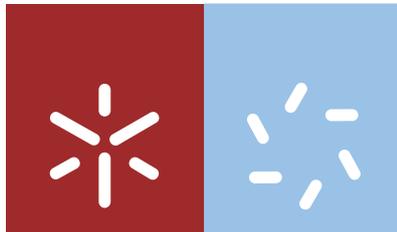


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Maria de La Salette Viana Ferreira

**Novas Atividades Experimentais para o
Ensino Básico / Secundário**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Maria de La Salette Viana Ferreira

**Novas Atividades Experimentais para o
Ensino Básico / Secundário**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Química – Formação Contínua de Professores

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Alice Maria Esteves Dias

DECLARAÇÃO

Nome: Maria de La Salete Viana Ferreira

Endereço electrónico: ml.vianaferreira@gmail.com

Telemóvel: 962881017

Número de Bilhete de Identidade: 7438171

Título da dissertação: Novas Atividades Experimentais para o Ensino / Básico e Secundário.

Orientadora: Doutora Alice Maria Esteves Dias

Ano de Conclusão: 2011

Designação do mestrado: Mestrado em Química – Formação Contínua de Professores

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO, APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, dezembro de 2011

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento à minha orientadora, Dr^a Alice Dias, pelo apoio, acompanhamento e encorajamento que me prestou com vista à consecução deste trabalho de investigação.

À minha família pela disponibilidade total e incentivo nos momentos de desânimo.

A todos os colegas e amigos que me apoiaram durante este processo de formação.

RESUMO

O objetivo primordial deste trabalho consistiu no desenvolvimento de técnicas simples, com impacto visual e em que os materiais utilizados, para além de acessíveis e de baixa toxicidade, fossem produtos do quotidiano.

A separação dos pigmentos vegetais carotenoides, clorofilas *a* e *b* e flavonoides por cromatografia em coluna e em papel foi o tema central da investigação apresentada. Foram realizados vários estudos em que se investigou vários adsorventes não tóxicos do quotidiano, solventes de fácil acesso e procurou-se contornar os problemas encontrados recorrendo sempre a procedimentos experimentais simples de modo a evitar técnicas e equipamentos tipicamente laboratoriais. Os resultados obtidos permitiram desenvolver técnicas de cromatografia em coluna e em papel muito simples e eficazes na separação das bandas coloridas típicas destes pigmentos, que obedecem estritamente aos requisitos estabelecidos.

Prosseguiu-se o estudo com a cromatografia dos pigmentos carotenoides existentes no pimento vermelho, na cenoura e na polpa de tomate. Realizou-se um estudo comparativo entre a maceração dos alimentos em acetona e a sua desidratação prévia em etanol.

Realizou-se ainda algumas atividades com pigmentos flavonoides, nomeadamente a preparação de “bolas camaleão” para determinar o caráter ácido-base de soluções e o tingimento de tecidos com pétalas de rosa.

No Ensino Básico e Secundário é fundamental motivar os alunos para o ensino das ciências. A realização de atividades laboratoriais é um dos meios mais eficazes para atingir esses objetivos. Assim e tendo por base o estudo realizado elaborou-se propostas de atividades laboratoriais para o Ensino Básico e Secundário, que pudessem ser realizadas em laboratórios com pouco equipamento e mesmo em salas de aulas normais.

ABSTRACT

The primary objective of this work was the development of simple techniques, with attractive visual impact, by the use of materials, not only accessible and with a low-toxicity, but also easily found in our everyday lives

The separation of plant pigments carotenoids, chlorophylls *a* and *b* and flavonoids by column and paper chromatography was the central theme of this research project. A series of studies were carried out, where several everyday adsorbents, non-toxic and easily accessible solvents were investigated and in order to circumvent research problems, simple experimental procedures were always carried out in order to avoid typically laboratory techniques and equipment. The obtained results allowed the development of very simple column chromatography techniques that demonstrated to be very effective in the separation of the typical colored bands of these pigments and that strictly matched the primary objectives of the proposed work.

The study proceeded with the chromatography of carotenoid pigments existing in red pepper, carrot and tomato paste. A comparative study was performed involving methods of food maceration in acetone and methods that used a previous food dehydration step with ethanol.

A few activities using the flavonoid pigments were also done, particularly the preparation of "chameleon balls" to determine the acid-base character of solutions, and the dyeing of fabrics with rose petals.

In primary and secondary school it is crucial to motivate students for the teaching of science. Carrying out laboratory activities is one of the most effective ways to achieve those goals. Thus, based on the research studies, proposals for laboratory activities for primary and secondary school were elaborated, so that they could be performed in laboratories without much equipment and even in normal classrooms.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Contextualização geral da investigação	1
1.2.1 <i>As atividades laboratoriais no ensino das ciências</i>	1
1.3 Objetivos da investigação	6
1.4 Relevância da investigação	7
1.5 Limitações da investigação	8
1.6 Plano geral da dissertação.....	8
CAPÍTULO II.....	10
REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Introdução	10
2.2 As atividades laboratoriais e a literacia científica.....	10
2.2.1 <i>O papel das atividades laboratoriais no ensino das ciências</i>	10
2.2.2 <i>Atividades laboratoriais e as perspetivas da educação</i>	17
2.3 História dos pigmentos.....	18
2.4 Pigmentos naturais.....	20
2.4.1 <i>Carotenoides</i>	21
2.4.1.1 <i>Estrutura química dos carotenoides</i>	22
2.4.1.2 <i>Estabilidade dos carotenoides</i>	24
2.4.2 <i>Clorofilas</i>	25

2.4.2.1	<i>Estrutura química da clorofila</i>	26
2.4.2.2	<i>Estabilidade das clorofilas</i>	27
2.4.3	<i>Flavonoides</i>	28
2.4.3.1	<i>Estrutura química das antocianinas</i>	29
2.4.3.2	<i>Estabilidade das antocianinas</i>	30
2.4.3.3	<i>Influência da luz e pH na estabilidade das antocianinas</i>	32
CAPÍTULO III	34
APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	34
3.1	Introdução.....	34
3.2	Desenvolvimento histórico da cromatografia.....	34
3.3	Tipos de cromatografia.....	36
3.3.1	<i>Cromatografia em coluna por partição e por adsorção</i>	36
3.3.2	<i>Cromatografia em papel</i>	37
3.3.3	<i>Cromatografia de gás-líquido</i>	38
3.3.4	<i>Cromatografia em camada fina (TLC)</i>	38
3.3.5	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	38
3.4	Cromatografia de extratos de folhas de plantas.....	39
3.4.1	<i>Revisão da Literatura</i>	39
3.4.2	<i>Resultados de investigação da cromatografia de extratos de folhas de plantas</i>	42
3.4.3	<i>Discussão dos resultados da cromatografia de extratos de plantas</i>	58
3.5	Cromatografia de carotenoides.....	66
3.5.1	<i>Revisão de Literatura</i>	66
3.5.2	<i>Resultados de investigação da cromatografia de carotenoides</i>	67
3.5.3	<i>Discussão dos resultados da cromatografia de carotenoides</i>	72
3.6	Atividades com pigmentos hidrossolúveis.....	76
3.6.1	<i>Revisão de Literatura</i>	77

3.6.2	<i>Resultados das atividades com pigmentos hidrossolúveis</i>	78
3.6.2.1	<i>Preparação de "bolas camaleão"</i>	78
3.6.2.2	<i>Tingimento de tecidos</i>	82
3.6.3	<i>Discussão dos resultados das atividades com pigmentos hidrossolúveis</i>	83
CAPÍTULO IV		88
PARTE EXPERIMENTAL		88
4.1	Introdução	88
4.2	Atividades referentes ao Capítulo 3, ponto 3.4	89
4.2.1	<i>Preparação dos extratos e empacotamento da coluna</i>	89
4.2.1.1	<i>Preparação dos extratos</i>	89
4.2.1.2	<i>Empacotamento da coluna e aplicação da amostra</i>	90
4.2.2	<i>Coluna de bicarbonato de sódio</i>	91
4.2.3	<i>Coluna de areia / açúcar</i>	93
4.2.4	<i>Coluna de farinha de milho amarela / branca</i>	93
4.2.5	<i>Coluna de amido de milho comercial</i>	94
4.2.6	<i>Coluna de fécula de batata</i>	95
4.2.7	<i>Preparação da cromatografia em papel</i>	95
4.3	Atividades referentes ao Capítulo 3, ponto 3.5	95
4.3.1	<i>Material e reagentes</i>	95
4.3.2	<i>Maceração dos alimentos na mistura acetona / éter de petróleo 1 :1</i>	96
4.3.3	<i>Maceração dos alimentos antecedida de desidratação em etanol a 99%</i>	96
4.3.4	<i>Cromatografia em papel dos carotenóides</i>	97
4.3.5	<i>Separação dos pigmentos da polpa de tomate por cromatografia em coluna</i>	98
4.4	Atividades referentes ao Capítulo 3, ponto 3.6	98
4.4.1	<i>Material e reagentes</i>	98
4.4.2	<i>Preparação de "bolas" de alginato de sódio</i>	99

4.4.3 Tingimento de tecidos com pigmentos vegetais.....	100
CAPÍTULO V.....	101
PROPOSTAS DE ATIVIDADES LABORATORIAIS PARA O ENSINO BÁSICO E SECUNDÁRIO	101
5.1 Introdução	101
5.2 Atividades laboratoriais de cromatografia em coluna	102
5.2.1 Cromatografia em coluna de bicarbonato de sódio	102
5.2.2 Cromatografia em coluna de fécula de batata	104
5.2.3 Explicação das atividades de cromatografia em coluna	105
5.3 Atividades com pigmentos carotenoides	107
5.3.1 Isolamento e separação dos pigmentos do pimento vermelho	107
5.3.2 Isolamento e separação dos pigmentos do tomate numa polpa de tomate	108
5.3.3 Isolamento dos pigmentos da cenoura.....	110
5.3.4 Explicação das atividades com pigmentos carotenoides.....	111
5.4 Atividades com pigmentos hidrossolúveis	113
5.4.1 Determinação das propriedades químicas de alguns materiais.....	113
5.4.1.1 “Bolas” coloridas de couve roxa	113
5.4.1.2 Separação dos pigmentos flavonoides por extração	114
5.4.1.3 Tingimento de tecidos com vegetais	115
5.4.1.4 Explicação das atividades com pigmentos hidrossolúveis	116
CAPÍTULO VI.....	117
CONCLUSÕES, IMPLICAÇÕES E SUGESTÕES PARA FUTURAS INVESTIGAÇÕES	117
6.1 Introdução	117
6.2 Principais Conclusões	117
6.3 Implicações para o Ensino da Química.....	119
6.4 Sugestões para Futuras Investigações.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1- Fórmula de estrutura do isopreno	23
2 - Fórmula de estrutura do Licopeno	23
3 - Fórmula de estrutura do β -caroteno	24
4- Fórmula de estrutura do α -caroteno	24
5 - Fórmula de estrutura da Zeaxantina	24
6- Estrutura química das porfirinas	27
7 - Estrutura química das clorofilas	27
8 - Estrutura geral das antocianinas (Castaneda-Ovando, <i>et al</i>)	29
9 - Formas das antocianinas em função do pH (Castaneda-Ovando, <i>et al</i>)	33
10 -Extração dos pigmentos presentes em folhas de plantas	47
11 - Folhas da planta verde e verde (amostra)	47
12- Preparação do extrato bruto sólido anidro	49
13- Cromatografia em papel de frações extraídas de colunas bicarbonato de sódio	54
14- Comparação das cores das primeiras frações verdes obtidas por cromatografia em colunas de bicarbonato de sódio	54
15- Ensaio de estabilidade da clorofila em solução: meio básico e meio ácido	55
16- Cromatografia em papel das frações obtidas da coluna de amido de milho comercial – extrato sólido anidro - preparado com fécula de batata	55
17- Cromatografia em papel das frações obtidas da coluna em fécula de batata – extrato sólido anidro	56
18- Fotos da cromatografia em coluna	56
19- Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D)	69

20- Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D) (continuação)	70
21- Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D) (continuação)	71
22 Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D) (continuação)	72
23 - Fórmula de estrutura da α -criptoxantina	73
24 - Fórmula de estrutura da capsantina	73
25 - Fórmula de estrutura da capsorubina	73
26 – Atividades com “bolas camaleão”	80
27 - Atividades com tingimento de tecidos	83
28 - Estrutura da antocianidina cianidina	86
29 -Estrutura do catião flavílio	86

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
2.1 - Antocianinas e cor respectiva	30
3.1 - Resumo dos resultados das primeiras atividades com extrato bruto líquido	45
3.2 - Resumo dos resultados das atividades com extrato orgânico líquido anidro	48
3.3 - Resumo dos resultados das atividades com extrato bruto sólido anidro em coluna de amido de milho comercial	49
3.4 - Resumo dos resultados das atividades com extrato bruto sólido anidro em coluna de fécula de batata	50
3.5- Resumo dos resultados das atividades com aplicação de extrato bruto sólido anidro preparado com fécula, em colunas de bicarbonato de sódio, açúcar em pó, areia e amido de milho comercial	51
3.6 - Resumo dos resultados das atividades com aplicação de extratos diferentes em coluna de bicarbonato	53
3.7- Soluções ácidas e básicas com o pH respectivo	87

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

Neste capítulo introdutório, que contempla seis subcapítulos, procede-se à contextualização e apresentação da investigação realizada.

No primeiro subcapítulo (1.1) descreve-se como o capítulo está estruturado. O segundo subcapítulo (1.2) diz respeito à contextualização geral da investigação. Nesta secção faz-se uma abordagem ao papel das atividades laboratoriais no ensino das ciências (1.2.1). De seguida definem-se os objetivos da investigação (1.3), a relevância da investigação (1.4) e as limitações da investigação (1.5) e por fim o plano geral da dissertação (1.6).

1.2 Contextualização geral da investigação

1.2.1 As atividades laboratoriais no ensino das ciências

O trabalho prático, nomeadamente as atividades laboratoriais, são fulcrais para o ensino das ciências (Barberá & Valdés, 1996). Há aproximadamente 300 anos John Locke considerou necessário que os estudantes realizassem trabalho prático, e nos finais do século XIX passou a integrar os currículos de ciências em Inglaterra e Estados Unidos (Barberá & Valdés, 1996).

Na última década em Portugal os currículos de ciências e as Orientações Curriculares têm apresentado alterações significativas (Correia & Freire, 2009). As Orientações Curriculares para o 3º Ciclo do Ensino Básico (DEB, 2001 b) apontam para um ensino mais centrado nos alunos, o que obriga os professores a adotarem estratégias diversificadas de ensino que permitam o desenvolvimento de competências essenciais.

Estas Orientações Curriculares valorizam o trabalho laboratorial em que os alunos estejam ativamente envolvidos, sugerem o envolvimento dos alunos em experiências em que tenham oportunidade de aplicar conhecimento científico, para compreenderem melhor os problemas e dilemas do mundo que os rodeia e desenvolverem competências de conhecimento processual e estratégias de resolução de problemas.

Como se pode constatar em DEB (2001 a) “ a atividade experimental deve ser planeada com os alunos, decorrendo de problemas que se pretende investigar e não constituem a simples aplicação de um receituário (p. 131-132).”

O Currículo Nacional do Ensino Básico (DEB, 2001 a) sugere, para o Tema Sustentabilidade na Terra, a “ realização de atividades experimentais de vários tipos: i) investigativas, partindo de uma questão problema, avaliando as soluções encontradas; ii) ilustrativas de leis científicas; iii) aquisição de técnicas (p. 143).”

