

IDENTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS DE ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZANDO-SE CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Fabiano Okumura, Márlon Herbert Flora Barbosa Soares e Éder Tadeu Gomes Cavalheiro*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos - SP

Recebido em 14/5/01; aceito em 28/11/01

IDENTIFICATION OF NATURAL PIGMENTS FROM VEGETAL SPECIES USING PAPER CHROMATOGRAPHY. The use of natural dyes to demonstrate principles of paper chromatography is proposed. Extraction of the coloring compounds were performed in order to obtain the aglycone form of the anthocyanins present in the crude extracts. Separations were carried out on chromatographic paper with BAW (butanol/acetic acid/water) as mobile phase and the results compared with literature data. The crude extracts were obtained from *Tibouchina granulosa*, *Rhododendron simsii*, *Impatiens walleriana* flowers which are widely found in Brazil and *Phaseolus vulgaris* L. grains skin which is the principal ingredient of the world famous "feijoada". Such species were chosen in order to attract the students attention since they are present in their quotidian, in agreement with the new proposals for Brazilian education.

Keywords: paper chromatography teaching; anthocyanins; chemical education.

INTRODUÇÃO

Métodos de separação são um capítulo importante em química, uma vez que, muitas vezes, é necessário isolar substâncias provenientes de um mesmo meio reacional para sua purificação ou separar interferentes para sua adequada identificação e/ou quantificação.

Dentre os diferentes métodos de separação propostos destacam-se as técnicas cromatográficas, que constituem um conjunto de procedimentos que vão desde simples técnicas de bancada até sofisticadas metodologias instrumentais¹.

O ensino dos princípios de tais técnicas pode ser feito usando-se várias fases estacionárias (papéis de filtro², giz³, areia⁴, etc.) e diversas amostras, tais como: pigmentos de tecidos vegetais⁵, extratos de frutas⁶, pigmentos naturais⁷, tecidos vegetais clorofilados⁸.

Dentre as várias técnicas cromatográficas, aquela com maior potencialidade didática em cursos básicos de química é a cromatografia em papel, devido à sua simplicidade, facilidade de execução e possibilidade de uso de amostras coloridas, em pequenas quantidades. Segundo Braga⁹, a cromatografia em papel, desenvolvida por Consden, Gordon e Martin¹⁰, apresenta boa capacidade de resolução e aplica-se principalmente na separação e identificação de compostos polares.

Nosso grupo tem se preocupado em propor novas atividades nas quais são empregados extratos brutos de espécies vegetais contendo antocianinas¹¹⁻¹⁴. Tais pigmentos atraem de maneira muito positiva a atenção dos alunos, contribuindo de maneira significativa no processo ensino/aprendizagem de conceitos básicos de química, favorecendo as associações interdisciplinares e usando materiais presentes no cotidiano dos alunos, despertando sua expectativa quanto aos resultados das atividades propostas.

As *antocianinas* são definidas por Timberlake e Bridle¹⁵ como derivados de sais flavílicos, solúveis em água, os quais são responsáveis pelas cores atrativas de flores, frutos, folhas, sucos de frutas e até mesmo do vinho. Na natureza, encontram-se associadas a moléculas de açúcares; quando livres destes açúcares são denominadas

antocianidinas (agliconas). A estrutura genérica para uma *antocianidina* natural é apresentada na Figura 1. Dependendo dos substituintes nas posições R e R' define-se uma antocianidina diferente. Uma descrição das principais antocianidinas encontradas na natureza é apresentada na Tabela 1.

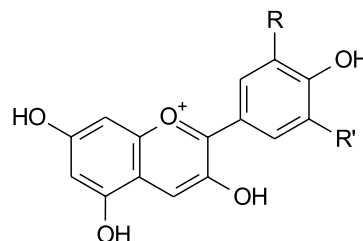


Figura 1. Fórmula estrutural de uma antocianidina genérica

Tabela 1. Substituintes R e R' para antocianidinas naturais

Antocianidina ^(a)	R	R'
cianidina	OH	H
delfinidina	OH	OH
malvidina	OCH ₃	OCH ₃
pelargonidina	H	H
peonidina	OCH ₃	H
petunidina	OCH ₃	OH

^(a) As estruturas correspondentes são relacionadas com a fórmula estrutural genérica apresentada na Figura 1

Harborne¹⁶ propôs um método simples para separar e identificar antocianidinas presentes em extratos vegetais brutos, usando cromatografia em papel. O método foi aplicado por Curtright *et al.*¹⁷ na identificação de pigmentos de frutas e de repolho roxo em um experimento didático.

