está considerada como uma substância perigosa de acordo com a legislação da UE

Os solventes/reagentes devem ser mantidos longe das fontes de calor e fontes de ignição. Evitar o contacto com a boca, olhos, pele e vias respiratórias. Usar equipamentos e vestuário adequado sempre que necessário (hotte, luvas, bata e óculos de proteção).

1.ª AULA

4.1. Extração dos Pigmentos do Tomate

Preparação dos extratos de tomate (T) e de cenoura (C)


- 1- Num vidro do relógio, pesar 4 g de concentrado de tomate (CT) e colocar num almofariz. Adicionar 2 g de sal de cozinha refinado, ou a mesma quantidade de sulfato de sódio anidro, e triturar com o pilão.
- 2- Adicionar 6 g de fécula de batata e continuar a trituração durante cerca de 5 minutos.
- 3- Dividir o extrato sólido em duas porções iguais (\cong 6 g), recolher uma das porções para um vidro de relógio, cobrir com uma folha de papel de alumínio e reservar num local escuro, para posterior aplicação na coluna de cromatografia a realizar na aula seguinte (1 semana).
- 4- Sobre o extrato sólido que ficou no almofariz, adicionar 20 mL de acetona e triturar energicamente com o pilão. Seguidamente, adicionar 10 mL de éter de petróleo 40-60 °C e continuar a trituração durante cerca de dois minutos. Tapar com folha de alumínio e deixar a macerar durante 20 minutos.
- 5- Preparar um filtro de pregas e colocá-lo no funil de vidro de tamanho adequado; molhar ligeiramente com acetona para aderir melhor às paredes do funil.
- 6- Para um erlenmyer de 100 mL, filtrar por gravidade o extrato que ficou a macerar.
- 7- Guardar o filtrado num frasco de amostras, rotular e reservar ao abrigo da luz, calor e humidade, para aplicação na cromatografia em papel. Desprezar o residuo sólido.
- 8- Para a preparação do padrão do betacaroteno, raspar uma cenoura pequena para um almofariz (2 g) e triturar com o pilão. Adicionar 1 g de sulfato de sódio anidro e, após contínua trituração, adicionar a fécula de batata (3 g) para completar a desidratação.

Adicionar uma mistura de éter de petróleo/acetona (9:1) (10 mL), triturar mais um pouco com o pilão e deixar a macerar durante 20 minutos. Filtrar a fase líquida, tal como descrito nos pontos 5, 6 e 7, e reservar o extrato líquido para ser posteriormente aplicado na cromatografia em papel (CP).

Nota: O passo (8) poderá ser realizado em simultâneo com os passos de 1 a 7, por outro aluno do grupo. O padrão para o licopeno não será utilizado, uma vez que a sua aquisição é demasiado dispendiosa.

4.2. Análise dos Pigmentos por Cromatografia em Papel

Preparação das Câmaras de Cromatografia

- 9- Forrar a parede interior de dois gobelés de 250 mL com metade de um círculo de papel de filtro (110 mm Ø). 
- 10- Para a fase móvel, em cada câmara colocar 10 mL de cada umas das seguintes soluções:
 - Câmara 1**- Éter de petróleo 40-60 °C/acetona, na proporção 9:1 (V/V)
 - Câmara 2** – Etanol
- 11- Cobrir com um vidro do relógio e esperar que fique saturada de vapores de solvente.

Preparação e aplicação das amostras

- 12- Cortar duas tiras de papel de cromatografia (4×12) cm². A cerca de 1,5 cm de uma das extremidades, traçar uma linha, com um lápis, a toda a largura do papel.

Nota: Os procedimentos seguintes devem ser realizados em cada uma das tiras de papel. Devem ser preparados 2 cromatogramas.

- 13- Marcar sobre a linha traçada dois pontos igualmente espaçados. No primeiro ponto, com um capilar de cromatografia (um para cada amostra), aplicar o extrato líquido do padrão do betacaroteno (extrato de cenoura) e, no outro ponto aplicar o extrato de tomate (**Anexo 1, Figura 1**). Deixar secar os extratos entre cada aplicação.
- 14- Quando as aplicações apresentarem uma concentração adequada de pigmentos, deixar secar e colocar cada tira na respectiva câmara de cromatografia. Cobrir com o vidro de relógio (**Anexo 1, Figura 2**).
- 15- Manter a tira na câmara e aguardar que a solução se desloque até 3/4 do papel (**Anexo 1, Figura 3**).
- 16- Retirar, marcar a frente do solvente com um lápis e contornar imediatamente as manchas visualizadas com um lápis.
- 17- Analisar os cromatogramas e registar o desenvolvimento e a cor das manchas obtidas. Concluir quanto aos pigmentos presentes.
Acondicionar os cromatogramas em película de alumínio.

2.^a aula**4.3. Separação dos Pigmentos por Cromatografia em Coluna**

18- Começar por preparar, de novo, as câmaras cromatográficas descritas nos pontos 9, 10 e 11 do item 4.2.

Preparação da coluna

19- Colocar um pouco de algodão na extremidade da seringa de 100 mL e seguidamente uma fina camada de areia lavada, de forma a obter uma superfície uniformizada e nivelada;

20- Colocar a seringa no suporte universal;

21- Num gobelé de 100 mL, pesar 15 g de fécula de batata e adicionar 8 a 10 mL de etanol. Introduzir esta suspensão na coluna com auxílio de uma vareta de vidro e empacotar executando pequenos batimentos para compactar e uniformizar a fase estacionária. Recolher, se necessário, o excesso de solvente num gobelé de 100 mL e reservar para reciclar.

Colocação da amostra/eluição

22- Colocar, no topo da fase estacionária, a amostra seca de tomate (preparada e acondicionada no item 4.1(3) da aula anterior), devidamente espalhada com a ajuda de uma espátula (**Anexo 1 Figura 4**).

23- Adicionar, devagar e com uma pipeta de Pasteur, cerca de 20 mL de etanol até eluir completamente a banda amarela. Recolher a fração eluída para um frasco de amostras com tampa e identificar com uma caneta de acetato (**Anexo 1, Figura 4**).

Nota: Deve ter-se o cuidado de nunca deixar secar a coluna para evitar a formação de bolhas de ar.

24- Fazer uma lavagem da coluna com 8 mL de acetona para remover o etanol. Esta fração é desprezada, recolhendo-a nos resíduos de restos de compostos não-halogenados.

25- Adicionar éter de petróleo 40-60 °C até eluir completamente a banda alaranjada (cerca de 20 mL). Recolher para um frasco de amostras e rotular.

26- Preparar dois papéis de cromatografia, aplicando em cada um as amostras das frações recolhidas, e colocar em cada câmara cromatográfica.

5. Resultados

1 - Associe as frações recolhidas aos pigmentos do tomate.

2 – Comente a eficácia da separação realizada, com base nos resultados da cromatografia em papel.