O trabalho prático é muito importante para o aluno do Ensino Básico desenvolver a capacidade de aprender experimentando, utilizando para isso, os seus conhecimentos prévios, pesquisando informação e construindo novos conhecimentos, tanto de natureza conceptual como de natureza procedimental. Possibilita ainda a promoção de atitudes e comportamentos sociais que são relevantes numa perspetiva de formação para a cidadania (Leite, 2003). Assim, as ciências também contribuem para a educação para a cidadania, através da transformação dos jovens em cidadãos cientificamente cultos e capazes de participar de uma forma ativa e informada na vida da sociedade a que pertencem (Leite, 2003).

Para alguns intervenientes na educação em ciências, nomeadamente professores e autores de manuais escolares é indiferente utilizar os conceitos de trabalho laboratorial e atividades laboratoriais, o que dificulta a utilização racional destes conceitos (Leite, 2001). Por isso, é fundamental esclarecer o significado de cada um deles. Segundo a perspetiva de Leite (2001) o trabalho laboratorial abrange atividades que envolvam a utilização de materiais de laboratório, mais ou menos convencionais. São um conjunto de atividades que permite desenvolver conhecimentos dos domínios conceptual, procedimental e epistemológico.

Para Leite (2001), atividades laboratoriais são aquelas que envolvem o uso de materiais de laboratório, para reproduzir um facto ou fenómeno ou analisar uma parte

do mundo natural a estudar, a execução é normalmente desenvolvida no laboratório, mas na falta deste, numa sala de aula normal desde que esta não coloque em causa a segurança dos intervenientes.

Na opinião desta autora é fundamental ainda distinguir trabalho prático e trabalho experimental. Assim, para Leite (2001) o trabalho prático pode incluir atividades laboratoriais, trabalho de campo, atividades de resolução de exercícios ou de problemas de papel e lápis e pesquisa de informação na internet.

O trabalho experimental inclui atividades que envolvem o controlo e manipulação de variáveis e que podem ser laboratoriais ou outro tipo de atividades práticas (Leite, 2001).

Para a maioria dos professores de ciências a experiência prática é fundamental para o ensino das ciências (Hodson, 1994). O laboratório é um recurso muito importante no ensino e na aprendizagem das ciências (Afonso & Leite, 2000 a; Dourado, 2006), cujas possibilidades educativas têm sido sobejamente reconhecidas (Barros & Losada, 2003).

Por outro lado, é fundamental que os professores compreendam que, apesar de o laboratório ser um recurso importante, ele não constitui a solução para todos os males da educação (Hodson, 1994). Usar o laboratório não é só por si melhor do que não usar. A sua utilidade depende, acima de tudo, do modo como é usado (Afonso & Leite, 2000a).

Segundo Leite (2001) o trabalho laboratorial é o tipo de trabalho prático mais familiar aos professores de ciências. A realização de atividades laboratoriais nas aulas de ciências, é importante para os alunos aprenderem a elaborar conclusões a partir de evidências selecionadas de entre os dados recolhidos em laboratório, bem como para elaborarem atividades que lhes permitam encontrar as evidências necessárias para testar determinadas ideias (Esteves & Leite, 2005).

Para as atividades laboratoriais contribuírem para a aprendizagem dos alunos, é necessário que a sua inserção no ensino seja realizada de modo consciente e que proponha um ensino voltado para a aproximação aos estudantes com o seu mundo, atuando como mecanismo facilitador da aprendizagem nas suas diferentes dimensões pedagógicas, caso contrário, será mais uma ação fracassada no sistema educacional

(Rosa *et al*, 2007). As atividades laboratoriais devem apresentar coerência interna, o objetivo da atividade deve ser claramente reconhecido e o procedimento adequado para o atingir (Leite, 2006).

Uma vez que muitos dos fenômenos com os quais as crianças contactam no seu cotidiano são reprodutíveis no laboratório, Leite (2006) é a favor de que as atividades laboratoriais devem ser desenvolvidas nas aulas para auxiliar os alunos a compreender as explicações construídas pelos cientistas aplicando-as aos fenômenos do cotidiano. Assim, a imagem de ciência que os alunos têm depende do modo como lhes é transmitida pelos seus professores (Praia & Cachapuz, 1994).

No entanto como escreve Hodson (1994) muitas atividades desenvolvidas acabam por afastar os alunos desmotivando-os das aulas de ciências por exigirem apenas que os alunos realizem tarefas mecânicas e rotineiras e cujo sentido e utilidade desconhecem.

Os professores não devem usar o trabalho laboratorial simplesmente porque “a ciência é uma atividade prática”, mas sim de forma racional de modo a promover uma aprendizagem mais significativa das ciências (Afonso & Leite, 2000a).

Não é tanto a quantidade de trabalho laboratorial que é importante mas mais a qualidade desse trabalho (Afonso & Leite, 2000a). Essa qualidade passa entre outros, pela utilização de atividades diversificadas, adequadamente selecionadas e executadas em condições consistentes com os objetivos a atingir (Leite, 2001).

Ao longo dos tempos vários autores (Barbéra & Valdés, 1996; Hodson, 1994; Leite, 2001; Dourado, 2006) têm enumerado os objetivos que se podem atingir com a implementação de atividades laboratoriais. Assim, Hodson (1994) apresenta cinco objetivos que foram elaborados tendo por base os motivos apresentados por professores para realizarem atividades laboratoriais. Para este autor as atividades laboratoriais podem permitir atingir uma diversidade de objetivos que vão desde a aprendizagem de conhecimento conceptual, à aprendizagem de técnicas e competências laboratoriais, à aprendizagem da metodologia científica, ao desenvolvimento de atitudes científicas e à motivação dos alunos (Hodson, 1994).

Também Leite (2001; 2002 b) enumera uma lista de objetivos passíveis de serem alcançados através da utilização das atividades laboratoriais e que abrangem três

domínios, a aprendizagem de conhecimento procedimental, conceptual e da metodologia científica.

Segundo Dourado (2006) o trabalho laboratorial contempla objetivos de vários domínios: do domínio das atitudes (por exemplo: motivar os alunos e estimular a cooperação entre eles); do domínio procedimental (por exemplo: desenvolver capacidades de observação e dominar técnicas laboratoriais); do domínio conceptual (por exemplo: adquirir conceitos e explicar fenómenos) e do domínio da metodologia científica (por exemplo: resolver problemas).

Para que todos os objetivos sejam alcançados, tal como defendem alguns investigadores (Hodson, 1994; Leite, 2001; Dourado, 2006) as atividades laboratoriais têm que ser organizadas em conformidade.

Segundo Barbéra & Valdés (1996) o trabalho laboratorial nem sempre promove a aprendizagem de conceitos científicos. No entanto os cientistas, os educadores em ciências e os investigadores são de opinião que o laboratório deve ocupar um papel central nas aulas de ciências (Leite, 2002 a). Para o trabalho laboratorial favorecer a aprendizagem de conceitos científicos deve salientar a qualidade das atividades realizadas em vez da quantidade, devendo as atividades ser adequadas ao objetivo a atingir (Leite, 2001), para deste modo promover a construção de novas ideias e a reconstrução das conceções alternativas (Leite, 2001).

Apesar de alguma falta de consenso no que se refere aos objetivos que o trabalho laboratorial permite alcançar existe, todavia, concordância no facto de que uma dada atividade laboratorial deverá centrar-se em objetivos específicos (Hodson, 1994; Leite, 2001). Embora a realização de uma mesma atividade laboratorial permita atingir diferentes objetivos (Leite, 2001) o número de objetivos definidos para a realização de cada atividade deverá ser cuidadosamente tido em consideração a fim de que as exigências das atividades não ultrapassem as capacidades de aprendizagem dos alunos (Leite, 2000).

Verifica-se uma diferença entre as perceções dos estudantes e dos professores no que respeita ao objetivo das atividades laboratoriais, assim, como uma diferença entre as interpretações sobre o que constitui o material a ser aprendido (Merino & Herrero, 2007).

Existem atividades laboratoriais com diferentes orientações em função basicamente dos objetivos e dos procedimentos que se pretendem atingir (Barros *et al*, 1998).

Não faz sentido realizar atividades laboratoriais só para motivar os alunos, nem utilizar atividades laboratoriais só para desenvolver atitudes científicas. Estes dois objetivos, no contexto das atividades laboratoriais, surgem sempre a par com outros que são os que justificam a realização da atividade (Leite, 2000).

É fundamental que a utilização do trabalho laboratorial no ensino das ciências exija tipos de atividades diversificadas nas aulas (quer no que respeita aos objetivos que permitem atingir quer no que respeita ao grau de abertura), a conciliação de demonstrações com a realização de atividades pelos alunos e a diversificação e utilização conjunta de técnicas de avaliação das aprendizagens dos alunos (Leite, 2000, 2001).

1.3 Objetivos da investigação

Na presente investigação foram usados os pigmentos vegetais carotenoides, clorofilas *a* e *b* e flavonoides para a consecução dos seguintes objetivos:

- I. Desenvolvimento de técnicas simples que possibilitem a separação dos pigmentos vegetais carotenoides, clorofilas *a* e *b* e flavonoides presentes em folhas com base nos métodos da cromatografia em coluna e em papel, tendo em vista a conceção de atividades cromatográficas simples e com impacto visual fazendo uso de adsorventes e solventes acessíveis e não tóxicos do quotidiano;
- II. Desenvolvimento de técnicas simples que possibilitem a separação e análise dos pigmentos vegetais presentes em diversas fontes naturais com base nos métodos de extração e cromatografia em papel, recorrendo a solventes acessíveis e não tóxicos do quotidiano;
- III. Desenvolvimento de técnicas simples e com impacto visual que envolvem a aplicação da variação de cor das antocianinas em função do pH na identificação de substâncias ácidas e básicas e tingimento de tecidos, partindo de extratos de vegetais e outros materiais acessíveis no quotidiano;

- IV. Inclusão de materiais do cotidiano na Química do Ensino Básico, para que os alunos de todas as áreas, e não apenas os de ciências, tenham oportunidades adicionais para relacionar a química com o mundo real;
- V. Propostas de atividades laboratoriais com materiais do cotidiano e sem necessidade de laboratórios adequadamente equipados nem condições especiais de segurança e que possam, inclusivamente, ser praticadas em qualquer sala de aula.

1.4 Relevância da investigação

Apesar de já existir alguma investigação sobre a inclusão dos materiais do cotidiano nas atividades de química (por ex. Celeghini & Ferreira, 1998; Fonseca & Gonçalves, 2004), no nosso país os trabalhos realizados neste âmbito ainda são escassos.

É reconhecida a eficácia das atividades laboratoriais no que concerne à conceptualização da aprendizagem, apresentando-se como uma estratégia de ensino aceite pela maioria dos autores e que pode conduzir a resultados positivos (Sequeira, 2000). Justifica também uma das preocupações básicas e constantes da Reforma Educativa, traduzida pelas alterações a nível de currículo: a tentativa de renovar as práticas de ensino, incentivando a sua aplicação nos ensinos básico e secundário (Leite, 2001).

Assim, se atendermos à importância assumida pelas atividades laboratoriais no ensino das ciências referida por alguns autores (tratada mais detalhadamente nos pontos 1.2.1 deste capítulo e 2.2.1 do segundo capítulo) e à escassez, nos manuais escolares, de atividades laboratoriais com materiais do cotidiano, não tóxicos e pouco dispendiosos pareceu-nos pertinente aprofundar esta temática. Neste sentido, os resultados do estudo que nos propomos realizar poderão contribuir para uma melhoria do ensino da química.

1.5 Limitações da investigação

A investigação efetuada possui algumas limitações. Estas prendem-se com o tema escolhido e com as atividades laboratoriais propostas.

As propostas de atividades laboratoriais relacionam-se unicamente com os pigmentos naturais carotenoides, clorofilas e flavonoides.

As conclusões que possam advir desta investigação expressam somente o conteúdo relacionado com as atividades laboratoriais realizadas.

1.6 Plano geral da dissertação

A dissertação está estruturada em seis capítulos, que por sua vez se subdividem em subcapítulos. Em cada um constam aspetos distintos, de acordo com as finalidades estabelecidas para a investigação. Para além disso são apresentadas as referências bibliográficas.

No primeiro capítulo, intitulado Capítulo I – Introdução é apresentada a contextualização da problemática em estudo, são identificados os objetivos da investigação e é referida a importância e as limitações da investigação em causa.

Em relação ao segundo, capítulo II – Revisão de Literatura, expõe-se o suporte teórico de base à elaboração da presente dissertação. Para tal é feita uma revisão sobre o papel das atividades laboratoriais no ensino das ciências e procura-se abordar os autores que se debruçaram sobre a problemática das atividades laboratoriais no ensino das ciências e ainda é apresentado uma breve revisão sobre as três principais classes de pigmentos das plantas, os carotenoides, as clorofilas e os flavonoides.

No que concerne ao terceiro, capítulo III – Apresentação e Discussão dos Resultados, procede-se á apresentação e análise dos resultados dos estudos efetuados.

Relativamente ao quarto capítulo, IV – Parte Experimental, apresenta-se uma descrição experimental detalhada das atividades laboratoriais investigadas no presente estudo.

Quanto ao quinto capítulo, V – Propostas de Atividades Laboratoriais, apresentam-se propostas de protocolos de atividades laboratoriais implementáveis nos programas dos ensinos básico e secundário, que resultaram dos estudos realizados nesta dissertação.

Por fim, no sexto capítulo, VI – Conclusões, Implicações e Sugestões, expõem-se as conclusões do trabalho e possíveis contributos para o ensino e aprendizagem das ciências e da Química em particular, assim como algumas sugestões para posteriores investigações.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Introdução

Neste capítulo efetua-se uma revisão da literatura relevante na área em estudo, com a finalidade de estabelecer uma fundamentação teórica para a investigação realizada. O capítulo é, assim, constituído por três partes.

No primeiro subcapítulo (2.1) procede-se à descrição da forma como o capítulo se encontra estruturado. Em relação ao segundo subcapítulo (2.2) faz-se uma abordagem acerca das atividades laboratoriais e a literacia científica, nomeadamente no que concerne ao papel das atividades laboratoriais no ensino das ciências (2.2.1) e às atividades laboratoriais segundo algumas perspetivas da educação (2.2.2). No terceiro subcapítulo é abordada a história dos pigmentos (2.3). No quarto subcapítulo é feita referência aos pigmentos naturais (2.4), designadamente: os carotenoides (2.4.1), a estrutura química dos carotenoides (2.4.1.1), a estabilidade dos carotenoides (2.4.1.2), as clorofilas (2.4.2), a estrutura química da clorofila (2.4.2.1), a estabilidade das clorofilas (2.4.2.2), os flavonoides (2.4.3), a estrutura química das antocianinas (2.4.3.1), a estabilidade das antocianinas (2.4.3.2) e a influência da luz e pH na estabilidade das antocianinas (2.4.3.3).

2.2 As atividades laboratoriais e a literacia científica

2.2.1 O papel das atividades laboratoriais no ensino das ciências

A educação em ciências deve possibilitar que os alunos adquiram ideais de cultura científica e tecnológica para além de instrução científica, para que sejam capazes de desenvolver pensamento crítico e sejam cientificamente literados. As sociedades modernas, cada vez mais evoluídas científica e tecnologicamente, exigem da parte dos

cidadãos tomadas de posição consciente sobre assuntos específicos que estes supostamente devem dominar (Figueiredo & Maia, 2005).

Por isso, a escola, para além de fornecer aos alunos conhecimentos científicos, também deve promover uma Educação em Ciências para que se tornem cidadãos ativos e capazes de interpretar as manifestações do mundo que os rodeia (Leite, 2006), pois enquanto membros de uma sociedade democrática e científica e tecnologicamente avançada, os indivíduos são frequentemente confrontados com situações que lhes exige uma tomada de posição ou mesmo de decisão acerca de assuntos que envolvem conhecimento científico e também valores e aspetos éticos e morais (Leite, 2003).