Considerando-se as vantagens do uso de pigmentos naturais descritos anteriormente¹¹⁻¹⁴, desenvolveu-se um procedimento para a de-

*e-mail: cavalheiro@dq.ufscar.br

monstração de princípios básicos de cromatografia em papel, na separação e identificação de antocianidinas presentes em extratos brutos de quaresmeira (*Tibouchina granulosa*), beijinho (*Impatiens waleriana*), azaléia (*Rododendron simsii*) e do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*, FP).

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico, PA, sem purificação prévia. As soluções foram preparadas com água destilada. Assim, o procedimento é simplificado, não havendo necessidade de se utilizar técnicas e materiais sofisticados, o que facilita a aplicação didática desta atividade experimental.

Obtenção dos Extratos

Os extratos das flores podem ser preparados segundo o procedimento descrito por Harborne¹⁶, que consiste na extração de pigmentos a partir de pequenas quantidades do tecido vegetal, por imersão em cerca de 5 mL de solução etanólica de HCl a 1%, em um tubo de ensaio mantido a 80 °C por cerca de 40 min. O extrato obtido é suficientemente concentrado e pode ser utilizado diretamente, sem evaporar. No entanto, cabe salientar que este é um procedimento específico para pequenas quantidades de tecidos vegetais, o qual permite obterem-se as antocianinas na forma livre de açúcares, as antocianidinas.

Alternativamente, pode-se usar o procedimento descrito por Couto *et al.*¹¹ e Soares *et al.*¹² que permite a obtenção de maiores quantidades de extrato. Neste caso, 300 g do tecido vegetal são imersos em 300 mL de etanol por 48 h e, posteriormente, o solvente é eliminado em evaporador rotatório sob vácuo.

Para o FP é necessário um aquecimento brando (10 min a 60 °C), com água suficiente para cobrir os grãos. A seguir, adiciona-se o dobro de água e aguarda-se 10 min para a extração completa dos pigmentos, filtra-se e elimina-se o solvente por evaporação sob vácuo.

Em todos os casos, o processo de evaporação sob vácuo leva à obtenção de antocianidinas (agliconas), segundo Harborne¹⁶.

Papel utilizado como suporte

Utilizou-se tanto o papel de filtro qualitativo como o papel cromatográfico WHATMAN número 3, para comparação.

Fase móvel

Como fase móvel foi utilizado o eluente conhecido como BAW, uma solução de butanol, ácido acético e água na proporção 4:1:5 (v/v)¹⁶.

Procedimentos

As amostras foram preparadas segundo o método de Harborne¹⁶ e foram obtidos cromatogramas nos dois tipos de papel, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Usando-se um conta-gotas, aplicou-se a amostra a cerca de 1,5 cm de uma das extremidades de um pedaço de papel com aproximadamente 5 cm de largura por 15 cm de altura. Em um béquer com capacidade para 1000 mL foram colocados aproximadamente 50 mL da fase móvel, na qual mergulhou-se o papel até cerca de 0,3-0,5 cm da extremidade próxima à amostra. O papel contendo a amostra foi

preso na parte superior do béquer usando-se um lápis. Como alternativa, pode-se utilizar um pedaço de arame. O sistema foi tapado com filme de PVC de cozinha ou um vidro de relógio, aguardando-se até que a fase móvel percorresse 10 cm do papel.

A fase móvel leva cerca de 2 a 3 horas para percorrer os 10 cm estabelecidos. Após este tempo, o papel foi secado com um secador de cabelos e revelado sob luz ultra-violeta ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Também foi usado iodo como revelador, entretanto não foram obtidos resultados satisfatórios. A partir do centro da mancha revelada, mediu-se a distância percorrida pela amostra (em centímetros) e dividiu-se pela distância estabelecida de 10 cm, determinando-se o Rf experimental, de acordo com a Equação 1:

$$Rf = (d/10) \times 100 \quad (1)$$

na qual d é a distância percorrida pelo centro da mancha, em centímetros.

A identificação dos pigmentos foi feita comparando-se os valores de Rf determinados para cada mancha com os valores de Rf descritos na literatura¹⁶, para as antocianidinas mais comuns.

A Figura 2 apresenta o esquema geral utilizado para os experimentos cromatográficos com os extratos de quaresmeira, azaléia, beijinho e FP, utilizando-se BAW como fase móvel.