ANEXO 1 – Esquemas de montagem a utilizar



Figura 1 - Aplicação dos extratos líquidos de pigmentos: extrato de cenoura e extrato do CT.

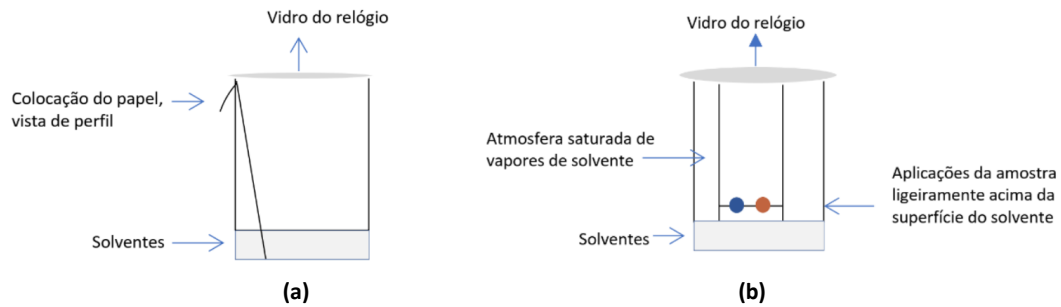


Figura 2 – Cromatografia em papel: colocação na câmara de cromatografia (a) observação de perfil (b) observação de frente

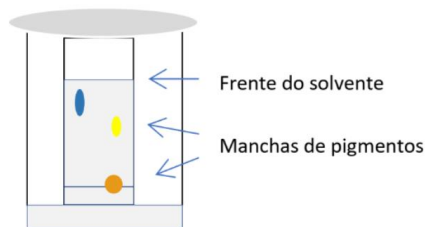


Figura 3 – Desenvolvimento do cromatograma.

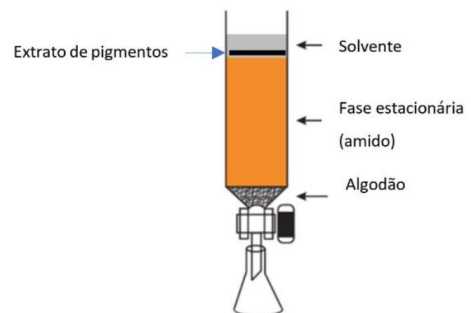


Figura 4 – Coluna de cromatografia.⁷⁷ (adaptado)

Atividade 2

Projeto de Investigação Experimental

Título: A Química na Cor das Flores

1. Introdução

Curtas, alongadas, redondas ou irregulares, de cores cheias, berrantes ou ténues, já para não falar no seu cheiro, as flores não nos deixam indiferentes. Ao longo de meses a sua transformação é notória, cada uma diferente da outra.

Porque é que a coloração das pétalas de uma flor muda? Porque é que as folhas têm cores diferentes das flores? Terão todas as flores pigmentos idênticos? Como identificar e proceder à sua classificação? Serão todos extraídos ou separados com o mesmo tipo de solventes?

Estas questões servem de base às experiências laboratoriais do projeto de investigação a realizar, inserido no plano curricular do ensino secundário e que tem como objetivo principal o estudo dos pigmentos que dão a cor às pétalas das flores.⁷⁸⁻⁸⁰ A temática está diretamente relacionada com vivências dos alunos e constituirá um projeto para ser desenvolvido ao longo do ano letivo, por exemplo, no âmbito do Projeto de Autonomia e Flexibilidade Curricular ou do Domínio de Autonomia Curricular (DAC), numa abordagem interdisciplinar, nomeadamente, com as disciplinas de Química, Biologia, Matemática, Português e Inglês. Também poderá ser desenvolvido num projeto interdisciplinar na disciplina de Química dos Cursos de Ensino Profissional.

É um projeto de articulação, na medida em que os alunos podem estabelecer pontes com os conhecimentos adquiridos e enfrentar os novos desafios que se colocam. Pretende-se que os alunos trabalhem de forma transversal para consolidar os alicerces da aprendizagem, tais como a leitura e a escrita, a oralidade, a utilização das TIC, a pesquisa e organização de dados, o cálculo matemático e o saber técnico e tecnológico.

Em conjunto com os professores, os alunos poderão avaliar a sua capacidade de trabalho em termos de autonomia, comunicação, debate e sentido crítico, seleção e organização da informação, trabalho colaborativo, criatividade e linguagem científica.

A exploração da química das plantas constituirá um projeto de química experimental diferente dos trabalhos laboratoriais propostos nos currículos tradicionais, que além da vertente da investigação irá fornecer aos alunos a experiência prática relacionada com conceitos já apreendidos e contribuir para melhorar a sua atitude em relação à química.

Neste projeto, pretende-se ainda incentivar o recurso a práticas letivas mais responsáveis e amigas do ambiente, partindo do uso de materiais do dia-a-dia ou que sejam comuns nos laboratórios do ensino secundário. Os princípios da QV podem ser aqui lecionados e/ou divulgados no âmbito do desenvolvimento de competências na área do bem-estar e saúde, educando para a consciência da importância da construção de um futuro sustentável.

Será uma atividade de ensino-aprendizagem que possibilitará ao aluno melhorar a literacia científica e tecnológica e adquirir, à saída do ensino obrigatório, competências adequadas ao perfil do aluno para o século XXI.⁷²

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais. Desenvolvimento de valores a diversos níveis: responsabilidade e integridade, excelência e exigência, curiosidade, reflexão e inovação, cidadania, participação e liberdade, autonomia e autoestima.⁷⁴

2.2. Objetivos específicos das áreas principais (Química e/ou Biologia). Trabalhar conceitos e práticas inerentes à Química e/ou à Biologia, tendo por base a pesquisa e o trabalho experimental:

- Fazer uma pesquisa bibliográfica sobre o tipo de pigmentos presentes nas flores e os métodos de identificação e classificação de pigmentos vegetais;
- Aprender a separar pigmentos de pétalas de flores realizando extrações líquido-sólido e técnicas de cromatografia em coluna e em papel;
- Aplicar os princípios da química orgânica;
- Prever a solubilidade de substâncias e polaridade de moléculas;
- Selecionar materiais e solventes ambientalmente mais benignos;
- Divulgar os Doze Primeiros Princípios da QV;
- Seguir as Regras de Segurança e Prevenção em laboratório/manuseamento adequado de materiais e equipamentos.

3. Metodologia

A atividade deverá constar do plano anual de atividades das disciplinas envolvidas e terá que ser acompanhada da planificação/cronograma das fases do projeto e dos respetivos critérios de avaliação.

No início do ano letivo, será apresentada a planificação do projeto experimental e fornecida a bibliografia recomendada aos alunos. Deve-se aqui fazer referência à necessidade de selecionar

materiais e solventes o mais benignos possível, analisando alguns dos princípios da QV. Os alunos deverão recolher informação sobre as classes de pigmentos mais comuns nas flores, características químicas e métodos de extração e separação desses pigmentos, no âmbito da cromatografia.