A escola, que tem um papel fulcral na formação dos cidadãos, deve ser capaz de dar resposta a estas novas exigências contribuindo para a educação para a cidadania e para a literacia científica (Figueiredo & Maia, 2005).

É inegável a contribuição das atividades laboratoriais para o processo de formação dos estudantes nas suas diferentes dimensões. A realização de atividades laboratoriais através da participação ativa dos estudantes é fundamental tanto nos aspetos cognitivos associados à aprendizagem do conteúdo específico, como no que diz respeito ao envolvimento e à motivação para a aprendizagem (Rosa *et al*, 2007).

As atividades laboratoriais influenciam o processo de ensino e aprendizagem, facilitam a compreensão e interpretação de fenómenos fundamentais no futuro das novas gerações, promovem a aquisição de competências significativas para a cidadania e desenvolvem o pensamento crítico (Silva & César, 2005).

Para o trabalho laboratorial contribuir de forma significativa para a literacia dos alunos é necessário atribuir ao aluno um papel ativo, envolvendo-o em atividades com elevado grau de abertura, que exijam a identificação de variáveis e avaliação de dados de modo a identificar aqueles que são relevantes e que constituem evidências do fenómeno em análise (Leite, 2003) e ainda permitir um grande envolvimento dos alunos, familiarizando-os com aspetos tais como execução de procedimentos laboratoriais, controlo e manipulação de variáveis e análise crítica dos resultados obtidos (Afonso & Leite, 2000 a).

A educação em ciências aparece como essencial na construção de uma cidadania científica crítica, estas considerações estão presentes no Currículo Nacional do Ensino

Básico (DEB, 2001 a, p.129), onde a educação em ciências aparece como fundamental na construção de uma cidadania científica crítica, sendo este um dos objetivos a perseguir pela escola, pois exige-se “uma população com conhecimentos e compreensão suficientes para entender e seguir debates sobre temas científicos e tecnológicos e envolver-se em questões que estes temas colocam, quer para eles como indivíduos quer para a sociedade como um todo”.

Deste modo, é evidente que uma das principais preocupações do Currículo Nacional do Ensino Básico (DEB, 2001 a) é o desenvolvimento nos alunos de competências consideradas necessárias para o exercício de uma cidadania participativa e responsável (Esteves & Leite, 2005). Por conseguinte, uma das competências que, segundo este currículo devem ser desenvolvidas nas crianças e jovens que frequentam o ensino obrigatório português, tem a ver com a identificação e utilização de evidências na construção de argumentos e na construção de conclusões (Esteves & Leite, 2005).

As Orientações Curriculares para o 3º Ciclo do Ensino Básico, especificamente para as Ciências Físicas e Naturais (DEB, 2001 b), reconhecem que a literacia científica é indispensável para o exercício pleno da cidadania, pois contribui para o desenvolvimento nos discentes de um conjunto de competências, que se revelam nos domínios do conhecimento, raciocínio, comunicação e atitudes.

A implementação da Reorganização Curricular do Ensino Básico foi regulamentada pelo Decreto – Lei nº 6/2001. Este decreto, que estabelece os princípios orientadores dos reajustamentos curriculares do Ensino Básico, defende a “realização de aprendizagens significativas e a formação integral dos alunos” e nota-se uma insistência em atribuir particular atenção à “valorização das aprendizagens experimentais nas diferentes áreas e disciplinas, em particular, e com carácter obrigatório, no ensino das ciências, promovendo a integração das dimensões teórica e prática” (artigo 3º) e também à “valorização da diversidade de metodologias e estratégias de ensino e atividades de aprendizagem [...]” (artigo 3º).

As atividades laboratoriais são um tipo de atividades de aprendizagem com um valor educacional reconhecido por todos os intervenientes envolvidos na conceptualização e operacionalização da educação em ciências (Coelho, L. 2009). Assim, ocupam um lugar muito importante no processo ensino e aprendizagem das ciências (Coelho, L. 2009).

“O trabalho laboratorial é um recurso teoricamente capaz de contribuir para o desenvolvimento não só de competências específicas pertencentes a domínios como conhecimento (substantivo, processual e epistemológico), raciocínio crítico, comunicação em língua materna e científica e atitudes científicas, mas também de competências gerais tais como resolução de problemas e tomada de decisões, autonomia e cooperação com os outros (Leite, 2003) ”. No entanto, a forma como o trabalho laboratorial costuma ser usado (caracterizado pela existência de protocolos fechados, incluindo atividades que interessam ao professor ou ao currículo, que se baseiam na procura do resultado correto, que exigem a manipulação de equipamentos mas não requerem raciocínio, que envolvam tarefas repetitivas e rotineiras e cuja realização é a avaliação por relatórios) faz com que dificilmente permita alcançar os objetivos referidos, mesmo quando são os alunos quem executa o procedimento laboratorial (Hodson, 1994; Leite, 2003).

Desde há mais de um século, que as atividades laboratoriais são consideradas tanto por professores como por educadores em ciências um recurso educativo de elevado valor no ensino das ciências (Leite, 2002a).

Em Portugal, as orientações propostas para as ciências pelo Governo através do Ministério da Educação, vão ao encontro das ideias defendidas pelos investigadores da área de Educação em Ciências. No Decreto-Lei nº6/2001, de 18 de janeiro, relativo à Reorganização Curricular do Ensino Básico estão estabelecidos os princípios orientadores dos reajustamentos curriculares do ensino básico, estão em vigor desde o ano letivo de 2001/2002. Este Decreto-Lei estipula a obrigatoriedade do trabalho laboratorial como se pode constar na alínea d) do artigo 3º “ valorização das aprendizagens experimentais nas diferentes áreas disciplinares, em particular, e com carácter obrigatório, no ensino das ciências”. Com este Decreto-Lei a duração dos tempos letivos deixou de ser de 45 minutos e passou para 90 minutos, para assim possibilitar as condições necessárias para a realização de atividades laboratoriais centradas no aluno e que permitam a integração dos conhecimentos conceptuais e procedimentais associadas às atividades realizadas (Leite & Dourado, 2005).

As orientações curriculares para as ciências (DEB, 2001b) sugerem que o aluno deve adquirir uma formação completa, desenvolvendo um conjunto de competências que se revelem em diferentes domínios. Assim, o aluno para além da aquisição do

conhecimento conceptual, também deve desenvolver competências de cidadania, tornando-se um cidadão ativo.

Ao analisar as sugestões metodológicas presentes nas orientações curriculares (DEB, 2001b) verifica-se várias referências à utilização do trabalho no laboratório, podendo ser destacadas as seguintes: “formulação de problemas e de hipóteses” (p.5); “planeamento de investigações” (p.5); “previsão e avaliação de resultados” (p.5); “que o aluno desenvolva atitudes inerentes ao trabalho em ciência, como sejam a curiosidade, a perseverança” (p.6); “realização de atividades experimentais [...]”(p.16); “realização de experiências” [...]”(p.17).

Relativamente ao ensino secundário a revisão curricular tem por base uma reflexão iniciada no ano letivo de 1993/94, período em que apareceu o Decreto – Lei nº 286/89, de 29 de agosto, onde se verificou a generalização dos planos curriculares definidos neste Decreto. Posteriormente o Departamento de Ensino Secundário (DES) do Ministério da Educação procedeu a uma organização da Revisão Participada do Currículo com o intuito de solucionar alguns dos problemas encontrados, relacionados com a identidade, conceção e organização curriculares do ensino secundário e tendo em atenção a importância que as formações secundárias devem ocupar na Sociedade Portuguesa (DES, 2000).

Assim, o Ministério da Educação apresentou várias medidas de revisão curricular, tais como a reorganização dos cursos gerais do ensino secundário, valorizando o ensino experimental e uma maior articulação entre a teoria e a prática com a introdução de aulas de 90 minutos (DES, 2000).

O novo programa de Física e Química A, homologado em março de 2001, reformulado em consequência da revisão curricular e em vigor a partir do ano letivo 2003/2004 para os alunos do 10º ano de escolaridade também valoriza as atividades laboratoriais no processo de ensino e aprendizagem.

Ao efetuar uma análise sobre as sugestões metodológicas incluídas nos programas curriculares de Física e Química A do 10º ou 11º anos (DES, 2001) verifica-se a valorização da componente laboratorial no ensino das ciências, é referida a

obrigatoriedade de aulas prático – laboratoriais, com um máximo de 12 alunos, a presença de um técnico de laboratório e especificações relativas ao horário dos alunos.

São também mencionadas as vantagens da introdução da componente prática/laboratorial / experimental no ensino das ciências assim pode ler-se (p.11): “ permite encontrar resposta a situações – problema, fazer a articulação entre a teoria e a experiência e explorar os resultados”; “ permite ao aluno confrontar as suas próprias representações com a realidade”; “ permite ao aluno aprender a observar e, simultaneamente, incrementar a sua curiosidade”;

“ Permite desenvolver o espírito de iniciativa, a tenacidade e o sentido crítico”;” permite realizar medições, refletir sobre a precisão dessas medições e aprender ordens de grandeza”; “ auxilia o aluno a apropriar-se de leis, técnicas, processos e modo de pensar”.

Pode-se deste modo constatar que tanto a Reorganização Curricular do Ensino Básico (DEB, 2001b) e a Reforma Curricular do Ensino Secundário (DES, 2001), defendem a interligação entre as componentes teórica e laboratorial, para desenvolver nos alunos competências relacionadas com a identificação das evidências necessárias ao teste de uma ideia com a utilização de evidências na construção de argumentos (Leite & Esteves, 2004).

É necessário adequar a organização das atividades laboratoriais ao principal objetivo que com elas se pretende atingir e ainda diversificar o tipo de atividades utilizadas no processo de ensino e aprendizagem (Leite, 1999) e ainda para permitir a todos os alunos adquirir as competências consideradas adequadas para um cidadão que terminou a escolaridade obrigatória (Leite, 2003).

O Ministério da Educação reconheceu a importância das atividades laboratoriais no ensino das ciências, tal facto traduz-se na reorganização do currículo que prevê entre outras medidas, o desdobramento das turmas para possibilitar a realização de aulas laboratoriais e ainda o melhoramento das condições materiais das escolas, nomeadamente a nível do equipamento dos laboratórios de ciências (Leite, 2002 a).

A aprendizagem formal das ciências requer contextos de aprendizagem, devidamente selecionados e controlados, que promovam o desenvolvimento das ideias que os alunos já têm, que permitam o aperfeiçoamento das suas metodologias de

construção do conhecimento, para que assim se aproxime do conhecimento cientificamente aceite (Leite, 2002 b).

Por tudo o que foi exposto, nas aulas de ciências além de ensinar ciências é necessário que o aluno aprenda a fazer ciência (Leite, 2002 b).

Ao longo dos tempos, a forma como as atividades laboratoriais têm sido predominantemente utilizadas no ensino das ciências tem oscilado entre a confirmação de conhecimentos previamente apresentados aos alunos e a descoberta pelos alunos dos conceitos científicos que se pretende que sejam aprendidos por eles (Leite, 2001).

Existem ainda alguns investigadores que questionam a eficácia do trabalho laboratorial para aprender conteúdos conceptuais e procedimentais pretendidos, principalmente aqueles que se relacionam com a resolução de problemas (Hodson, 1994).

Assim, é urgente que se produza inovação no trabalho laboratorial que dependerá entre outros de dois fatores: formação docente e a utilização de materiais didáticos adequados (Barros & Losada, 2003).

Para se conseguir atingir o maior número possível de objetivos com o trabalho laboratorial é necessário diversificar os tipos de trabalho laboratorial (leite, 2001) a implementar nas aulas de ciências e ter consciência do facto de cada um desses tipos de atividade ser mais adequado para alcançar uns objetivos do que outros (Dourado, 2006). No entanto a realização de atividades do tipo investigação no laboratório, contribui para que os alunos alcancem, simultaneamente vários objetivos (Dourado, 2006).

Segundo Leite (2000) as atividades laboratoriais são fundamentais para o aluno aprender a conhecer e a usar a metodologia científica, aprendendo assim a fazer ciência, ou seja a resolver problemas, mas para isso é necessário: diversificar os tipos de atividades laboratoriais utilizadas nas aulas; aumentar o grau de abertura das atividades laboratoriais realizadas; definir critérios de avaliação adequados às características das atividades utilizadas; privilegiar a avaliação formativa, realizada a par com a realização da atividade e utilizar diversas técnicas e instrumentos de avaliação, de modo a avaliar a diversidade de conhecimentos associados às atividades laboratoriais.

O nível do Ensino Básico, o principal papel das atividades práticas deverá ser o de promover a literacia científica dos futuros cidadãos, especialmente daqueles que vão abandonar os estudos no final da escolaridade obrigatória (Afonso & Leite, 2000 b).

2.2.2 Atividades laboratoriais e as perspetivas da educação

Uma boa aprendizagem exige a criação de um ambiente em que os alunos “manipulem” objetos e ideias e “negoceiem” significados entre si e com os professores, criando um ambiente construtivista de aprendizagem (Matos & Valadares, 2001). Para isso é necessário que as atividades laboratoriais deixem de ser encaradas numa perspetiva fechada, condutista, na base de guiões tipo receita, não explorando as enormes potencialidades deste tipo de atividades (Matos & Valadares, 2001).

Na perspetiva racionalista é o aluno que tem a responsabilidade de construir o seu próprio conhecimento (Praia & Cachapuz, 1994). Os factos não podem ser abordados duma forma descontextualizada mas antes inseridos numa rede de razões, ou seja, discutidos com os alunos de forma a desenvolver neles o pensamento crítico, as capacidades de fundamentação e argumentação (Praia & Cachapuz, 1994).

Para que os alunos aprendam ciência ao explorar atividades laboratoriais é necessário criar um ambiente construtivista de aprendizagem e adotar estratégias investigativas (Matos & Valadares, 2001).

De entre as propostas que têm sido apresentadas para revalorizar o trabalho laboratorial, assume particular destaque aquela que o encara como uma atividade investigativa de resolução de problemas (Figueiredo & Maia, 2005). As atividades laboratoriais de cariz construtivista e investigativo ajudam os alunos a aprender melhor os conceitos ao facilitarem a atividade de pesquisa sobre várias questões com eles relacionados e ao colocarem-nos na situação de construtores do seu próprio conhecimento (Matos & Valadares, 2001).

Nas atividades laboratoriais o aluno tem envolvimento de natureza cognitiva e / ou manipulativa (Leite, 2001). O envolvimento cognitivo é o mais importante para a compreensão de fenómenos e conceitos, enquanto o envolvimento manipulativo é imprescindível para a aprendizagem de técnicas laboratoriais e para o desenvolvimento de algumas competências procedimentais (Afonso & Leite, 2000 b).

O envolvimento cognitivo dos alunos com atividade prática laboratorial é tanto mais elevado quanto maior for o grau de abertura dessa atividade (Leite, 2001).

As atividades laboratoriais com grau de abertura mais elevado correspondem a atividades do tipo investigação (Leite, 2001). No entanto todas as atividades laboratoriais têm um lugar no ensino das ciências (Leite, 2001), mas é importante que o aluno seja o mais envolvido possível em cada uma delas (Afonso & Leite, 2000 b).

O ensino laboratorial, num ambiente construtivista e investigativo contribui para melhorar os conhecimentos dos alunos modificando e enriquecendo os seus modelos mentais no sentido da aproximação aos modelos compartilhados pela comunidade científica e adquirem diversas capacidades que lhes serão extremamente úteis pela vida fora (Matos & Valadares, 2001).