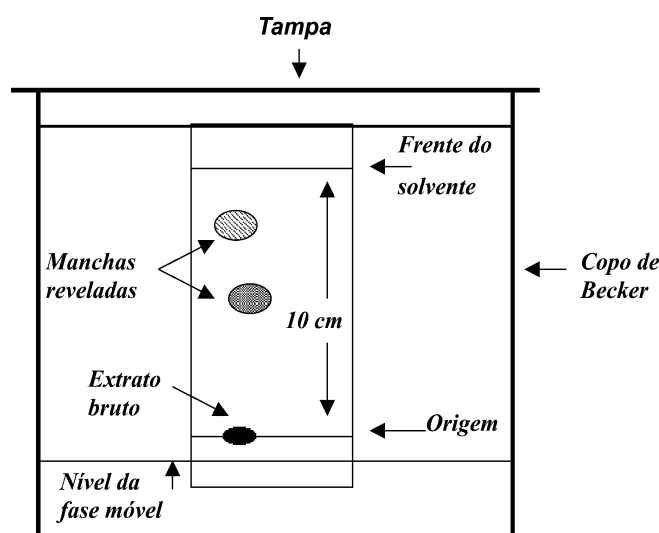


Figura 2. Esquema geral utilizado para os experimentos cromatográficos com os extratos de FP, azaléia, beijinho e quaresmeira, utilizando como fase móvel, BAW

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um cuidado deve ser tomado quando do procedimento de extração para que se tenha certeza de obter antocianinas ou antocianidinas (agliconas). Isso se deve à facilidade de hidrólise dos açúcares presentes, quando a extração é feita em meio ácido sob aquecimento.

Segundo Harborne¹⁶, a hidrólise completa dos açúcares ligados à antocianidina central ocorre em 1 h a 60 °C, na presença de HCl 1% em etanol. Em tempos intermediários, pode ocorrer a hidrólise parcial obtendo-se misturas de agliconas e compostos ligados a açúcares.

Harborne também afirma que a hidrólise completa é obtida quando o extrato etanólico é submetido à roto-evaporação, sob aquecimento, para eliminação do solvente. Para se obter as antocianinas, a extração deve ser feita com metanol sem ácido e sem aquecimento.

No presente trabalho, os procedimentos de extração e secagem dos extratos brutos levam à obtenção de antocianidinas (agliconas).

A Tabela 2 apresenta as principais antocianidinas e os seus respectivos valores de R_f descritos por Harborne¹⁶, para condições experimentais semelhantes às utilizadas em nosso trabalho.

Os resultados obtidos para todos os extratos são apresentados na Tabela 3, a qual apresenta valores de R_f para extratos preparados segundo Harborne¹⁶ e trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo^{11,12}. Os resultados descritos na Tabela 3 são concordantes para os dois procedimentos de extração adotados e levaram à identificação das antocianidinas presentes por comparação dos valores de R_f da Tabela 2.

Para o extrato bruto de **FP**, obtiveram-se 2 manchas cromatográficas atribuídas à presença de delphinidina e pelargonidina, de acordo com as Tabelas 2 e 3.

Os resultados obtidos neste trabalho para o extrato de **FP**, considerando-se os valores de R_f da Tabela 2, são coerentes com o trabalho de Takeoka *et al.*¹⁸ quanto à identificação de delphinidina no extrato de **FP**. No entanto, embora aqueles autores tenham encontrado petunidina ao invés de pelargonidina, descrevem outros trabalhos, anteriores ao deles, nos quais se encontram pelargonidina ou cianidina dependendo sempre da região geográfica de procedência do extrato.

Para o extrato de azaléia, os resultados também são descritos na Tabela 3, sendo confirmadas as presenças da petunidina e da malvidina, cujo valor de R_f observado concorda com o descrito na literatura¹⁶. Já De Loose¹⁹ além destes, descreve a presença de cianidina, a qual não foi detectada neste experimento. A ausência deste pigmento pode estar associada à hidrólise incompleta da cianina original (glicosilada), cujo valor de R_f é sistematicamente menor ou à diferença na região geográfica de coleta, segundo o próprio autor.

Tabela 2. Valores de literatura¹⁶ para os R_f das principais antocianidinas, obtidos de cromatografia em papel

Pigmento	R_f^a
pelargonidina (Pl)	80
cianidina (Cy)	68
peonidina (Pe)	71
delfinidina (Df)	42
petunidina (Pt)	52
malvidina (Mv)	58

^a $R_f = (d/10) \times 100$, em que d = distância percorrida pela mancha (cm), usando o eluente BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5 v/v) em papel cromatográfico.

Para o extrato de quaresmeira, os resultados descritos na Tabela 3 permitem a identificação da petunidina e da pelargonidina enquanto para o beijinho, encontrou-se delphinidina e peonidina.

Em relação aos resultados obtidos para a quaresmeira e para o beijinho, os valores de R_f foram caracterizados segundo os valores-padrão constantes da Tabela 2. No entanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que descrevam antocianinas (antocianidinas) presentes nas flores destas espécies.

A fase móvel que apresentou os melhores resultados foi o BAW. Entretanto, embora também tenham sido realizados alguns testes cromatográficos usando amônia e forestal (HCl, ácido acético e água), como fase móvel, os resultados obtidos não foram satisfatórios quanto à resolução das manchas.