Com base nos dados recolhidos, os discentes, deverão elaborar um plano, ou pré-projeto laboratorial, contendo um breve resumo dos procedimentos a desenvolver: materiais/equipamentos, reagentes e técnicas experimentais, cuidados de segurança. Após apresentação dos pré-projetos, os professores deverão analisar as propostas e fornecer os procedimentos laboratoriais como referência, para que os alunos possam comparar e avaliar as suas propostas. Após discussão conjunta, o professor deverá orientar os alunos na tarefa de ajustar os planos de trabalho apresentados no pré-projeto. Uma vez ajustados os planos, será estabelecida a calendarização das tarefas a realizar. No laboratório os alunos deverão executar o plano preparado e, se necessário, fazer alguns reajustamentos, nunca descurando as orientações e anuências do professor.

Todos os registos recolhidos deverão ser analisados e partilhados e darão aos alunos capacidade para justificar e argumentar as suas explicações, baseadas nas suas evidências, durante a apresentação oral dos trabalhos.

Na tabela 1 apresenta-se uma proposta de calendarização das diferentes ações do projeto e as disciplinas intervenientes. Durante o ano letivo, propõe-se a utilização de 18 a 20 tempos, distribuídos pelas disciplinas envolvidas.

Tabela 1 – Proposta do plano de ação do projeto: calendarização das etapas e disciplinas intervenientes.

Calendarização	Disciplina	Ações
1ª semana outubro	Química/Biologia	Apresentação do projeto aos alunos; Passeio por locais ajardinados.
4ª semana de outubro		Elaboração de grupos (3 alunos); Atribuição da flor (rosa, amor-perfeito, dália, petúnia) em estudo a cada grupo; apresentação de referências bibliográficas.
Até final da primeira semana janeiro	Disciplinas envolvidas	Pesquisa bibliográfica/elaboração do pré-projeto laboratorial.
2ª semana de janeiro	Química/Biologia	Apresentação/debate do pré-projeto laboratorial: procedimentos, necessidades e recursos. Segurança laboratorial e QV
15 de janeiro a 28 fevereiro	Química	Realização dos procedimentos laboratoriais.

Até 15 de março	Química/Biologia	Partilha, análise, discussão dos resultados e conclusões.
1ª semana de maio	Química/Biologia	Apresentação oral dos trabalhos. Relatório final.
	Português/Inglês	Elaboração de um resumo dos resultados obtidos no projeto, sob a forma de um texto resumido em Português e Inglês (abstract) para divulgação num poster, jornal escolar ou noutras plataformas; e também em forma de uma tabela que esquematize a composição em pigmentos de cada flor estudada.
1ª semana de junho	Disciplinas envolvidas	Auto e Heteroavaliação.

Para a realização do procedimento experimental sugere-se a utilização de três tempos consecutivos de 50 minutos ou, em alternativa, um bloco seguido de 100 minutos, num total de dois blocos. Neste caso, aconselha-se a deixar a separação cromatográfica, em coluna, para o segundo bloco de 100 min. Os frascos contendo os extratos líquidos devem ser envolvidos em folha de alumínio e colocados no frigorífico durante o tempo de espera (uma semana, no máximo).

4. Resultados

- Registrar em tabelas os resultados obtidos: volumes de eluentes gastos, a coloração das bandas ao longo da coluna e frações de pigmentos, o tempo necessário à eluição de cada fração de pigmentos, testes colorimétricos.
- Fazer o registo fotográfico.
- Escrever um relatório final (máximo 10 páginas + anexos), escrito na 3ª pessoa da voz passiva, do qual devem constar os itens da tabela 2.

Tabela 2– Proposta de organização do relatório final.

1. Título descritivo-	
2. Introdução – (2 páginas)	Deve conter um breve resumo acerca das finalidades do trabalho proposto. Abordagem à flor em estudo, pigmentos presentes e técnicas utilizadas para a extração e separação dos pigmentos.
3. Procedimentos laboratoriais (3 páginas)	Preparação dos extratos de flores; Cromatografia em papel e cromatografia em coluna, análise colorimétrica.
4. Resultados	Fotografias dos cromatogramas dos extratos brutos. Tabela com registos e descrição das manchas.

	Fotografias da separação de bandas durante a eluição da coluna e frações recolhidas da coluna. Tabela com registos dos volumes de eluentes e tempos de eluição na coluna, cor da banda e da fração recolhida. Testes colorimétricos e cromatogramas das frações recolhidas.
5. Discussão dos resultados	Análise dos resultados dos cromatogramas obtidos com base nas diferenças de polaridade entre os sistemas eluentes. Análise do comportamento dos pigmentos na coluna e dos efeitos de cada eluente na sua separação. Análise dos testes colorimétricos. Análise da sustentabilidade dos materiais utilizados.
6. Conclusões (2 a 3 parágrafos)	Relevância dos resultados e conclusões. Conhecimentos adquiridos com o desenvolvimento do projeto. Aprendizagens realizadas. Importância dos Princípios da QV no ensino da Química.
7. Referências	

5. Avaliação

Serão avaliados os conhecimentos e competências, nos domínios das disciplinas de Química e Biologia, e as atitudes nos restantes domínios. O peso atribuído às diferentes componentes será definido de acordo com os critérios de avaliação de cada grupo disciplinar.

Propõe-se que a avaliação seja realizada em dois momentos do ano letivo, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3– Proposta de avaliação dos grupos de trabalho e do projeto.

2º Período		
Itens a avaliar	Cotação (Pontos)	Total (Pontos)
Interesse e empenho	40	
Pré-projeto	40	200
Desempenho laboratorial	120	
3º Período		
Relatório	100	
Apresentação oral	90	200
Autoavaliação	10	

6. Bibliografia (sugestões)

- Lopes, T. J.; Xavier, M. F.; Gabriela, M.; Quadri, N.; Quadri, M. B. Antocianinas : Uma Breve Revisão Das Características Estruturais e Da Estabilidade. **2007**, 291–297.

- Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. *Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability*, 2000 *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40* (3), 176–249. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>.
- Dias, A. M.; Ferreira, M. L. S. Separação de Carotenoides, Clorofilas e Flavonoides Em Folhas de Plantas: Uma Abordagem Simples e Ecológica. *Bol. S.P.Q.* **2015**, *138*, 57–62.
- Okumura, F.; Soares, M. H. F. B.; Cavalheiro, E. T. G. Identificação de Pigmentos Naturais de Espécies Vegetais Utilizando-Se Cromatografia Em Papel. *Quim. Nova* **2002**, *25*(4), 680–683. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400025>.

7. Procedimentos Experimentais Propostos

7.1. Plano de trabalhos

Na tabela 4, apresenta-se o plano de trabalhos com o resumo de todos os procedimentos experimentais a realizar.