2.3 História dos pigmentos

Os pigmentos são os principais responsáveis pela cor de uma pintura. Podem ter origem natural ou sintética e, idealmente, são formados por um pó muito fino, insolúvel, com cor intensa e estável, o que seria o ideal (Cruz, 2006 b).

Na antiguidade os pigmentos mais utilizados eram os que se encontravam perto das casas dos artistas. A paleta de cores incluía apenas o ocre amarelo, o ocre vermelho e o preto. A água foi o aglomerante e permitiu que o pigmento fosse pulverizado na boca ou pintado sobre a superfície utilizando os dedos como pincéis (Cruz, 2006 a).

Os Egípcios introduziram novos materiais, sendo o mais importante o azul egípcio, produzido por volta de 3000 AC, foi o pigmento azul mais usado no ocidente durante o período romano (Cruz, 2006 a).

Na Idade Média já existiam relatos de práticas artesanais relativas à pintura que incluíam a preparação de pigmentos (Cabral, 2006 a).

Em Portugal conhece-se um manuscrito “Livro de como se fazem as cores”, redigido em caracteres hebraicos pelo rabi Abraão B. Hayyim, o qual contém receitas para preparar pigmentos (Cabral, 2006 a).

No século XIV o manuscrito *Liber de coloribus illuminatorium siue pictorum*, proveniente de França, inclui um grande número de receitas para preparar pigmentos bem como várias indicações sobre incompatibilidades de alguns deles (Cabral, 2006 a).

Do século XIV – XV conhece-se um manuscrito alemão, o chamado manuscrito de Estrasburgo que contém um conjunto de instruções sobre a preparação de pigmentos (Cabral, 2006 a).

Na Idade Média o ouro foi o material amarelo mais usado. Aplicava-se em folha ou em pó. Os pigmentos já conhecidos na altura eram os ocres amarelos, o ouro musivo, que quimicamente é o bissulfureto de estanho, o amarelo – de – chumbo – estanho que é um óxido de chumbo e estanho, a ázica que seria uma terra amarela e o açafão que é uma especiaria (Cabral, 2006 a).

Os pigmentos verdes usados pelos artistas da Idade Média já eram conhecidos antes. Em relação aos pigmentos verdes naturais, a malaquite era o mais utilizado. Também foram muito utilizadas as terras verdes, que são rochas ricas em minerais argilosos de natureza variada. Também se utilizava o verde- de- espinheiro obtido a partir das bagas do espinheiro e o verde- de- íris que era obtido a partir do sumo extraído de flores de íris (Cabral, 2006). Esta era preparada por suspensão em água: uma de carbono (fumo negro, por exemplo) e outra de um sal orgânico de ferro misturado com outros sais (Cabral, 2006 a).

Atualmente os pigmentos estão disponíveis no comércio sobretudo na forma de tinta pronta a ser usada, vendida normalmente em tubos de metal. Estes foram inventados em meados do século XIX (Cruz, 2006 b). Até ao século XVIII as tintas eram frequentemente feitas na oficina dos pintores a partir de pigmentos igualmente preparados na oficina ou preparados em boticas (Cruz, 2006 b).

Em relação à cor azul, muitos dos pigmentos utilizados pelos artistas medievais, nomeadamente a azurite, o azul- ultramarino e o índigo, já tinham sido usados pelos seus antecessores. O pigmento branco mais utilizado era a cal. Dos pigmentos negros o mais importante foi a tinta de escrever. Esta era preparada por suspensão em água: uma parte de carbono (fumo negro, por exemplo) e outra de um sal orgânico de ferro misturado com outros sais (Cabral, 2006 a).

2.4 Pigmentos naturais

Os pigmentos são compostos químicos que absorvem luz na região do visível. A sua cor é devido à estrutura de uma molécula específica chamada cromóforo (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Os pigmentos podem ser classificados de acordo com a sua origem em naturais, sintéticos ou inorgânicos. Os pigmentos naturais são produzidos por organismos vivos como plantas, animais, fungos e microrganismos. Os pigmentos sintéticos são obtidos em laboratórios (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Os pigmentos naturais são responsáveis pelas cores que nós observamos no nosso dia a dia, pois estão presentes em todos os organismos, nas folhas, frutos, vegetais e flores e ainda na pele, olhos e na estrutura dos animais, bem como nas bactérias e fungos (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

O que caracteriza as cores das flores, folhas, frutos e vegetais são os seus pigmentos, que são quimicamente diferentes dos nossos ou dos outros animais (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

A cor é provocada pela presença de pigmentos que absorvem radiação luminosa na região do ultravioleta e do visível. Estes pigmentos localizam-se nos vacúolos das células vegetais (Couto *et al*, 1998).

Os pigmentos mais abundantes das plantas são: as clorofilas, os carotenoides e os flavonoides, constituindo as antocianinas uma das subclasses dos flavonoides (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

Nos produtos naturais, a maioria das substâncias responsáveis pela cor pertence à classe dos flavonoides (Março & Poppi, 2008).

Atualmente as pessoas têm demonstrado preocupação na utilização de pigmentos sintéticos, pois associam este tipo de pigmentos a doenças, por outro lado tem crescido o interesse nos corantes naturais, aos quais são atribuídos benefícios farmacológicos (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

Os flavonoides e os carotenoides atuam como antioxidantes e podem ser considerados uma alternativa às substâncias sintéticas. Os flavonoides podem ocorrer em todas as partes dos vegetais: tronco, raízes, folhas, flores, frutos e sementes. O β -caroteno é um carotenoide que atua como antioxidante devido às suas ligações duplas conjugadas, que são suscetíveis à oxidação sob a ação da luz e oxigênio (Zeraik & Yariwake, 2008).

No nosso organismo ocorrem muitas reações químicas necessárias à produção de energia. Em algumas destas reações químicas produzem-se os “radicais livres” que são muito instáveis e reativos e estão envolvidos em muitas doenças que afetam o ser humano (Zeraik & Yariwake, 2008).

Os antioxidantes são substâncias capazes de reagir com os radicais livres e neutralizá-los, apresentando como efeitos benéficos o retardamento do processo de aterosclerose, a prevenção da obstrução das artérias e a redução do processo de morte celular em vários órgãos como o cérebro, rins, pulmões e pele (Zeraik & Yariwake, 2008).

2.4.1 Carotenoides

O nome carotenoide deriva do nome científico da cenoura, *Daucus carote* (Soares, 2006).

Os carotenoides são um grupo vasto de pigmentos, apresentam cor desde o amarelo ao alaranjado. Foram identificados nos organismos fotossintéticos e não - fotossintéticos, nas plantas superiores e nas algas, fungos e bactérias (Delgado-Vargas *et al*, 2004). A posição exata dos máximos de absorção varia de pigmento para pigmento e é suficientemente diferente para permitir a identificação de cada carotenoide. As colorações variam desde o amarelo (α -caroteno), passando pelo laranja, até ao vermelho intenso (licopeno) e resultam do padrão de ligações duplas conjugadas na estrutura mais frequente, do tipo C_{40} . A cenoura tem grandes quantidades de α -caroteno e o tomate de licopeno (Zeraik & Yariwake, 2008).

Os carotenoides são pigmentos que se encontram nos cloroplastos das plantas verdes, onde acompanham as clorofilas. São pigmentos naturais presentes em várias

frutas e vegetais, como por exemplo, cenoura, tomate, espinafre, laranja e pêssego (Okumura *et al*, 2002).

Atualmente já foram identificados mais de 600 exemplares de carotenoides, classificados estruturalmente em sete tipos diferentes e distribuídos em várias formas isoméricas (Morais, 2006). Destes, aproximadamente 20 estão presentes em tecidos e no plasma humano, dos quais apenas 6 em quantidades significativas: α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina. O metabolismo humano não é capaz de produzir estas substâncias e depende da alimentação para obtê-las, pois muitas delas são convertidas em vitamina A pelo organismo (Zeraik & Yariwake, 2008).

Assim, são essenciais para a vida e nenhum animal pode sintetizá-los, por isso devem ser ingeridos na dieta (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os carotenoides são fotoprotetores devido à sua atividade antioxidante. Assim, estes pigmentos podem ser utilizados na alimentação para prevenir a degradação de outros compostos (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Nutricionalmente, os carotenoides podem ser classificados como pró-vitamínicos (aqueles com atividade pró-vitamina A) ou carotenoides inativos (aqueles que apresentam apenas atividade antioxidante ou corante) (Soares, 2006).

Muitas doenças como o cancro envolvem processos de oxidação que são mediados por radicais livres. Os carotenoides devido ao seu efeito antioxidante podem ser úteis no tratamento destas doenças, contudo esta aplicação não está completamente testada *in vitro* (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

2.4.1.1 Estrutura química dos carotenoides

Os carotenoides são compostos formados por 8 unidades de isopreno. Todos os carotenoides podem ser considerados como derivados do licopeno ($C_{40}H_{56}$) através de reações de hidrogenação, ciclização, migração da ligação dupla e migração do metilo (Delgado-Vargas *et al*, 2004). As suas moléculas tem a estrutura isoprenóide, com um

número variável de duplas ligações conjugadas, que lhes confere a propriedade de absorver na região de luz visível em diferentes comprimentos de onda, desde 380nm até 500nm, por isso podem apresentar cores que vão desde o amarelo ao vermelho (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Os carotenoides são classificados de acordo com a sua estrutura como: carotenos se têm na sua constituição carbono e hidrogénio, sendo moléculas apolares; 2-oxicarotenos ou xantofilas se têm carbono, hidrogénio e oxigénio e são moléculas polares (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Os carotenoides são lipossolúveis, estáveis e responsáveis pelas cores dos produtos alimentares do amarelo ao vermelho (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

Os carotenoides também podem ser classificados em primários ou secundários (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

Os carotenoides primários são necessários para a fotossíntese das plantas, como por exemplo: β -caroteno, violaxantina e neoxantina (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Os carotenoides secundários estão presentes nos frutos e flores: α -caroteno, β -criptoxantina e zeoxantina (Delgado-Vargas *et al*, 2004).

Os carotenoides das plantas de um modo geral só são visíveis no outono porque se encontram mascarados pelas clorofilas. Quando as folhas envelhecem desaparecem as clorofilas e ficam expostos os amarelos, vermelhos e laranjas dos carotenoides.

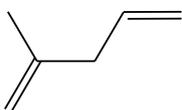


Fig1- Fórmula de estrutura do isopreno

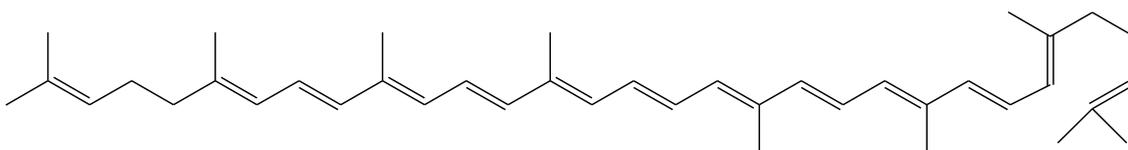


Fig2 - Fórmula de estrutura do Licopeno

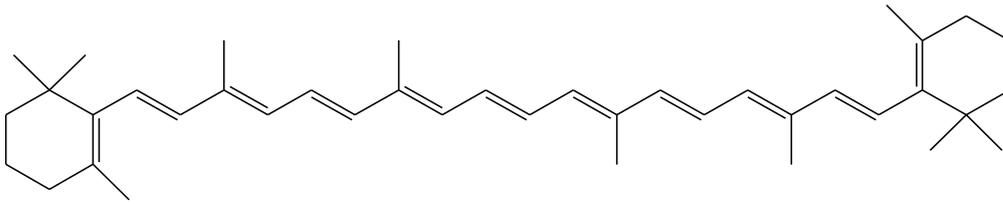


Fig3 - Fórmula de estrutura do β -caroteno

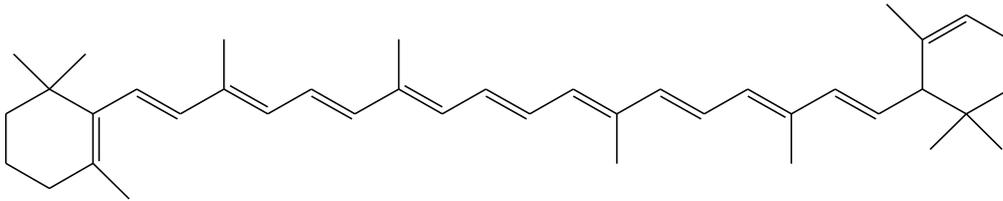


Fig4- Fórmula de estrutura do α -caroteno

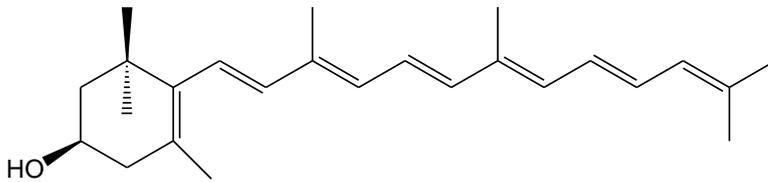


Fig5 - Fórmula de estrutura da Zeaxantina

2.4.1.2 Estabilidade dos carotenoides

Agentes como o calor, ácidos, luz e oxigênio provocam alterações nos carotenoides, envolvendo a formação de isômeros *cis* e epóxidos, que resultam na diminuição da cor e perda da atividade pró-vitamina A (Morais, 2006).

A oxidação é a principal causa da degradação dos carotenoides em alimentos. Estes compostos são facilmente oxidados devido ao grande número de duplas ligações conjugadas. No tecido intacto, os pigmentos estão protegidos da oxidação, no entanto, os danos físicos ao tecido ou a sua extração aumentam a sua suscetibilidade à oxidação.

Os carotenoides podem sofrer oxidação na presença da luz, calor e agentes oxidantes (Morais, 2006).

Os carotenoides são estáveis na faixa de pH entre 3,0 e 7,0 (Morais, 2006).

2.4.2 Clorofilas

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e encontram-se nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais (Streit & Canterle, 2005).

O nome clorofila foi proposto por Pelletier e Caventou, em 1918, para designar a substância verde que se podia extrair das folhas com o auxílio do álcool (Streit & Canterle, 2005).

A clorofila é o pigmento responsável pela cor verde dos vegetais e de alguma fruta (Okumura & Soares & Cavalheiro, 2002). A intensa cor verde das clorofilas deve-se à sua forte absorção nas regiões azul e vermelho do espectro eletromagnético, e transmite na região do verde (Maestrin A. & Neri C, 2009).

No processo de envelhecimento das plantas, estas perdem a cor verde porque a clorofila é convertida em compostos incolores.

A clorofila é um pigmento importante com função fundamental na fotossíntese sendo responsável pela captação de luz solar, produção de oxigênio e açúcares em todos os vegetais autotróficos (Moreira L. & Rodrigues M, 2010).

Estes pigmentos, presentes em quase todos os tipos de plantas, algas e algumas bactérias, têm sido apontados como excelentes fotossensibilizadores, antioxidantes e como agentes terapêuticos no combate de diversas doenças (Maestrin A. & Neri C, 2009).

A clorofila *a* pode ser considerada como o pigmento mais recorrente desta classe de compostos (75% dos pigmentos verdes presentes nas plantas) sendo utilizado em várias composições farmacêuticas, como cosméticos, materiais de higiene bucal, em dietas, culinária e em alguns detergentes (Maestrin A. & Neri C, 2009).