Utilizou-se também papel de filtro como alternativa ao papel cromatográfico, com o objetivo de reduzir custos e tornar o experimento mais fácil de ser executado em escolas. Os resultados foram similares aos obtidos com papel cromatográfico, o que confirma a possibilidade de realização em práticas laboratoriais com custo inferior.

Seria desejável a comparação dos resultados com os R_f de padrões para uma maior confiabilidade dos resultados. Ocorre que padrões comerciais de antocianidinas são raros e de alto custo. Assim, uma vez que o procedimento proposto por Harborne¹⁶ é consagrado como um método para a identificação de antocianidinas de vegetais, os resultados obtidos são considerados confiáveis. O isolamento e a caracterização das antocianidinas através de técnicas como cromatográficas (CG ou CLAE), associadas à espectrometria de massas à espectroscopia na região do infravermelho poderiam fornecer tais padrões. Entretanto, tais metodologias escapam à proposta didática simples que se busca neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro (98/13873-5) e bolsa de M. H. F. B. Soares e ao Programa PIBIC CNPq/UFSCar pela bolsa de F. Okumura.

REFERÊNCIAS

- Collins, C. H. Em *Introdução a Métodos Cromatográficos*; Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S., eds.; Editora da Unicamp: Campinas, 1997, p. 13.
- Croft, L.R.; Haghghis, S.; *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 112.
- Wollrab, A.; *J. Chem. Educ.* **1975**, *52*, 809.
- Lalitha, N.; *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 432.
- Kimbrough, D. R.; *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 987.

Tabela 3. Valores de R_f para os extratos de FP, Azaléia, Beijinho e Quaresmeira

Extrato	$R_f^{a,b,c}$ para extração segundo:		Atribuição
	Harborne ¹⁶	LATEQS ^{11,12}	
Feijão Preto (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	43,0 ± 2,5	42,5 ± 0,7	delfinidina (Df)
	78,0 ± 1,7	79,5 ± 1,1	pelargonidina (Pl)
Azaléia (<i>Rhododendron Simssi</i>)	48,1 ± 2,8	50,8 ± 1,7	petunidina (Pt)
	57,2 ± 1,3	56,3 ± 0,9	malvidina (Mv)
Beijinho (<i>Impatiens walleriana</i>)	41,0 ± 0,6	41,5 ± 0,5	delfinidina (Df)
	73,0 ± 1,1	72,5 ± 0,8	peonidina (Pe)
Quaresmeira (<i>Tibouchina granulosa</i>)	50,9 ± 0,4	51,2 ± 1,1	petunidina (Pt)
	85,3 ± 2,0	84,1 ± 1,3	pelargonidina (Pl)

a – média de três determinações; b – para comparação dos resultados foram obtidos os R_f usando extratos obtidos segundo a metodologia de Harborne¹⁶ e pelo nosso grupo, para as flores¹¹ e para o feijão preto¹²; c – LATEQS = Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções

6. Curtright, R.D.; Rynearson, J. A.; Markwell, J.; *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 682.
7. Séquin-Frey, M.; *J. Chem. Educ.* **1981**, *58*, 301.
8. Anwar, M. H.; *J. Chem. Educ.* **1963**, *40*, 29.
9. Braga, G. L. Em *Introdução a Métodos Cromatográficos*; Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S., eds.; Ed. Unicamp: Campinas, 1997, p. 31.
10. Conden, R.; Gordon, A. H.; Martin, A. J. P.; *Biochem. J.* **1944**, *38*, 224.
11. Couto, A.B.; Ramos, L. A.; Cavalheiro, E. T. G.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 221.
12. Soares, M. H. F. B.; Antunes, P. A.; Cavalheiro, E. T. G.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 408.
13. Soares, M.H.F.B.; Boldrin-Silva, M.V.; Cavalheiro, E. T. G.; *Eclét. Quim.* **2001**, *26*, 225.
14. Soares, M. H. F. B.; Couto, A. B.; Ramos, L. A.; Cavalheiro, E. T. G.; *Book of Abstracts, XI Euroanalysis*, Lisboa, Portugal, 2000.
15. Timberlake; C. F.; Bridle, P. Em *The Flavonoids – Part I*; Harborne, J.B.; Mabry, T. J.; Mabry, H., eds.; Academic Press: New York, 1975, p. 215.
16. Harborne, J.B.; *Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman and Hall: London, 1973, p. 33.
17. Curtright, R.D.; Rynearson, J. A.; Markwell, J.; *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 306.
18. Takeoka, G. R.; Dao, L. T.; Full, G. H.; Wong, R. Y.; Harden, L. A. ; Edwards, R. H.; Berrios, J. de J.; *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, *45*, 3395.
19. De Loose, R.; *Phytochemistry* **1969**, *8*, 253.