Tabela 4– Proposta do plano de trabalhos laboratoriais

Plano de Trabalhos
A - Extração de pigmentos de flores: extração sólido-líquido
B – Análise e identificação de pigmentos: Cromatografia em papel
<ul style="list-style-type: none"> • Preparação das câmaras de cromatografia; • Cromatografia em papel do extrato líquido; • Cromatografia em papel das frações eluídas da coluna.
C - Separação dos pigmentos: Cromatografia em coluna:
<ul style="list-style-type: none"> • Preparação do extrato sólido; • Preparação da coluna; • Preparação dos eluentes; • Eluição dos pigmentos; • Recolha e identificação das soluções de pigmentos.
D - Testes colorimétricos para identificação de flavonoides

7.2. Perigo e Advertências de reagentes químicos – Consultar Anexo 1

Precauções: Os reagentes/solventes devem ser mantidos longe das fontes de calor e fontes de ignição; Evitar o contacto com a boca, olhos, pele e vias respiratórias; sempre que necessário, usar equipamentos/vestuário adequados (hotte, luvas, bata e óculos de proteção).

7.3. Materiais e Reagentes

Quantidade/Material	Reagentes
1 Seringa descartável de 100 mL	Flores
1 Suporte Universal, garras e noz	Sal fino de cozinha/sulfato de sódio anidro
Algodão	Fécula de batata (amido)
Areia lavada	
1 Almofariz e pilão	Éter de petróleo 40-60°C
3 Gobelés 250 mL	Acetona pura
4 Gobelés de 100 mL	Etanol 99,8 %
4 Balões de diluição de 50 mL	Vinagre
3 Provetas 50 mL	Misturas de:
4 Provetas de 10 mL	éter de petróleo 40-60 °C/acetona (10:90);
1 Proveta 5 mL	éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75);
3 Erlenmyer	éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25);
5 vidros do relógio	acetona/água (1:1).
3 Espátulas;	Butanol
6 Pipetas de Pasteur	Água destilada
3 Conta-gotas	Ácido acético conc.
2 Varetas vidro	Hidróxido de sódio 1 M
1 funil de vidro	Hidrogenocarbonato de sódio 0,25 M
Papel de filtro (110 mm Ø)	Ácido clorídrico 0,75 M
Papel de cromatografia	Solução de Amoníaco 25%
Papel de alumínio	Hotte
6 Capilares de cromatografia	
6 a 8 Frascos de amostras	
Balança digital	
Régua, lápis, caneta de acetato, tesoura	

7.4. Procedimentos

A - Extração de Pigmentos

- 1- Pesar 5,0 g de pétalas, colocar num almofariz e triturar bem com o pilão. Adicionar uma espátula de areia lavada para ajudar na trituração.
- 2- Adicionar acetona em duas frações (2×10 mL), para a extração dos pigmentos, mantendo a trituração durante cerca de 5 minutos.
- 3- Tapar com uma folha de papel de alumínio e deixar a macerar durante cerca de 20 minutos.

4- Filtrar a mistura utilizando um filtro de pregas. Recolher o filtrado para um frasco de amostras e abrigar da luz e do calor. Este extrato líquido de pigmentos de pétalas será aplicado na cromatografia em papel e na preparação do extrato sólido para a cromatografia em coluna.

B - Cromatografia em papel do extrato líquido.

B₁ - Preparação das câmaras cromatográficas

1- Numerar três gobelés de 250 mL de 1 - 3 e colocar em cada um deles, encostado ao interior do vidro, meio círculo de papel de filtro. O papel irá ajudar a câmara a ficar saturada com os vapores de solvente.

2- Adicionar a cada um dos gobelés uma das misturas eluentes que se seguem, medindo com uma proveta de 10 mL o volume necessário de cada um dos eluentes de modo a obter 10 mL de solução com a seguinte composição:

Câmara 1- Éter de petróleo/acetona, (9:1) (V/V) (realizar na hotte)

Câmara 2 – Etanol /Vinagre (1:1)

Câmara 3 – Butanol/Ácido acético/Água (4:1:5) (BAW) (realizar na hotte).

3- Colocar de imediato sobre cada gobelé um vidro do relógio, de forma a que câmara fique fechada.

Nota: Os gobelés podem ser substituídos por erlenmyer de boca estreita.

B₂ - Preparação e aplicação das amostras

4- Cortar três tiras de papel de cromatografia (4×12) cm².

5- A cerca de 1,5 cm da extremidade inferior de cada tira, traçar uma linha, com um lápis, a toda a largura do papel.

6- Em cada tira, aplicar com um capilar de cromatografia a amostra do extrato líquido das pétalas. Deixar secar o extrato entre cada aplicação (**Anexo 2, Figura 1**).

7- Quando as aplicações atingirem uma concentração adequada de pigmentos, deixar secar e colocar cada tira de papel na câmara de cromatografia respetiva, tendo o cuidado de evitar que a fase móvel entre em contacto com a aplicação dos pigmentos. Cobrir com um vidro do relógio (**Anexo 2, Figura 2**).

8- Deixar que a fase móvel se desloque ao longo do papel e, quando esta estiver próxima do topo do papel (cerca de $\frac{3}{4}$ do comprimento do papel), retirar o cromatograma da câmara e traçar uma linha, a lápis, sobre a frente do solvente (**Anexo 2, Figura 3**).

9- Contornar, com um lápis, as manchas coloridas visíveis sobre o papel e deixar secar.

10 - Fazer o registo fotográfico.

Na hotte, colocar o cromatograma sobre a boca de um frasco de solução de amoníaco. Observar e registar as cores reveladas. (**Anexo 3, Tabela 1**)

C - Cromatografia em coluna

C₁- Preparação do extrato sólido de pigmentos

1- Num pequeno gobelé, misturar 1 g de sulfato de sódio anidro com 2 g de fécula de batata;

2- Medir 2 mL de extrato líquido de pétalas e adicionar ao gobelé, envolvendo bem o líquido nos sólidos e agitando até obter uma mistura solta e seca. Resguardar da luz.

C₂ - Preparação das misturas de eluentes (para 2 grupos)

3- Em balões de 50 mL misturar volumes adequados de solventes de modo a preparar cada uma das misturas seguintes: de acetona/éter de petróleo (10:90), acetona/éter de petróleo (25:75), acetona/éter de petróleo (75:25), acetona/água (1:1).

C₃ - Preparação da coluna

4- Colocar a seringa no suporte universal;

5- Introduzir na extremidade da seringa um pouco de algodão seguido de uma pequena camada de areia do mar lavada, de forma a uniformizar e nivelar a superfície;

6- Proceder ao enchimento da coluna introduzindo a fase estacionária sob a forma de suspensão previamente preparada com 15 g de fécula de batata e 10 mL de éter de petróleo. Executar pequenos batimentos para compactar e uniformizar o sólido. Recolher e eliminar o excesso de solvente (**Anexo 2, Figura 4**).

C₄ – Aplicação da amostra e eluição da coluna

Anotar as cores das bandas de pigmentos, os volumes de eluentes gastos e o tempo de eluição de cada fração. Fazer o registo fotográfico.