As clorofilas *a* e *b* são encontradas quase sempre em conjunto sendo a clorofila *a* mais abundante na maioria dos casos (Maestrin A. & Neri C, 2009).

A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam a fotossíntese. As bactérias fotossintetizantes não têm clorofila *a* e possuem em seu lugar a bacterioclorofila como pigmento fotossintético. A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro passo do processo fotossintético), enquanto os outros pigmentos que auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação são chamados de pigmentos acessórios, como é o caso da clorofila *b* (Streit & Canterle, 2005).

2.4.2.1 Estrutura química da clorofila

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio. Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol (Streit & Canterle, 2005).

As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1 respectivamente (Streit & Canterle, 2005). A fórmula molecular da clorofila *a* é de fórmula $C_{55}H_{77}O_5N_4Mg$ e difere da clorofila *b* pela presença de um grupo funcional aldeído, em vez do grupo metilo, no átomo de carbono C-7 (Maestrin A. & Neri C, 2009). A clorofila *a* pode ser convertida na clorofila *b* através de uma enzima chamada clorofila *a* oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metilo no grupo aldeído (Streit & Canterle, 2005).

As ligações entre as moléculas de clorofila são muito fracas (não covalentes) e rompem-se com facilidade ao macerar o tecido vegetal em solventes orgânicos.

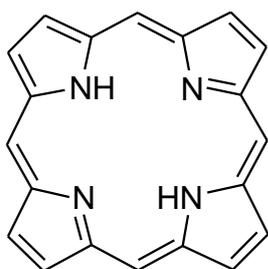
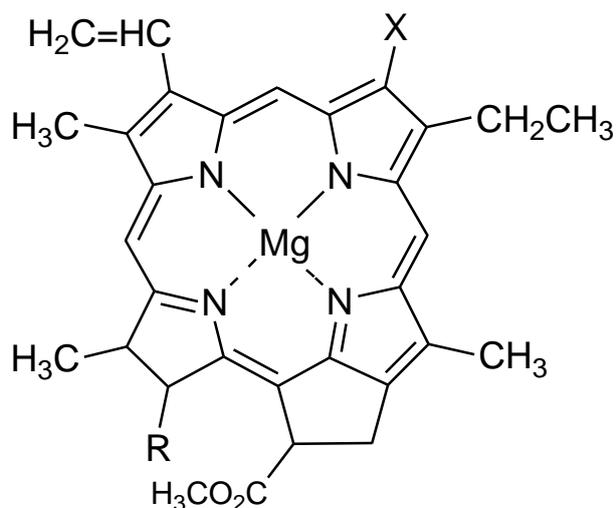


Fig6- Estrutura química das porfirinas



$R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2)_3\text{H}$

Clorofila *a* ($X = \text{CH}_3$)

Clorofila *b* ($X = \text{CHO}$)

Fig7 - Estrutura química das clorofilas

2.4.2.2 Estabilidade das clorofilas

A clorofila *a* é estável em solução de pH 5,3 até 8,0, sendo o metal magnésio mantido na estrutura. Nas soluções de pH entre 3,7 e 5,3 ocorre a reação de desmetalacão (reação de troca do metal com prótons) sendo esta parcial ou completa, dependendo do teor de H^+ . Na faixa de pH 3,7 - 2,0 verifica-se a perda do metal das moléculas de clorofila *a* e obtém-se uma molécula chamada feofitina *a*. Assim em meio muito ácido (pH abaixo de 2,0) tem-se apenas a feofitina (Soares, 2006). A pH básico

(9,0) a clorofila é mais estável ao calor do que a pH ácido (3,0) (Streit & Canterle, 2005).

As clorofilas também podem ser foto-oxidadas sob alta irradiação. Este é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos recetores de luz, os quais, ao absorverem muita luz, ficam muito excitados e interagem com o oxigénio (O₂) produzindo radicais livres, como o superóxido (O₂⁻), podendo destruir os pigmentos (Streit & Canterle, 2005).

2.4.3 Flavonoides

Os flavonoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal, deste grupo fazem parte as antocianinas.

As antocianinas (do grego: anthos = “flor” e kianos = “azul”) são pigmentos naturais responsáveis pelas cores rosa, vermelho, violeta e azul que ocorrem nas flores, frutos e vegetais (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

O termo antocianina foi inventado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não era apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes são atribuídas a pigmentos similares aos que deram origem ao termo antocianina (Março & Poppi, 2008).

Existem em diversos frutos como: cerejas, groselhas, amoras, cacau e vegetais como couve roxa e certas espécies de batata e cebola (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

As antocianinas quando são extraídas do meio natural, apresentam-se na forma de sais de íão flavílio, normalmente ligadas a moléculas de açúcares, sendo os mais comuns a β -D-glucose, a α -D-galactose e a α -D-ramnose (Couto *et al*, 1998).

Na natureza as antocianinas encontram-se ligadas a moléculas de açúcares; quando não têm as moléculas de açúcares denominam-se antocianidinas (Março & Poppi, 2008).

Uma das principais características das antocianinas, com aproveitamento didático é a sua mudança de cor em função do pH do meio (Couto *et al*, 1998).

As antocianinas têm aplicações na área da saúde, devido ao seu enorme potencial terapêutico e na indústria, no fabrico de vinho e como corantes naturais (Março & Poppi, 2008).

2.4.3.1 Estrutura química das antocianinas

Os pigmentos ocorrem na forma de antocianinas, que são derivados das antocianidinas (Março & Poppi, 2008). As antocianidinas não possuem grupos glicosídeos e a maioria possui hidroxilos nas posições 3, 5 e 7. Já nas antocianinas, um ou mais destes grupos hidroxilos estão ligados a açúcares, sendo os mais comuns: glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como *p*-cumárico, cafeico, fenílico e vanílico (Março & Poppi, 2008). O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior estabilidade e solubilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (Março & Poppi, 2008).

Existem na natureza como glicósidos, há seis antocianidinas diferentes a que correspondem substituintes diferentes nas posições 3' e 5' (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

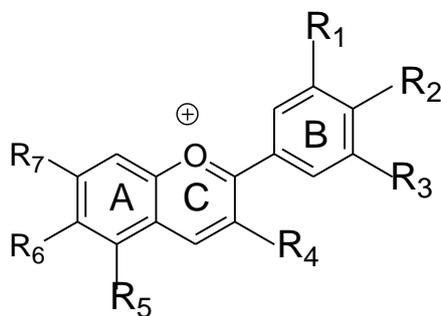


Fig8 - Estrutura geral das antocianinas (Castaneda-Ovando, *et al*)

Tabela 2.1 - Antocianinas e cor respetiva

Antocianina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Cor
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	Laranja-vermelho
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	H	OH	Azul-vermelho
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OH	Violeta
Pelargonidina	H	OH	H	OH	OH	H	OH	Rosa-avermelhado (dos morangos)
Peonidina	OCH ₃	OH	H	OH	OH	H	OH	Púrpura
Petunidina	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OH	Azul-vermelho

A cor depende do número de grupos hidroxilo ou metoxilo do anel B. As antocianidinas são a estrutura básica das antocianinas (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

As antocianinas diferem no número de grupos hidroxilo presentes na molécula, no grau de metilação destes grupos, no tipo e no número de ligações das moléculas de açúcar e no tipo e número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula de antocianina (Szajdek & Borowska, 2008).

As antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C₆ – C₃ - C₆, mas ao contrário de outros flavonoides, as antocianinas absorvem fortemente na região do visível do espectro (Março & Poppi, 2008).

As antocianidinas consistem num anel aromático ligado a um anel heterocíclico, que contém oxigénio o qual está também ligado a uma ligação carbono-carbono, ligado a um terceiro anel aromático (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

2.4.3.2 Estabilidade das antocianinas

As antocianinas isoladas são muito instáveis e muito suscetíveis à degradação.

A sua estabilidade é afetada por vários fatores tais como: pH, armazenamento, temperatura, estrutura química, concentração, luz, oxigénio, solventes, presença de enzimas, flavonoides, proteínas e iões metálicos. As antocianinas são estáveis nas

condições de processamento dos alimentos desde que se mantenha o pH (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

O aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas (Março & Poppi, 2008).

Na presença de cátions de alumínio, ferro, estanho e outros metais, as antocianinas formam produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como corantes que apresentam estabilidades ao calor, pH e oxigênio superior à das antocianinas livres (Março & Poppi, 2008).

A suscetibilidade das antocianinas à descoloração é aumentada consideravelmente na presença de ácidos fenólicos. O mesmo efeito é observado na presença de flavonoides não-antociânicos, especialmente os flavonóis como por exemplo a rutina (Março & Poppi, 2008). O acetaldeído, aminoácidos e taninos também aumentam a estabilidade da molécula. Este aumento de estabilidade é devido à copigmentação, ou seja, associação entre antocianina e flavonol (copigmento), por ligações de hidrogênio, em que o flavonol forma uma estrutura protetora que envolve a antocianina (Março & Poppi, 2008).

Os copigmentos podem ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos, metais ou outra antocianina (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

A copigmentação é um fenômeno no qual os pigmentos e outros compostos orgânicos sem cor ou íons metálicos, formam associações moleculares ou complexos, que provocam a mudança ou o aumento da intensidade da cor (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

Alguns investigadores sugerem que a copigmentação das antocianinas com outros compostos (copigmentos) é o principal mecanismo de estabilização da cor nas plantas. Os copigmentos são sistemas ricos em elétrons π os quais são capazes de se associarem aos íons flavílicos, que são pobres em elétrons π (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

2.4.3.3 Influência da luz e pH na estabilidade das antocianinas

As antocianinas são permitidas como corantes alimentares, contudo não têm encontrado muita aplicação especialmente porque as cores só são intensas a valores de pH muito baixos, o que é limitativo na variedade de alimentos onde pode ser usado (Março & Poppi, 2008).

A luz é outro fator de grande importância na alteração da cor das antocianinas, A transformação é mais intensa quando o fator luz é combinado com o oxigênio (Março & Poppi, 2008).

A cor depende do número de grupos hidroxilo ou metoxilo do anel B e da ligação ao derivado do açúcar (glicósido) (Castaneda-Ovando *et al*, 2009).

As antocianinas apresentam cores diferentes consoante o pH do meio em que elas se encontram, o que facilita o seu uso como indicadores naturais de pH (Terci & Rossi, 2002). As mudanças estruturais que ocorrem com a variação do pH são responsáveis pelo aparecimento das espécies com colorações diferentes, incluindo o amarelo em meio fortemente alcalino (Terci & Rossi, 2002).

A pH 1, a espécie predominante é o catião flavílio (cor vermelha) e contribui para as cores púrpura e vermelha. A valores de pH entre 2 e 4 predominam espécies azuis do tipo quinona (B-D). A valores de pH entre 5 e 6 são observadas apenas duas espécies incolores: a pseudobase carbinólica (E) e a calcona (F). A valores mais elevados do que 7, as antocianinas sofrem processos de degradação que dependem dos grupos substituintes e que culminam com a formação de produtos amarelos. Assim, à medida que o pH aumenta os azuis passam a dar lugar aos verdes (azul + amarelo) e a pH muito elevado, próximo de 14 observa-se apenas os produtos de degradação amarelos e deixa de existir reversibilidade (Castaneda-Ovando *et al*, 2009), estas mudanças podem ser explicadas pelo esquema das principais transformações ilustradas na figura.

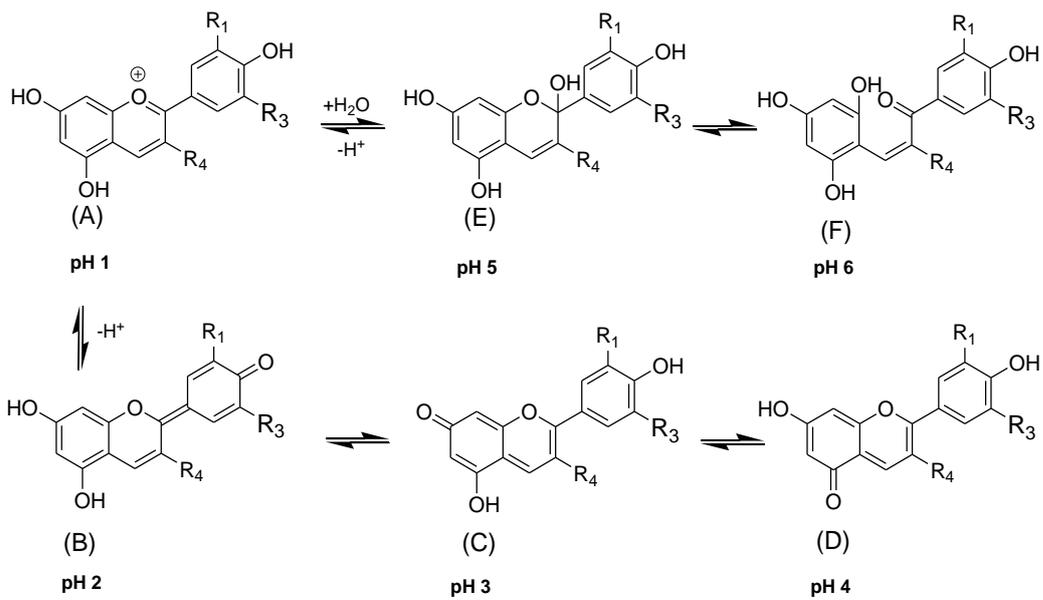


Fig9 - Formas das antocianinas em função do pH (Castaneda-Ovando, *et al*)

CAPÍTULO III

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1 Introdução

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados da investigação.

O capítulo encontra-se dividido em seis subcapítulos. No primeiro subcapítulo (3.1) procede-se à descrição de como o capítulo se encontra estruturado. Relativamente ao segundo subcapítulo (3.2), este apresenta uma breve perspetiva histórica da cromatografia. O terceiro subcapítulo (3.3) aborda os vários tipos de cromatografia, especificamente: cromatografia em coluna por partição e adsorção (3.3.1), cromatografia em papel (3.3.2), cromatografia de gás-líquido (3.3.3), cromatografia em camada fina (3.3.4) e cromatografia de troca iónica (3.3.5). O quarto subcapítulo (3.4) refere-se à cromatografia de extratos de folhas de plantas e apresenta uma revisão da literatura (3.4.1) seguida dos resultados de investigação neste tema (3.4.2) e discussão dos resultados obtidos (3.4.3). O quinto subcapítulo (3.5) aborda a cromatografia de carotenoides, seguido de uma revisão da literatura (5.3.1), dos resultados da investigação (5.3.2) e da discussão dos resultados da cromatografia com carotenoides (3.5.3). Quanto ao sexto subcapítulo (3.6), este reporta atividades com pigmentos hidrossolúveis, seguida de uma revisão da literatura (3.6.1), dos resultados das atividades com pigmentos hidrossolúveis (3.6.2), nomeadamente da preparação de “bolas camaleão” (3.6.2.1) e do tingimento de tecidos (3.6.2.2), por último da discussão dos respetivos resultados (3.6.3)

3.2 Desenvolvimento histórico da cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Esta técnica é baseada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que resulta das interações diferentes de cada um dos componentes entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (Degani *et al*, 1998).

A palavra cromatografia foi utilizada pela primeira vez em 1903 por Tswett, químico russo que realizou a separação dos componentes de extratos de folhas (Valente *et al*, 1983). Nesse estudo Tswett recorreu ao éter de petróleo como fase móvel e a uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária. Adicionou o extrato a essa coluna e com o éter de petróleo conseguiu a separação dos componentes em faixas coloridas. Este foi provavelmente o motivo pelo qual a técnica ficou conhecida como cromatografia (chrom = cor e graphi = escrita) (Degani *et al*, 1998). O interesse de Tswett pelos pigmentos verdes e amarelos dos cloroplastos motivou as primeiras descrições sobre a cromatografia de adsorção em coluna (Gaucher, 1969). Até ao ano de 1919, Tswett publicou vários artigos e um livro, onde fez referência a mais de uma centena de sólidos com propriedades adsorventes e descreveu as técnicas de separação desenvolvidas (Valente *et al*, 1983).

No entanto, esta técnica de separação foi raramente utilizada até 1931, altura em que Kuhn e Lederer desenvolveram as técnicas de Tswett para separar as xantofilas da gema de ovo (Valente *et al*, 1983).

Seguiram-se várias separações cromatográficas de muitos pigmentos naturais, mostrando que os compostos hidrofóbicos coloridos eram bem separados por esta técnica (Gaucher, 1969). Surgiu então a necessidade de separar compostos incolores e hidrofílicos tais como os constituintes das proteínas, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos. Esta necessidade conduziu ao desenvolvimento de uma técnica de cromatografia que utilizava os fenómenos de troca iónica e de partição (Gaucher, 1969). Apesar disso, a utilização generalizada da cromatografia de troca iónica só foi possível em 1935, quando Adams e Holmes sintetizaram a primeira resina de troca iónica (Gaucher, 1969).

Em 1941 Martin e Synge, cientistas ingleses que desenvolveram a cromatografia por partição, descobriram que quando se aplicava uma mistura de aminoácidos no topo de uma coluna de gel de sílica contendo quantidades definidas de água, estes compostos poderiam ser separados utilizando um solvente orgânico adequado através da coluna (Gaucher, 1969). Estes dois cientistas propuseram as bases da cromatografia por partição e aplicaram o conceito de Altura Equivalente a Um Prato Teórico à cromatografia tendo recebido o Prémio Nobel de 1952 (Valente *et al*, 1983).

Em 1944, Consden, Gordon e Martin desenvolveram a técnica de cromatografia em papel (Valente *et al*, 1983), substituindo o gel de sílica por tiras de papel (Gaucher, 1969).

Em 1952 a cromatografia por partição teve um significativo avanço com a descoberta da cromatografia gás-líquido quando James e Martin apresentaram os primeiros resultados experimentais obtidos por utilização de um gás como fase móvel (Valente *et al*, 1983).

Durante este período também se verificou um rápido desenvolvimento da cromatografia de adsorção em que era utilizada uma fina camada de adsorvente sobre uma placa de vidro (Gaucher, 1969). Em 1958, Stahl contribuiu para esse desenvolvimento ao descrever um dispositivo para a preparação de “open columns” (Gaucher, 1969).

A cromatografia tornou-se uma técnica muito utilizada para a identificação de compostos por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos e para a separação dos componentes de uma mistura (Degani *et al*, 1998). É de referir ainda que a compreensão do mundo biológico a nível molecular deveu-se em grande parte aos avanços registados pelos métodos cromatográficos (Gaucher, 1969).

3.3 Tipos de cromatografia

3.3.1 Cromatografia em coluna por partição e por adsorção

A cromatografia em coluna é uma técnica com grande aplicação no isolamento de produtos naturais e purificação de produtos em reações químicas. As fases estacionárias mais utilizadas são a sílica e alumina, embora estes adsorventes possam funcionar apenas como suporte para uma fase estacionária líquida. Na cromatografia de separação por adsorção, as fases estacionárias estão no estado sólido e na cromatografia líquida por partição encontram-se no estado líquido (Degani *et al*, 1998).

Na cromatografia em coluna por partição a coluna é empacotada com um sólido poroso de elevada área superficial (por exemplo gel de sílica), o qual foi previamente

revestido com a fase estacionária líquida (normalmente água). Os componentes da mistura são separados ao longo da coluna devido à passagem de uma fase móvel, geralmente uma mistura de solventes orgânicos. A separação dos componentes depende da sua solubilidade relativa na fase estacionária e na fase móvel. Assim, a diferente distribuição entre as duas fases resulta no movimento dos componentes ao longo da coluna com velocidades diferentes, (os componentes mais solúveis na fase estacionária movem-se mais lentamente ao longo da coluna) (Gaucher, 1969).

Quando um sistema cromatográfico alcança o equilíbrio, a relação entre as concentrações ou atividades de um soluto nas duas fases torna-se uma constante e pode ser expressa como uma constante de equilíbrio, chamada de coeficiente de distribuição ou de partição (KD). Um exemplo clássico é a distribuição de um soluto orgânico entre a solução aquosa e o solvente orgânico (Mickey, 1981). Por convenção, tal equilíbrio é representado por:

$$KD = [\text{solute}] (\text{org}) / [\text{solute}] (\text{aq})$$

Cada componente da mistura irá interagir de forma diferente com a fase móvel e com a fase estacionária, portanto cada componente terá um coeficiente de partição característico (Mickey, 1981).

Na cromatografia de coluna por adsorção, a separação dos componentes das misturas é determinada pela distinta adsorção entre estes componentes e a fase sólida e os solventes orgânicos. Os compostos que são mais fracamente adsorvidos são os primeiros a sair da coluna (Gaucher, 1969).

3.3.2 *Cromatografia em papel*

A cromatografia em papel é uma técnica simples que permite analisar pequenas quantidades de amostra e pode ser utilizada na separação e identificação de pigmentos (Ribeiro & Nunes, 2008). O papel é formado praticamente por celulose que é constituída por várias unidades de glucose ligadas por átomos de oxigénio. Um líquido polar como a água tem grande afinidade para a celulose, porque estabelece ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo das unidades de glucose ficando retida à sua superfície, e assim, pode funcionar como fase estacionária (Março & Poppi, 2008). Os

componentes de uma mistura serão então partilhados entre a fase estacionária, constituída por celulose e água ligadas e uma mistura de solventes orgânicos (fase móvel) que move-se através do papel por capilaridade (Gaucher, 1969). Estes líquidos menos polares deslocam-se a uma velocidade superior porque são repelidos pela fase estacionária. Assim, a cromatografia em papel é uma técnica de separação líquido-líquido baseada na diferente solubilidade apresentada pelas substâncias da amostra para duas fases (Março & Poppi, 2008, Gaucher, 1969).

Este método é muito utilizado, pois recorre a uma técnica e equipamento muito simples (Gaucher, 1969).

3.3.3 Cromatografia de gás-líquido

Nesta técnica o empacotamento da coluna é efetuado com um sólido poroso que é revestido com uma fina camada de um líquido não volátil como fase estacionária. Os componentes da mistura são separados de acordo com a diferença de afinidades entre a fase estacionária e a fase móvel gasosa que geralmente é o gás hélio (Gaucher, 1969).

3.3.4 Cromatografia em camada fina (TLC)

Neste método o adsorvente é colocado sobre uma placa de vidro e origina uma fina película de espessura uniforme. Tal como acontece na cromatografia em papel, também nesta técnica o solvente (fase móvel) sobe por capilaridade ao longo da placa de vidro. A cromatografia em camada fina é capaz de aliar a capacidade da cromatografia de adsorção de compostos não polares com a simplicidade e sensibilidade da cromatografia em papel (Gaucher, 1969).

3.3.5 Cromatografia de troca iónica

Com este método, os compostos ionizados presentes em soluções aquosas (fase móvel) são separados devido às suas diferentes afinidades para os grupos ionizados que compõem o sólido insolúvel (fase estacionária). Estes sólidos são geralmente resinas de

poliestireno sintético em forma de esferas que contêm grupos ácidos (trocam catiões) e grupos básicos (trocam aniões) (Gaucher, 1969).

3.4 Cromatografia de extratos de folhas de plantas

Os processos físicos de separação são abordados no Ensino Básico e Secundário na disciplina de Ciências Físico-Químicas fazendo parte do programa do 7º ano (incluídos no tema “Terra em Transformação”) e também do 10º ano (incluídos no tema “Materiais: Diversidades e Constituição”). No entanto, as atividades laboratoriais que se encontram nos manuais e nos cadernos de atividades apenas apresentam demonstrações de cromatografia em papel já sobejamente conhecidas.

As atividades de cromatografia em coluna não são encontradas nesses manuais, talvez motivado pela dificuldade em obter materiais acessíveis, pouco dispendiosos e não tóxicos aliados a técnicas de execução simples.

Considerou-se então ser necessário e interessante desenvolver técnicas de cromatografia em coluna passíveis de serem adaptadas a qualquer sala de aula e a qualquer nível de ensino. Neste âmbito os estudos realizados foram focados na investigação do comportamento de materiais do quotidiano, como alternativa aos reagentes e materiais usados nos tradicionais métodos de separação de pigmentos descritos nos manuais de laboratório existentes.

3.4.1 Revisão de Literatura

Na pesquisa bibliográfica realizada para este efeito encontrou-se uma enorme variedade de atividades de cromatografia em coluna, em que são utilizados diversos materiais do quotidiano como adsorventes.

Sherma & Strain (1968) utilizaram uma coluna com açúcar comercial em pó para separar os pigmentos das plantas, designadamente os carotenoides e as clorofilas. Segundo estes autores a extração dos pigmentos poderia ser realizada com metanol ou com acetona. Nos dias húmidos sugeriram a adição ao açúcar de 10% de amido de

milho ou em alternativa realizar a separação unicamente com amido de milho. Como solventes utilizaram 0,5 e 1% de *n*-propanol em éter de petróleo. Conseguiram separar os pigmentos segundo a seguinte sequência: carotenos, clorofila *a*, luteína, clorofila *b*, violaxantina e neoxantina. Utilizaram ainda a mistura 0,5-1% de isopropanol em éter de petróleo e verificaram que a separação das bandas de pigmentos apresentou menor nitidez do que a obtida com o *n*-propanol. Verificou-se que nas colunas em que usaram amido de milho e utilizaram como solvente 0,5% de *n*-propanol em éter de petróleo, a ordem de sequência em que os pigmentos foram separados foi diferente da conseguida com açúcar: a luteína e a clorofila *a* não se conseguiram separar completamente e primeiro apareceu a banda da luteína e só depois a da clorofila *a*. As bandas da clorofila *b* e da violaxantina ficaram muito próximas uma da outra. Os mesmos autores repetiram o procedimento anterior mas utilizaram 1% de *n*-propanol em éter de petróleo, tendo obtido resultados similares aos conseguidos com o açúcar.

Fonseca & Gonçalves (2004) realizaram a separação de pigmentos de espinafres numa coluna com açúcar comercial refinado. Na preparação do extrato utilizaram uma mistura de acetona comercial e um removedor de ceras doméstico constituído essencialmente por dodecano. Estes autores antes de aplicarem o extrato na coluna separaram a fase aquosa da fase orgânica e à fase orgânica adicionaram uma pequena quantidade de sal de cozinha para eliminar a água. Para a eluição dos pigmentos amarelos na coluna, o solvente foi o removedor de cera. Para a eluição dos pigmentos verdes usaram o mesmo solvente, ao qual adicionaram 25% de acetato de etilo.

Diehl-Jones (1984) realizou a separação dos pigmentos de espinafres através de uma coluna de cromatografia com açúcar granulado. A extração dos pigmentos foi efetuada por trituração dos espinafres num almofariz com uma mistura de metanol e éter de petróleo que foi filtrada e recolhida num funil de separação. A fase aquosa foi separada da fase orgânica, antes de aplicar o extrato na coluna. Para eliminar a água da fase orgânica acrescentaram sulfato de sódio anidro. Como eluente utilizaram a seguinte mistura: cicloexano ou isoctano (duas partes), acetona (uma parte) e éter dietílico (uma parte).

Oliveira *et al* (1998) efetuaram a separação dos pigmentos das folhas de espinafres utilizando uma coluna de cromatografia com giz (sulfato de cálcio). O extrato foi preparado por maceração das folhas de espinafres em acetona/ benzina, 2:8. O pau

de giz foi triturado num almofariz ao qual se adicionou benzina. A mistura obtida foi transferida para uma coluna tendo funcionado como fase estacionária. Como alternativa à coluna de vidro convencional, os autores propuseram a utilização de uma seringa descartável. Como solventes utilizaram a benzina e a acetona. Nesta atividade os autores utilizaram o extrato sem terem separado a fase aquosa da fase orgânica. Os mesmos autores utilizaram um pau de giz inteiro para realizar a separação dos pigmentos do espinafre. Para isso prepararam um extrato como descrito anteriormente, transferiram a solução verde para um goblé e mergulharam várias vezes o pau de giz no extrato preparado. De seguida deitaram benzina num goblé em quantidade suficiente para cobrir o fundo e colocaram o pau de giz com a porção que tinha sido mergulhada no extrato para baixo. O solvente subiu por capilaridade ao longo do giz tendo-se verificado a separação dos pigmentos.

Kimbrough, D. (1992) reportou a separação dos pigmentos das plantas utilizando uma coluna de cromatografia em que a fase estacionária escolhida foi o bicarbonato de sódio. Como suporte da coluna sugeriu a utilização de uma coluna de cromatografia ou uma seringa de plástico ou ainda uma pipeta Pasteur. Os solventes utilizados foram o éter de petróleo, acetona, uma mistura de álcool isopropílico/água, 70:30 (v/v) e uma solução saturada de bicarbonato de sódio em água. Os pigmentos seriam obtidos a partir das folhas de árvores, de jardim ou de plantas de interior. O extrato foi preparado por maceração das folhas das plantas com acetona e a solução resultante foi aplicada diretamente na coluna. Para realizar a eluição o primeiro solvente a ser utilizado foi o éter de petróleo, seguido da acetona e do álcool isopropílico / água 70:30 (v/v). Observaram que o éter de petróleo deslocou na coluna uma banda de cor verde brilhante, que atribuíram à presença de clorofilas *a* e *b* e aos pigmentos carotenoides. Quando os pigmentos verdes saíram, utilizaram a acetona que deslocou uma banda de cor amarela ou verde claro. A mistura de álcool isopropílico / água deslocou duas ou três bandas compostas por pigmentos de cor amarela e castanha. Para separar a última banda de cor castanha foi utilizada uma solução saturada de bicarbonato de sódio.

Gail Horowitz (2000) reportou a extração e separação dos carotenos, clorofilas e xantofilas do espinafre. As folhas de espinafre foram trituradas num almofariz com etanol a 95%, de seguida o etanol foi removido através da filtração por vácuo e ao espinafre desidratado foi acrescentado hexano. A solução de hexano foi agitada durante

alguns minutos e concentrada até obter um volume de 1mL. De seguida o extrato foi aplicado numa coluna de cromatografia com gel de sílica. Foram obtidas três bandas coloridas, carotenos (amarelo), clorofilas (verde) e xantofilas (amarelo). Os solventes utilizados foram os seguintes: hexano / acetato de etilo 90: 10, hexano / acetato de etilo 70: 30 e 100% de acetato de etilo. As bandas coloridas que foram recolhidas foram analisadas por espectrofotometria UV-Visível.

3.4.2 Resultados de investigação da cromatografia de extratos de folhas de plantas

No presente trabalho de investigação foram testados vários materiais do quotidiano como agentes adsorventes (fase estacionária) em diferentes condições experimentais, tendo por base alguns dos métodos existentes na literatura. O ponto de partida do estudo realizado foi a experiência de Kimbrough, uma vez que usava um processo de preparação do extrato muito simples, solventes pouco tóxicos e acessíveis e distinguia-se dos outros trabalhos descritos na literatura por contemplar a separação dos pigmentos do tipo flavonoide.