7- Quando o éter de petróleo tiver descido até o nível de solvente atingir a superfície da fécula, aplicar o extrato seco de pétalas no topo da fase estacionária e espalhar devidamente com a ajuda de uma espátula;

8- Começar a eluição adicionando cuidadosamente, com uma pipeta de Pasteur, o éter de petróleo sobre a amostra (20 a 25 mL). Após passagem de todo o éter de petróleo, ou após deslocação completa da primeira banda colorida, recolher a fração eluída em frascos de amostras e identificar.

9- Completar a eluição, procedendo do mesmo modo com os restantes eluentes, adicionados de acordo com a série eluotrópica seguinte: éter de petróleo 40-60 °C/acetona (90:10) (20 mL); éter de petróleo 40-60 °C/acetona (75:25) (20 mL); éter de petróleo 40-60 °C/acetona (25:75) (20 mL); acetona; acetona/água (1:1) (25 mL).

Nota: Deve ter-se o cuidado de nunca deixar secar a coluna para evitar a formação de bolhas de ar.

C₅ - Cromatografia em papel das frações de pigmentos eluídas.

11- Analisar as frações recolhidas da coluna por cromatografia em papel, seguindo os procedimentos descritos no **ponto B**. Em cada papel de cromatografia poderão ser colocados 3 pontos (no máximo) relativos a 3 frações de pigmentos recolhidas. Ter o cuidado, para que os pontos de aplicação de pigmentos não fiquem muito próximas entre si nem das extremidades laterais do papel de cromatografia (PC).

12- Depois de analisar e de proceder ao registo fotográfico, os cromatogramas resultantes podem ser colocados sobre vapores de amoníaco e observadas as cores de flavonoides e antocianinas reveladas. Este procedimento deve ser realizado na hotte. (**Anexo 3, Tabela 1**)

D – Testes colorimétricos para pesquisa de flavonoides.

Os testes colorimétricos ácido-base devem ser realizados sobre amostras das frações eluídas da coluna.

1- De cada fração recolhida, com uma pipeta de Pasteur ou com um conta gotas, retirar uma pequena alíquota (5 gotas) para três tubos de amostras previamente numerados de 1 - 3 (caso não existam, pode utilizar-se tampas brancas de garrafas).

2- Sobre cada alíquota adicionar 2 gotas de: (1) solução aquosa de HCl (0,75 M); (2) solução diluída de NaHCO₃ (0,25 M) (3) solução aquosa de NaOH (1 M). Registrar fotograficamente as observações realizadas. (**Anexo 3, Tabela 2**)

ANEXO 1: Códigos de Perigo e Advertências de Reagentes Químicos.

Reagente/solvente	Código Perigos / Advertências
Acetona	H225/ Líquido e vapores facilmente inflamáveis; H319/ Provoca irritação ocular grave; H336/ Pode provocar sonolência ou vertigens.
Etanol	H225/ Líquido e vapores facilmente inflamáveis; H319/ Provoca irritação ocular grave
Éter de petróleo	H224/ Líquidos e vapores extremamente inflamáveis; H304/ Pode ser mortal por ingestão e penetração vias respiratórias; H315/ Provoca irritação cutânea; H350/ Pode provocar cancro; H336/ Pode provocar sonolência ou vertigens; H411/Tóxicos para organismos aquáticos.
Butanol	H226/ Líquidos e vapores inflamáveis; H302/Nocivo por ingestão; H315/ Provoca irritação cutânea; H318/ Provoca lesões oculares graves; H335/ Pode provocar irritação vias respiratórias; H336/ Pode provocar sonolência ou vertigens.
Ácido acético	H226/ Líquido e vapor inflamáveis. H314/ Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves
Ácido clorídrico	H290/ Corrosivo para metais; H315/ Provoca irritação cutânea; H319/ Provoca irritação ocular grave; H335/ Pode provocar irritação vias respiratórias.
Sulfato de sódio anidro	Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a legislação da União Europeia.
Hidróxido de sódio	H290/ Corrosivo para metais; H314/Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves
Hidrogenocarbonato de sódio	Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a legislação da União Europeia.

Fonte: Fichas de Dados de Segurança – Merk

ANEXO 2 – Esquemas das montagens a utilizar.

Figura 1 – Aplicação do extrato líquido de pétalas de flores.

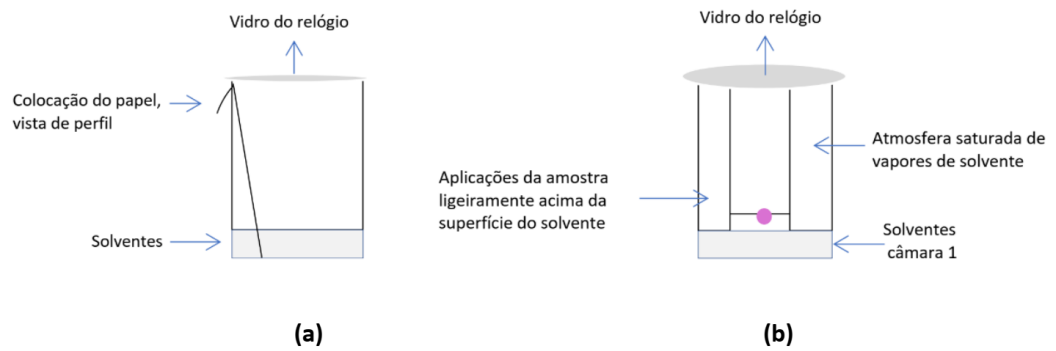
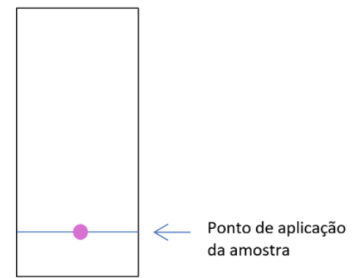


Figura 2 – Cromatografia em papel: colocação na câmara de cromatografia (a) observação de perfil (b) observação de frente.

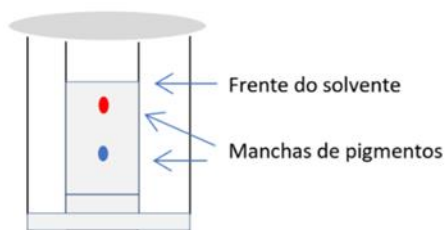


Figura 3 – Desenvolvimento do cromatograma.