Assim, iniciou-se o estudo utilizando o bicarbonato de sódio como fase estacionária e como suporte desta fase uma seringa descartável de 5mL. O extrato foi obtido por maceração de folhas de alface roxa em acetona e o líquido sobrenadante foi diretamente aplicado na coluna, obteve-se assim um extrato bruto que passará a ser designado por extrato bruto líquido. Como solventes de eluição recorreu-se ao éter de petróleo, à acetona, ao etanol a 96% e à solução saturada de bicarbonato de sódio. Esta última solução separou uma banda cujo extrato ficou avermelhado quando foi adicionado de umas gotas de ácido sulfúrico. Os resultados obtidos demonstraram que estas condições permitiram o isolamento da fração dos flavonoides mas, as clorofilas eram prontamente arrastadas em conjunto com os carotenoides e as frações recolhidas apresentavam uma coloração verde amarelado, destacando-se um amplo predomínio da cor amarela. Suspeitou-se da degradação da clorofila no bicarbonato de sódio devido às características alcalinas deste adsorvente.

Esta suspeita conduziu à investigação de adsorventes mais inertes. Assim, manteve-se as condições anteriores, mas modificou-se a fase estacionária tendo-se testado areia e açúcar granulado como adsorventes.

O escoamento dos solventes ao longo destas colunas foi demasiado rápido o que não permitiu uma separação dos pigmentos, tendo sido mesmo inferior à obtida com o bicarbonato de sódio.

Na tentativa de conseguir obter uma separação dos pigmentos verdes e amarelos, realizou-se novamente a cromatografia em coluna de bicarbonato de sódio recorrendo a uma coluna de cromatografia mais alta (cerca de 20cm de altura e 2cm de diâmetro) como suporte da fase estacionária. O extrato utilizado foi obtido como descrito no ponto anterior, partindo de folhas de espinafres congelados. O enchimento da coluna foi efetuado a húmido, preparou-se uma suspensão de bicarbonato de sódio em éter de petróleo que posteriormente foi colocada na coluna para funcionar como fase estacionária e os solventes utilizados foram os mesmos. Os resultados foram comparáveis aos do primeiro ensaio.

Continuando a investigar-se adsorventes alternativos do quotidiano recorreu-se à farinha de milho como adsorvente. O extrato foi preparado como descrito nas atividades anteriores, mas com folhas de uma planta verde e vermelha; o suporte da coluna foi uma seringa de plástico de 20ml. A coluna foi empacotada com farinha de milho de cor amarela. Antes da aplicação do extrato na coluna passou-se éter de petróleo e saiu uma fração de cor amarela que correspondia aos pigmentos da farinha. Só quando toda a fração amarela saiu é que se aplicou o extrato na coluna. O éter de petróleo deslocou uma banda verde intenso seguido de uma verde amarelada. Este processo revelou-se demorado e uma análise por cromatografia em papel do primeiro extrato demonstrou que este era composto por uma mistura de carotenos e clorofilas *a* e *b*.

No procedimento com farinha de milho branca, verificou-se que quando se passou o éter de petróleo também saiu uma fração amarela e, após aplicação do mesmo extrato, o éter de petróleo passou a deslocar-se com uma lentidão incompatível com o tempo de execução da experiência.

Com a farinha de trigo e o pó de talco, os solventes apresentaram ainda mais dificuldade em deslocar-se ao longo da coluna o que inviabilizou o procedimento.

Recorreu-se então, a uma fração mais purificada da farinha de milho, o amido de milho comercial e o extrato foi preparado por maceração das folhas de uma planta verde e vermelha e diretamente aplicado na coluna. O éter de petróleo deslocou uma

banda verde intenso, composta por carotenos e clorofila *a* e *b* (evidência de cromatografia em papel), seguida de uma banda verde amarelada e, no topo da coluna observava-se uma banda avermelhada. Na tabela 3.1 estão resumidos os resultados destas atividades.

Tabela 3.1 - Resumo dos resultados das primeiras atividades com extrato bruto líquido

Tecido vegetal	Suporte da coluna	Fase estacionária	Solventes de eluição	Frações extraídas		
Folhas de alface verde e roxa	Seringa de 5mL	Bicarbonato de sódio	Éter de petróleo	Verde amarelado		
			Acetona	Verde claro		
			Etanol a 96%	Incolor		
			Solução saturada de bicarbonato de sódio	Castanho		
		Areia	Éter de petróleo	Verde intenso		
			Acetona	Verde claro		
			Etanol a 96%	Incolor		
		Açúcar granulado	Éter de petróleo	Verde intenso		
			Acetona	Verde claro		
			Etanol a 96%	Incolor		
		Fotos das frações do açúcar granulado				
		Folhas de espinafres congelados	Coluna de cromatografia (20cm altura e 2cm de diâmetro)	Suspensão de bicarbonato de sódio em éter de petróleo	Éter de petróleo	Verde amarelado
					Acetona	Verde claro
					Etanol a 96%	Incolor
		Folhas de planta verde e vermelha	Seringa de 20mL	Farinha de milho amarela	Éter de petróleo	Verde intenso
	Verde					
Acetona	Incolor					
	Etanol/água			Verde claro (vermelho por adição de ácido)		
Farinha de milho branca	Éter de petróleo			Verde intenso		
				Verde		
	Acetona			Incolor		
Amido de milho comercial	Éter de petróleo			Verde intenso		
				Verde amarelado		

Estes resultados demonstraram que a aplicação de um extrato em acetona de uma folha verde e vermelha, sendo desejável pelo seu grau de simplicidades técnica, era incompatível com a separação dos pigmentos verdes e amarelos devido à presença de água e acetona na fase inicial do processo. Verificou-se, no entanto, que era possível a separação das antocianinas na coluna de farinha de milho por eluição com etanol. Para verificar a interferência dos solventes presentes no extrato bruto foi preparado um extrato com folhas verdes (ervas daninhas) por maceração em acetona seguida de uma extração com éter de petróleo e água com sal e a fase orgânica resultante foi tratada com sulfato de sódio anidro. Este extrato em éter de petróleo foi aplicado numa coluna de amido de milho e observou-se separação de bandas amarelas e verdes. Contudo, dado que um dos objetivos deste estudo era conseguir a separação, por cromatografia em coluna, dos pigmentos carotenoides, das clorofilas *a* e *b* e das antocianinas presentes em folhas verdes e vermelhas, o recurso à usual purificação por extração do extrato bruto destes tecidos vegetais num par de solventes imiscíveis eliminava os flavonoides na fase aquosa e retirava o impacto visual pretendido: a separação de bandas amarelas, verdes e castanhas.

Embora com limitações e de técnica mais complexa a primeira abordagem alternativa foi recorrer a uma extração para isolar a fração dos flavonoides e corar de vermelho a fase aquosa resultante, por adição de ácido. Seguidamente, uma cromatografia em coluna com amido de milho como adsorvente deveria possibilitar a separação dos amarelos e verde presentes na fase orgânica.

Assim, o extrato de uma planta verde e vermelha, após maceração em acetona foi submetido a uma extração no par de solventes água / éter de petróleo. Deixou-se repousar e separou-se a fase orgânica (superior) da fase aquosa (inferior). À fase aquosa juntou-se umas gotas de vinagre e a mudança de cor para vermelho confirmou a presença das antocianinas, pois o catião flavílio existente nestes pigmentos em meio ácido adquire a tonalidade vermelha, reservando-se este extrato vermelho.

Fig10 -Extração dos pigmentos presentes em folhas de plantas

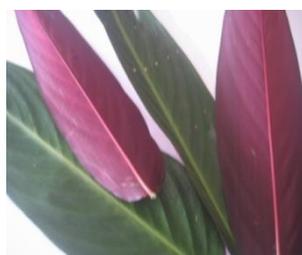


Fase aquosa

Fase orgânica

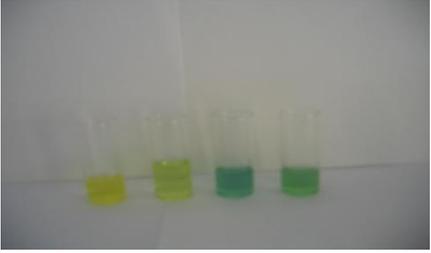


Fig11 - Folhas da planta verde e verde (amostra)



À fase orgânica juntou-se sal de cozinha (ou em alternativa sulfato de sódio anidro), para retirar a água que ainda tivesse persistido e obteve-se o extrato orgânico, que passará a ser designado como extrato orgânico líquido anidro. Empacotou-se uma seringa de 20mL, que serviu de suporte, com farinha de amido de milho comercial, passou-se uma vez éter de petróleo na coluna e de seguida aplicou-se o extrato que se encontrava na fase orgânica. Esta atividade é apresentada de forma resumida na tabela.

Tabela 3.2 - Resumo dos resultados das atividades com extrato orgânico líquido anidro

Tecido vegetal	Suporte da coluna	Fase estacionária	Solventes de eluição	Frações extraídas
Folhas de planta verde e vermelha	Seringa de 20mL	Amido de milho comercial	Éter de petróleo	Amarelo
			Acetona / éter de petróleo 10:90	Amarelo
			Acetona / éter de petróleo 25:75	Verde intenso
		Verde amarelado		
Fotos				

Estes resultados revelaram que, nestas condições, a separação dos pigmentos amarelos e verdes foi fácil e eficiente e indicaram a solução para os problemas encontrados: encontrar um meio alternativo de eliminar a água e a acetona sem separar a fase aquosa, de modo a manter os flavonoides no extrato a ser aplicado na coluna.

Optou-se então por aplicar o mesmo extrato bruto na coluna depois de este estar livre de solvente procurando manter a premissa de evitar não só técnicas complexas e demoradas, mas também equipamentos laboratoriais menos acessíveis.

Assim, utilizou-se um vidro de relógio onde se colocou duas espátulas amido de milho comercial e se misturou o extrato bruto, depois de este ter sido filtrado e de lhe ter sido retirada a água residual com sal de cozinha. Deixou-se a mistura ao ar e à temperatura ambiente e após 5-10 minutos obteve-se um sólido de aspeto seco e que não cheirava a acetona. A mistura sólida assim preparada passou a designar-se como o extrato bruto sólido anidro e foi aplicada diretamente na coluna com auxílio de uma espátula. Os solventes utilizados foram os mesmos da atividade anterior. Verificou-se que procedimento foi mais rápido e, finalmente, a coluna apresentou bandas amarelas e verdes e uma banda rosada no topo da coluna. No entanto neste ensaio não foi possível eluir com etanol esta última banda. Esta atividade é apresentada de forma resumida na tabela.

Tabela 3.3 - Resumo dos resultados das atividades com extrato bruto sólido anidro em coluna de amido de milho comercial

Tecido vegetal	Suporte da coluna	Fase estacionária	Solventes de eluição	Frações extraídas
Folhas de planta verde e vermelha	Seringa de 20mL	Amido de milho comercial	Éter de petróleo	Amarelo
			Acetona / éter de petróleo 10:90	Verde amarelado
			Acetona / éter de Petróleo 25:75	Verde
			Etanol 99%	Incolor
			Fotos	

Figura 12- Preparação do extrato bruto sólido anidro

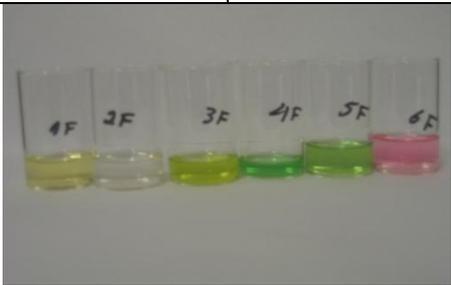


Após pesquisa bibliográfica verificou-se que os adsorventes utilizados até ao momento já tinham feito parte de outras investigações, procuramos então, um material que permitisse obter uma separação eficiente dos pigmentos por cromatografia em coluna e que ainda não tivesse sido testado, assim o adsorvente que reuniu essas características foi a fécula de batata.

O procedimento experimental foi similar ao utilizado com o amido de milho comercial, no entanto conseguiu-se a separação dos pigmentos carotenoides, clorofilas e flavonoides num período de tempo inferior, podendo esta atividade ser levada a cabo

numa aula de 90 minutos. No final da atividade e, para comprovar que a fração extraída com etanol continha pigmentos flavonoides, adicionou-se duas gotas de HCl 1:1 e observou-se a mudança de cor de castanho claro para vermelho. Esta atividade é apresentada de forma resumida na tabela.

Tabela 3.4 - Resumo dos resultados das atividades com extrato bruto sólido anidro em coluna de fécula de batata

Tecido vegetal	Suporte da coluna	Fase estacionária	Solventes de eluição	Frações extraídas
Folhas de planta verde e vermelha	Seringa de 20mL	Fécula de batata	Éter de petróleo	Amarelo
				Incolor
			Acetona / éter de petróleo 10:90	Amarela intenso
				Verde azulado
		Acetona / éter de petróleo 25:75	Verde amarelado	
		Etanol a 99%	Castanho	
		Fotos após a adição de ácido à última fração		

Uma vez que a aplicação do extrato bruto sólido anidro ofereceu os resultados pretendidos, tentou reproduzir-se este novo método com colunas de bicarbonato de sódio, de açúcar em pó (em vez de açúcar granulado), de areia e de amido de milho comercial. O extrato bruto sólido anidro foi preparado como descrito nos procedimentos anteriores, mas com fécula de batata. Os resultados obtidos com estas atividades são apresentados na tabela.

Tabela 3.5- Resumo dos resultados das atividades com aplicação de extrato bruto sólido anidro preparado com fécula, em colunas de bicarbonato de sódio, açúcar em pó, areia e amido de milho comercial

Tecido vegetal	Suporte da coluna	Fase estacionária	Solventes de eluição	Frações extraídas	
Folhas de planta verde e vermelha	Seringa de 20 mL	Bicarbonato de sódio	Éter de petróleo	Amarelo	
			Acetona/éter de petróleo 10:90	Verde amarelado	
				Incolor	
			Etanol a 99%	Verde claro	
			Solução saturada de bicarbonato de sódio	Castanho	
		Fotos			
		Amido de milho comercial / Açúcar em pó	Éter de petróleo	Amarelo	
			Acetona / éter de petróleo 10:90	Verde amarelado	
			Acetona/éter de petróleo 25:75	Verde	

		Fotos Açúcar em pó		
		Fotos amido de milho comercial		
	Areia	Éter de petróleo	Amarelo	
		Acetona/éter de petróleo 10:90	Verde intenso	
		Acetona/éter de petróleo 25:75	Verde amarelado	
		Fotos areia		

Estes resultados demonstraram uma excelente otimização do método da coluna de bicarbonato de Kimbrough, ponto de partida deste trabalho.