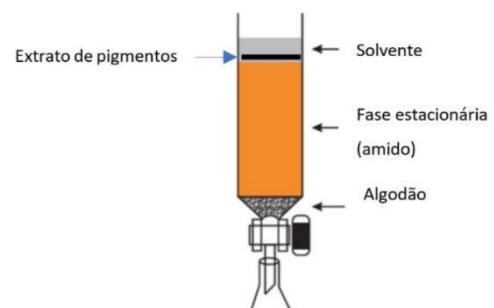


Figura 4 – Coluna Cromatográfica. ⁷⁷ (adaptado)

ANEXO 3 – Testes para a identificação de flavonoides/antocianinas
Tabela 1 - Teste do amoníaco: revelação de flavonoides e antocianinas.³⁶

Pigmentos	Cor à luz visível	Cor revelada sobre vapores de amoníaco
Flavonoides	Amarela, Amarelo brilhante	Amarelo, laranja, vermelho, rosa, púrpura, castanho ou preto
Antocianinas	Laranja, vermelho, púrpura, azul, rosa, magenta	Azul, verde

Tabela 2 – Testes colorimétricos ácido-base – Detecção de antocianinas.³⁶

Solução em meio:	Cor da solução	Pigmentos associados
Ácido	Vermelha	Antocianinas
Levemente alcalino	Azul	Antocianinas
	Verde	Mistura de antocianinas e Flavonoides
Alcalino	Amarela	Flavonoides

CAPÍTULO V

Considerações Finais

O tema proposto sobre o qual se desenvolveu o trabalho aqui descrito foi realmente aliciante e uma verdadeira partida à descoberta do mundo dos pigmentos, tão colorido e sensível.

O conjunto de procedimentos experimentais realizados foram essenciais e determinantes na consecução dos objetivos propostos. Conseguiu-se desenvolver procedimentos experimentais adequadas e reproduzíveis para a extração e separação dos pigmentos do tomate e de pétalas de flores através de técnicas cromatográficas que usam materiais acessíveis.

Foi desenvolvido um método simples e amigável ao ambiente que permite fazer a identificação de pigmentos da classe dos carotenoides, flavonoides e antocianinas através da cromatografia em papel realizada com sistemas eluentes originais, acessíveis e de origem vegetal considerável. A cromatografia em coluna, realizada em seringas descartáveis com enchimento de fécula de batata, permitiu a separação eficiente dos pigmentos e apresentou um impacto visual significativo.

De modo geral, as técnicas e procedimentos desenvolvidos caracterizam-se por um grau elevado de sustentabilidade. Não foi possível abdicar da utilização de solventes orgânicos uma vez que os processos de extração/separação de pigmentos, como os carotenoides, requerem o uso de solventes de baixa polaridade. Considera-se, no entanto, que dentro do grau de perigosidade, os selecionados são os que detêm menores riscos e atendem melhor aos princípios da QV.

O trabalho experimental conduziu à elaboração de duas propostas de atividades adaptadas ao ensino básico ou secundário, com particularidades de ensino diferentes. Uma proposta constitui um tipo de atividade laboratorial muito colorida, em que é fornecido ao aluno um protocolo para separar o betacaroteno e o licopeno presentes no tomate através da cromatografia em papel e em coluna. Trata-se de uma atividade muito atraente, mas segue o modelo de implementação tradicional. A outra atividade consiste num trabalho de projeto experimental que, para além de cativar os alunos pela cor e aproximação à vida real, irá dar-lhes maior literacia científica e competências mais diversificadas. Os alunos irão adquirir aptidões não só na experiência da pesquisa colaborativa e interdisciplinar e no trabalho em equipa, mas também no desenvolvimento da sua autonomia, criatividade, capacidade de execução e na discussão de temas que abordam e levam a uma melhor perceção da química que os rodeia.

CAPÍTULO VI

Referências Bibliográficas

- (1) Figueiredo, R. D. T.; Maia, M. E. Uma Abordagem Investigativa do Trabalho Experimental no Ensino da Química a Alunos Não-Químicos na Universidade. *Enseñanza de las Ciencias* **2005**, *Número ext*, 1–6.
- (2) Martins, I. P.; Vieira, R. M.; Vieira, C. T. A Química nos Primeiros Anos de Escolaridade em Portugal. A Dissolução em Líquidos e o Trabalho Investigativo. <https://doi.org/10.2436/20.2003.02.60> (acedido Fev 7, 2017).
- (3) Callapez, E.; Mata, P. Na Sala de Jantar Com a Química. In *Cadernos Didáticos de Ciências*; MEC: Lisboa, 2001; pp 39–52.
- (4) Garber, K. C. A.; Odendaal, A. Y.; Carlson, E. E. Plant Pigment Identification: A Classroom and Outreach Activity. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90* (6), 755–759. <https://doi.org/10.1021/ed200823t>.
- (5) Masahiko, M. 7th International Conference on Green and Sustainable Chemistry, GSC-7 <http://blogs.rsc.org/gc/2016/08/03/7th-international-conference-on-green-and-sustainable-chemistry-gsc-7/> (acedido Dez 28, 2016).
- (6) Silva, A. Entrevista Presidente SPQ. *Diário Notícias* **2016**.
- (7) Machado, A. A. S. C. Química e Desenvolvimento Sustentável QV, QUIVES, QUISUS? *Bol. S. P. Q.* **2004**, *95*, 59–67.
- (8) Belford, E. R.; Bastin, D. L. ConfChem Conference on Educating the Next Generation: Green and Sustainable Chemistry-An Online Conference. *J. Chem. Educ.* **2013**, No. 90, 508–509. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/ed200759r>.
- (9) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*(1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>.
- (10) Hjeresen, D. L.; Boese, J. M.; Schutt, D. L. Green Chemistry and Education. *J. Chem. Educ.* **2009**, *77*(12), 1543-1547. <https://doi.org/10.1021/ed077p1543>.
- (11) Anastas, P.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Press, O. U., Ed.; 1998.
- (12) Horvath, I. T.; Anastas, P. Innovations and Green Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2169–2173.
- (13) Pinto, J. R. M.; Ribeiro, M. G. T. C.; Machado, A. A. S. C. Pedagogia da Segurança Laboratorial – Solventes no Ensino Secundário. *Bol. S.P.Q.* **2017**, *41* (146), 175–186.
- (14) Machado, A. A. S. C. Das Dificuldades da Química Verde aos Segundos Doze Princípios. *Bol. S. P. Q.* **2008**, *110*, 33–38.
- (15) Pence, L. E.; Kirchhoff, M. M. On Environmental Improvement. *J. Chem. Educ.* **2013**, 510–512.
- (16) Braun, B.; Charney, R.; Clarens, A.; Farrugia, J.; Kitchens, C.; Naistat, D.; Lisowski, C.; O’Neil, A. Completing Our Education. Green Chemistry in the Curriculum. *J. Chem. Educ.* **2009**, *83* (8), 1126-1129. <https://doi.org/10.1021/ed083p1126>.
- (17) Warner, J. C. Green Chemistry and Innovation. In *Teaching and Learning about Sustainability*; ACS, 2015; pp 79–85. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1205.ch007>.
- (18) Fiolhais, C.; Ferreira, A. J.; Braguez, F.; Matos, M.; Rodrigues, S.; Portela, C.; Ventura, G.; Nogueira, R. *Programa de Física e Química A, 10.º e 11.º Anos, Curso Científico-Humanístico de Ciências e Tecnologias*; MEC: Lisboa, 2014.
- (19) Duarte, R. C. C.; Ribeiro, M. G. T. C; Machado, A. A. S. C. O Tratamento da Economia Atômica no Programa e Manuais do Ensino Secundário. *Bol. S. P. Q.* **2019**, *43* (152), 67–77.
- (20) Machado, A. A. S. C. Os Princípios da Química Verde e a Segurança Laboratorial. *Bol. S.P.Q.* **2018**, 47-58.
- (21) Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40* (3), 176–249.

- <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>.
- (22) Glover, B. J. Colouring the Flower; Enhancing Flower Colour. In *Understanding Flowers & Flowering An Integrated Approach*; Oxford University Press: Oxford, 2007; pp 147–168.
- (23) Silva, A. D., Santos, M. E., Gramaxo, F.; Mesquita, A. F., Baldaia, L.; Félix, J. M. *Terra, Universo de Vida 2.ª Parte Biologia, Biologia e Geologia 10.º Ano*, 1.ª Edição.; Porto Editora, 2017, pp 78.
- (24) Álvarez, R.; Vaz, B.; Gronemeyer, H.; De Lera, A. R. Functions, Therapeutic Applications, and Synthesis of Retinoids and Carotenoids. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 1–125. <https://doi.org/10.1021/cr400126u>.
- (25) Shi, J.; Maguer, M. Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40* (1), 1–42. <https://doi.org/10.1080/10408690091189275>.
- (26) <http://quimica.ist.utl.pt/~quimica.daemon/LabAbertos/pdfs/2016/LivrosdosLaboratoriosAbertos2016.pdf> (acedido Fev 13, 2017).
- (27) Vélez, S. M. R. Guide for Carotenoid Identification in Biological Samples. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (5), 1473–1484. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00756>.
- (28) Valduga, E.; Tatsch, P. O.; Tiggemann, L.; Treichel, H.; Toniazzo, G. , Zeni, J.; Di Luccio, M. D. ; Júnior, A. F. Produção de Carotenoides: Microorganismos Como Fonte de Pigmentos Naturais. *Quim. Nova* **2009**, *32* (9), 2429–2436.
- (29) Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Quim. Nova* **2009**, *32* (3), 689–702.
- (30) Periago, M. J.; Rincón, F.; Jacob, K.; García-Alonso, J.; Gaspar, R. Detection of Key Factors in the Extraction and Quantification of Lycopene from Tomato and Tomato Products. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (22), 8825–8829. <https://doi.org/10.1021/jf0705623>.
- (31) Cuccolini, S.; Aldini, A.; Visai, L.; Daglia, M.; Ferrari, D. Environmentally Friendly Lycopene Purification from Tomato Peel Waste: Enzymatic Assisted Aqueous Extraction. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (8), 1646–1651. <https://doi.org/10.1021/jf3027815>.
- (32) Sirvent, T. M.; Miller, A. L.; Vaughan, P. Effects of Storage Conditions on Lycopene Stability in Tomato Extracts. An Undergraduate Experiment. *J. Chem. Educ.* **2009**, *86* (11), 1304–1306. <https://doi.org/10.1021/ed086p1304>.
- (33) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5).
- (34) Havsteen, B. H. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **2002**, *96* (2–3), 67–202.
- (35) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical Studies of Anthocyanins: A Review. *Food Chem.* **2009**, *113* (4), 859–871.
- (36) Strack, D.; Wray, V. Anthocyanins. In *Methods in Plant Biochemistry Volume 1 - Plant Phenolics*; Harborne, J.B.; Dey, P. M., Ed.; Academic Press Limited: London, 1989; pp 325–352.
- (37) Lopes, T. J.; Xavier, M. F.; Quadri, M. G. N.; Quadri, M. B. Antocianinas : Uma Breve Revisão das Características Estruturais e da Estabilidade. *R. Bras. Agrociência* **2007**, *13* (3), 291–297.
- (38) Galloway, K. R.; Bretz, S. L.; Novak, M. Paper Chromatography and UV-Vis Spectroscopy to Characterize Anthocyanins and Investigate Antioxidant Properties in the Organic Teaching Laboratory. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92* (1), 183–188. <https://doi.org/10.1021/ed400520n>.
- (39) Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Brouillard, R. Analysis and Biological Activities

- of Anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, *64* (5), 923–933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2).
- (40) Barczak, B. A. Acylated Anthocyanins as Stable, Natural Food Colorants – A Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2005**, *14* (2), 107–116.
- (41) Markham, K. Flavones, Flavonols and Their Glycosides. In *Methods in Plant Biochemistry Volume 1 Plant Phenolics*; Dey, P. M.; Harborne, J. B., Ed.; Academic Press: London, 1989; pp 197–232.
- (42) Harborne, J. B. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*; 1973.
- (43) Ferreira, O.; Pinho, S. P. Solubility of Flavonoids in Pure Solvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51*, 6586–6590.
- (44) Fonseca, S. F.; Gonçalves, C. S. Extração de Pigmentos do Espinafre e Separação em Coluna de Açúcar Comercial. *Química Nova na Escola* **2004**, *20*, 55–58.
- (45) Du Toit, M. H.; Eggen, P. O.; Kvittingen, L.; Partali, V.; Schmid, R. Normal- and Reverse-Phase Paper Chromatography of Leaf Extracts of Dandelions. *J. Chem. Educ.* **2012**, *89*, 1295–1296. <https://doi.org/10.1021/ed200851w>.
- (46) Johnston, A.; Scaggs, J.; Mallory, C.; Haskett, A.; Warner, D.; Brown, E.; Hammond, K.; McCormick, M. M.; McDougal, O. M. A Green Approach to Separate Spinach Pigments by Column Chromatography. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90* (6), 796–798. <https://doi.org/10.1021/ed300315z>.
- (47) Dias, A. M.; Ferreira, M. L. S. “Supermarket Column Chromatography of Leaf Pigments” Revisited: Simple and Ecofriendly Separation of Plant Carotenoids, Chlorophylls, and Flavonoids from Green and Red Leaves. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92* (1), 189–192. <https://doi.org/10.1021/ed500299j>.
- (48) Sjursnes, B. J.; Kvittingen, L.; Schmid, R. Normal and Reversed-Phase Thin Layer Chromatography of Green Leaf Extracts. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92* (1), 193–196. <https://doi.org/10.1021/ed400519v>.
- (49) Quach, H. T.; Steeper, R. L.; Griffin, G. W. An Improved Method for the Extraction and Thin-Layer Chromatography of Chlorophyll a and b from Spinach. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81* (3), 385–397. <https://doi.org/10.1021/ed081p385>.
- (50) Theppawut, I. N.; Posey, F. T.; Tyus, J. C.; Dingra, N. N. Using a Microscale Approach to Rapidly Separate and Characterize Three Photosynthetic Pigment Species from Fern. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92*, 920–923. <https://doi.org/10.1021/ed500344c>.
- (51) Ribeiro, N. M.; Nunes, C. R. Análise de Pigmentos de Pimentões Por Cromatografia Em Papel. *Química Nova na Escola* **2008**, *29*, 34–37.
- (52) Goodrich, J.; Parker, C.; Phelos, R. The Microscale Separation of Lycopene and β -Carotene from Tomato Paste. *J. Chem. Educ.* **1993**, *70* (6), A159.
- (53) Silveira, A.; Evans, J. M. Flash Chromatographic Separation and Electronic Absorption Spectra of Carotenoids: A Project for a Problem-Oriented Laboratory Course. *J. Chem. Educ.* **1995**, *72* (4), 374–375. <https://doi.org/10.1021/ed072p374>.
- (54) Okumura, F.; Soares, M. H. F. B.; Cavalheiro, E. T. G. Identificação de Pigmentos Naturais de Espécies Vegetais Utilizando-se Cromatografia em Papel. *Quim. Nova* **2002**, *25* (4), 680–683. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400025>.
- (55) Zhu, J.; Zhang, M.; Liu, Q. Interdisciplinary Chemistry Experiment: An Environmentally Friendly Extraction of Lycopene. *J. Chem. Educ.* **2008**, *85* (2), 256–257. <https://doi.org/10.1021/ed085p256>.
- (56) Dias, A. M.; Ferreira, M. L. S. Separação de Carotenoides, Clorofilas e Flavonoides em Folhas de Plantas: Uma Abordagem Simples e Ecológica. *Bol. S.P.Q.* **2015**, *138*, 57–62.

- (57) Sewell, P.A.; Clarke, B. *Chromatographic Separations - Analytical Chemistry by Open Learning*, David, K., Ed.; John Wiley & Sons: London, 1987.
- (58) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. An Introduction to Chromatographic Methods. In *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, 1991; pp 665–692.
- (59) Nagel, M. L. Visualizing Separations: How Shopping Can Be Useful for Introducing Chromatography. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90*(1),93–95. <https://doi.org/10.1021/ed200885>.
- (60) Mickey, C. D. Separation Technology 1. Chromatography. *J. Chem. Educ.* **1981**, *58* (12), 997–1003.
- (61) Heinz, G. O. B.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghanel; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewald, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K; Seiler, E.; Zeppenfeld, G. *Organikum Química Orgânica Experimental*, 2.ª Ed.; Gulbenkian, F. C., 1997.
- (62) http://media.rsc.org/Modern_chemical_techniques/MCT5_Chromatography.pdf (acedido Out 28, 2016).
- (63) Green, M. M.; Blankenhorn, G.; Hart, H. Which Starch Fraction is Water Soluble, Amylose or Amylopectin? *J. Chem. Educ.* **1975**, *52* (11), 729–730.
- (64) Corre, D. L.; Bras, J.; Dufresne, A. Starch Nanoparticles : A Review. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1139–1153.
- (65) Moura, W. S. Extração e Caracterização do Amido do Hedychium Coronarium e Elaboração de Filmes Biodegradáveis, Universidade Estadual de Goiás: Brasil, 2008.
- (66) Leonel, M. Analysis of the Shape and Size of Starch Grains from Different Botanical Species. *Cienc. e Tecnol. Aliment.* **2007**, *27* (3), 579–588. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300024> (acedido Mar 20, 2019).
- (67) Carraher Jr, C. E.; Seymour, R. B. Polymer Structure-Organic Aspects (Definitions). *J. Chem. Educ.* **1988**, *65* (4), 314-318. <https://doi.org/10.1021/ed065p314>.
- (68) Talja, R. A; Peura, M.; Serimaa, R.; Joupila, K. Effect of Amylose Content on Physical and Mechanical Properties of Potato-Starch-Based Edible Films. *Biomacromolecules* **2008**, *9*(2), 658–663.
- (69) Hancock, R. D.; Tarbet, B. J. The Other Double Helix—The Fascinating Chemistry of Starch. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77* (8), 988-992. <https://doi.org/10.1021/ed077p988>.
- (70) Leite, L. Contributos Para Uma Utilização Mais Fundamentada do Trabalho Laboratorial no Ensino das Ciências. In *Cadernos Didáticos de Ciências*, MEC: Lisboa, 2001; pp 79–95.
- (71) Almeida, A.; Mateus, A.; Veríssimo, A. Serra, J.; Alves, J.M.; Dourado, L.; Pedrosa, M. A.; Maia, M. E.; Freitas, M.; Ribeiro, R. *Ensino Experimental das Ciências - (Re)Pensar o Ensino das Ciências*, 1ª Edição.; MEC: Lisboa, 2001.
- (72) Fiolhais, C.; Ferreira, A. J.; Constantino, B.; Portela, C.; Braguez, F.; Ventura, G.; Nogueira, R.; Rodrigues, S. *Metas Curriculares do 3º Ciclo do Ensino Básico de Ciências Físico-Químicas*, 2013.
- (73) Ferreira, A. J.; Braguez, F.; Matos, M. G.; Rodrigues, S. *Metas Curriculares de Química 12.º Ano Curso Científico-Humanístico de Ciências e Tecnologias*, Lisboa, 2014.
- (74) *Aprendizagens Essenciais | Articulação Com o Perfil dos Alunos 12.º Ano/Química*; MEC: Lisboa, 2018.
- (75) *Aprendizagens Essenciais | Articulação Com o Perfil dos Alunos 7.º ANO | 3.º Ciclo Do Ensino Básico Físico-Química*; MEC: Lisboa, 2018.
- (76) Pinela, J.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, I. C. F. R. Bioactive Compounds of Tomatoes as Health Promoters. *Nat. Bioact. Compd. from Fruits Veg.* **2016**, 48–91. <https://doi.org/10.2174/9781681082431116010009>.
- (77) Ahmad, U.; Mushtaq, Z.; Kanwal, N.; Asghar, N. Evaluation of Tomato Waste Extract as

-
- Natural Source of Antioxidant in Cookies. *Can. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *1* (1), 20–29.
- (78) Carmel, J. H.; Herrington, D. G.; Posey, L. A.; Ward, J. S.; Pollock, A. M.; Cooper, M. M. Helping Students to “Do Science”: Characterizing Scientific Practices in General Chemistry Laboratory Curricula. *J. Chem. Educ.* **2019**, *96* (3), 423–434. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00912>.
- (79) Stout, R. “The Chemicals Project”: Connecting General Chemistry to Students’ Lives. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*(10), 1301-1302. <https://doi.org/10.1021/ed077p1301>.
- (80) Andreoli, K.; Calascibetta, F.; Campanella, L.; Favero, G.; Occhionero, F. Plants and Chemistry: A Teaching Course Based on the Chemistry of Substances of Plant Origin. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79* (8), 976-979. <https://doi.org/10.1021/ed079p976>.