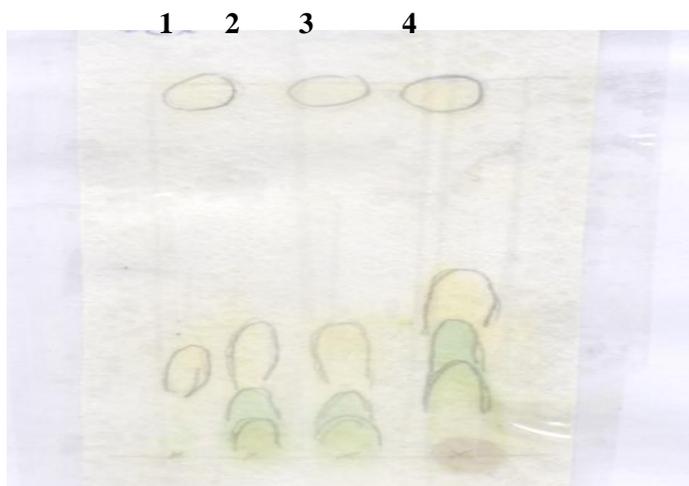
Na tentativa de averiguar a influência da presença de água e acetona nos diferentes resultados anteriormente obtidos com colunas de bicarbonato de sódio realizou-se um estudo em paralelo com quatro colunas de bicarbonato e os diferentes tipos de extratos utilizados. Estes resultados são apresentados na tabela seguinte:

Tabela3.6 - Resumo dos resultados das atividades com aplicação de extratos diferentes em coluna de bicarbonato

Solventes de eluição	Frações extraídas			
	Extrato bruto líquido	Extrato bruto líquido anidro	Extrato bruto sólido anidro (em NaHCO ₃)	Extrato orgânico sólido anidro (em NaHCO ₃)
Éter de petróleo	Verde azulado	Verde azulado	Amarelo	Amarelo
				Incolor
Acetona / éter de petróleo 10:90	Incolor	Incolor	Incolor	Verde amarelado
Acetona / éter de petróleo 25:75	Verde amarelado	Verde amarelado	Verde amarelado	Não se aplicou
	incolor	incolor	incolor	
Etanol a 99%	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Não se aplicou
NaHCO ₃ aquoso (Solução saturada)	Castanho	Castanho	Castanho	Não se aplicou
Fotos				
Após adição de ácido				

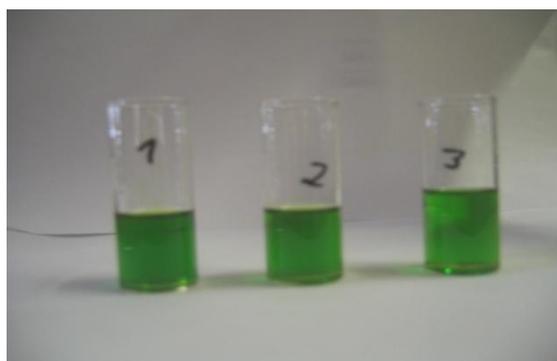
Foi analisada a composição dos primeiros extratos verdes por cromatografia em papel. O cromatograma obtido é apresentado na figura seguinte.

Fig13- Cromatografia em papel de Frações extraídas de colunas bicarbonato de sódio



- 1- Primeira fração da coluna de bicarbonato de sódio com extrato orgânico sólido anidro- tem carotenos e xantofilas.
- 2- Terceira fração da coluna de bicarbonato de sódio com extrato orgânico sólido anidro- tem xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b*.
- 3- Segunda fração da coluna de bicarbonato de sódio com extrato bruto sólido anidro preparado com fécula – tem carotenos, xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b*.
- 4- Extrato bruto- carotenos, xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b* e antocianinas

Fig 14- Comparação das cores das primeiras frações verdes obtidas por cromatografia em colunas de bicarbonato de sódio



- 1- Extrato bruto (1ª fração);
- 2- Extrato bruto líquido anidro (1ª fração);
- 3- Extrato bruto sólido anidro (2ª fração).

Adicionalmente foi investigada a estabilidade da clorofila em solução água/acetona na presença de bicarbonato de sódio. Para o efeito, realizou-se testes de estabilidade do extrato bruto líquido, em meio alcalino e meio ácido.

Fig15- Ensaio de estabilidade da clorofila em solução: meio básico e meio ácido



- 1- Extrato bruto líquido (EB)
- 2- EB + bicarbonato de sódio 10%
- 3- EB + solução saturada de bicarbonato de sódio
- 4- EB + hidróxido de sódio
- 5- EB + ácido clorídrico

Finalmente fez-se uma análise comparativa das colunas de amido de milho comercial, açúcar em pó, bicarbonato de sódio e fécula de batata em que se procedeu à eluição, em simultâneo, de um mesmo extrato bruto sólido anidro preparado com fécula de batata.

Fig16- Cromatografia em papel das frações obtidas da coluna de amido de milho comercial – extrato sólido anidro - preparado com fécula de batata



Extrato bruto carotenos, xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b* e antocianinas

1ª fração carotenos

2ª fração xantofilas (amarelo muito claro), clorofila *a*

3ª fração clorofila *a* e clorofila *b*

Fig17- Cromatografia em papel das frações obtidas da coluna em fécula de batata – extrato sólido anidro

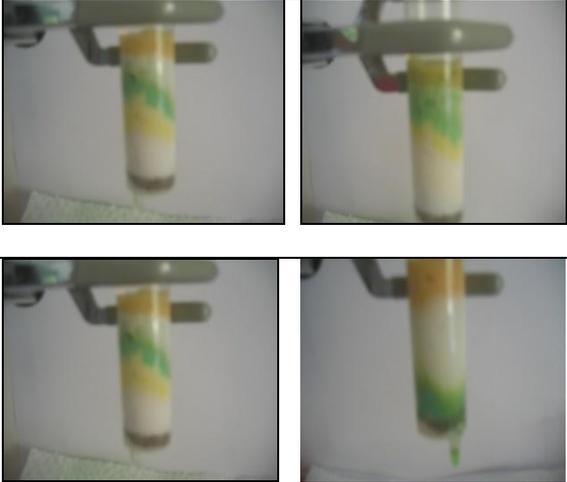
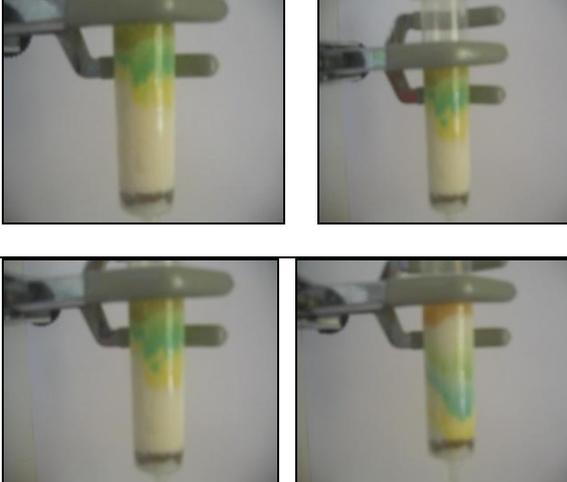
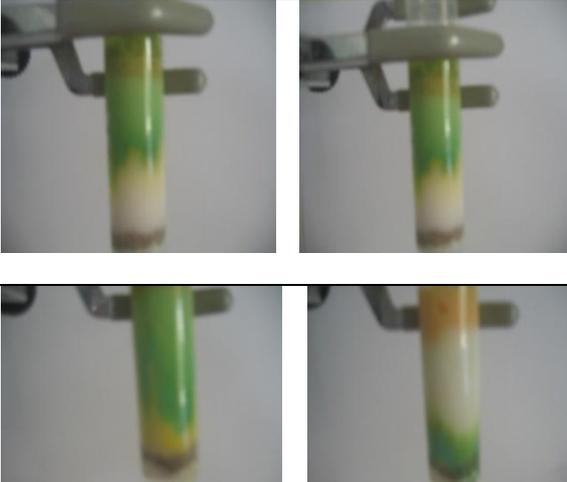


- 1- 1ª fração- carotenos
- 2- 3ª fração- xantofilas e clorofila a
- 3- 4ª fração – clorofila a
- 4- 5ª fração – clorofila b
- EB**- extrato bruto líquido

1 2 3 4 EB

Fig18- Fotos da cromatografia em coluna

Adsorventes da cromatografia em coluna	Fotos	
Cromatografia em coluna de bicarbonato de sódio- aplicação do extrato bruto sólido anidro(preparado com fécula)		

<p>Cromatografia em coluna de açúcar em pó – aplicação do extrato bruto sólido anidro</p>	
<p>Cromatografia em coluna de amido de milho comercial – extrato bruto sólido anidro preparado com fécula de batata</p>	
<p>Cromatografia em coluna de fécula de batata – extrato bruto sólido anidro</p>	

3.4.3 *Discussão dos resultados da cromatografia de extratos de plantas*

Nas folhas de plantas verdes aparecem simultaneamente os carotenoides e as clorofilas, presentes nos cloroplastos. Os carotenoides, compostos por carotenos e xantofilas, são menos abundantes do que as clorofilas e aparecem nas plantas numa proporção de 1 para 6. O conteúdo de xantofilas presentes nas folhas é normalmente o dobro dos carotenos (Kamerling, 1946).

Os pigmentos caroténicos apresentam cor amarela (xantofilas) ou vermelho alaranjado (carotenos) são solúveis em solventes apolares como o éter de petróleo e a acetona (Costa, A. 1982, p. 911). Dos carotenoides fazem parte os hidrocarbonetos, os carotenos, que são muito solúveis no éter de petróleo e hexano e são insolúveis no etanol e metanol e as xantofilas, que têm uma maior solubilidade nos álcoois e menos no éter de petróleo. Estas propriedades são úteis nos processos de isolamento destes compostos. Os carotenos encontram-se espalhados por toda a planta, as xantofilas existem em maior quantidade nas flores e frutos, mas podem fazer parte de outras zonas (Costa, A. 1982, p. 912).

A clorofila *b* devido à presença do grupo aldeído é mais polar que a clorofila *a*. A clorofila *b* apresenta cor verde amarelado e a clorofila *a* cor verde azulado (Costa, A. 1982, p. 923). Nas folhas verdes e / ou vermelhas para além dos carotenoides e das clorofilas, aparecem também os pigmentos flavónoides, dos quais fazem parte as antocianinas que são responsáveis pela coloração vermelha dessas folhas. As antocianinas estão presentes em muitas pétalas e frutos e são moléculas solúveis em água (Kamerling, 1946). Os extratos das antocianinas apresentam cores que variam em função do pH do meio. Tem cor vermelha em meio ácido, violeta em meio neutro e azul em condições alcalinas (Terci & Rossi, 2002).

Numa cromatografia em coluna, os solventes agrupam-se consoante a ordem crescente das suas polaridades. Deve passar-se pela coluna, primeiro um solvente de baixa polaridade, e só então os outros eluentes com polaridades sucessivamente mais elevadas, de modo a produzir-se um fracionamento seletivo (Costa, A. 1982, p. 125).

No presente estudo a sequência de solventes utilizada foi, de acordo com a sua polaridade, o éter de petróleo, a acetona e o etanol. Assim, o éter de petróleo tem polaridade inferior à acetona e esta por sua vez inferior ao etanol. Foram ainda

utilizadas as misturas de polaridade intermédia: acetona / éter de petróleo 10:90 (v/v) e acetona / éter de petróleo 25:75 (v/v).

Os adsorventes usados foram: bicarbonato de sódio, areia, sacarose (açúcar refinado em pó e granulado), amido (farinha de milho, amido de milho e fécula de batata). Começou-se por testar o bicarbonato de sódio como adsorvente e os primeiros resultados demonstraram que as cores apresentadas pelas primeiras frações extraídas eram muito claras e não foi possível separar os pigmentos amarelos e verdes, uma vez que o solvente do extrato era acetona e continha certamente água residual proveniente dos tecidos vegetais. Como o bicarbonato de sódio na presença de água torna o meio alcalino, suspeitou-se da degradação das clorofilas e provavelmente dos carotenoides.

Uma vez que os resultados obtidos não foram os pretendidos optou-se por testar a areia como adsorvente. Trata-se de um mineral granuloso geralmente formado pelo desgaste de rochas arenosas. A areia é formada a partir de uma mistura de diversas substâncias sendo a sua composição muito variável mas, como o seu principal componente é a sílica (SiO_2)_n, tem características polares.

Partindo do mesmo extrato, este adsorvente permitiu recolher frações bastante mais verdes do que as frações recolhidas com o bicarbonato de sódio, evidenciando a necessidade comprovar se existia realmente degradação das clorofilas em meio básico ou se as cores obtidas eram devido a outros fatores. No entanto devido ao tamanho das partículas da areia o escoamento dos solventes ao longo da coluna foi muito rápido e não foi possível a separação dos pigmentos.

Recorreu-se então ao açúcar granulado como fase estacionária. A sacarose cuja fórmula molecular é $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$ é vulgarmente designada como açúcar. É um dissacárideo formado por uma molécula de glucose e uma de frutose. Assim, a sacarose é hidrolisada por ação de ácidos diluídos originando a D-glucose e a D-frutose. A presença de vários grupos hidroxilo nestas unidades faz da sacarose uma molécula polar e assim, os pigmentos polares como as antocianinas ficam mais tempo retidos e os apolares como os carotenoides são os primeiros a ser separados.

O açúcar granulado não permitiu que os solventes permanecessem em contacto com o extrato o tempo suficiente devido ao tamanho das suas partículas e à existência de muitos espaços intersticiais entre estas, tendo-se verificado um escoamento rápido

dos eluentes, tal como já tinha acontecido com a areia. Este facto contribuiu para que não se tivesse conseguido separar os pigmentos, pois as propriedades dos adsorventes aumentam proporcionalmente ao da sua pulverização, sendo no entanto este facto limitado pelo poder de penetração da fase sólida pelos líquidos (Costa, A. 1982,p. 124).

Seguidamente optou-se por utilizar um polímero da glucose, o amido. Começou-se por testar farinha de milho amarela e farinha de milho branca como adsorventes, mas os resultados obtidos ficaram aquém dos esperados porque demonstraram uma grande resistência ao escoamento do solvente. Isto aconteceu, em parte, motivado pelo facto de a farinha de milho também conter alguma percentagem de farinha de trigo, sendo esta última constituída principalmente por amido e proteínas. Quando a farinha de trigo é misturada com água, as proteínas do trigo hidratam-se para formar o glúten. O glúten dificultou a separação dos pigmentos ao longo da coluna, pois o extrato continha água impedindo o deslocamento do eluente.

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo de D-glucose, é a forma de reserva glucídica nos vegetais. O grão de amido é uma mistura de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. A amilose é uma molécula formada por cadeias lineares constituída por moléculas de α -glucose ligadas através de ligações glucosídicas α -1,4 numa cadeia contínua. A amilopectina é um polissacarídeo formada por cadeias principais idênticas às da amilose (ligações α -1,4 glucosídicas), às quais se ligam através de ligações α -1,6 glucosídicas, cadeias laterais com a mesma estrutura das cadeias principais (Weil, J. 1983, p. 185-186).

As propriedades de gelatinização do amido na presença da água estão relacionadas com vários fatores, incluindo a proporção de amilose e amilopectina. (Rocha & Demiate, 2008).

Com o intuito de encontrar um adsorvente do quotidiano que permitisse obter uma separação eficaz dos pigmentos recorreu-se ao amido de milho comercial, um amido de maior pureza e mais pobre em glúten. A eficácia deste adsorvente foi testada pela aplicação de um extrato em éter de petróleo seco de folhas verdes, pois verificou-se separação de bandas amarelas e verdes, evidenciando a necessidade de remover a acetona e a água no extrato bruto. Assim, no extrato bruto das folhas verdes e vermelhas optou-se pela separação dos pigmentos flavonoides por extração e tratou-se a fase orgânica que continha os carotenoides e clorofilas com um agente exsiccante antes da

aplicação do extrato na coluna. O éter de petróleo separou uma banda amarela muito lentamente, de seguida utilizou-se a mistura acetona / éter de petróleo 10:90 que conseguiu arrastar uma banda verde, trocou-se o eluente para a mistura acetona / éter de petróleo 25:75, com polaridade superior, e separou-se uma faixa de cor verde intenso, seguida de uma verde.

Como o extrato ainda continha acetona o que dificultou a separação dos pigmentos, tornou-se assim imperioso encontrar uma maneira alternativa de aplicar o extrato na coluna. Para se conseguir atingir este objetivo optou-se por fazer adsorver o extrato à superfície de um sólido finamente dividido, para assim, acelerar o processo de evaporação por exposição ao ar e só então coloca-lo na coluna. Com este procedimento a cromatografia em coluna com amido de milho comercial apresentou bandas amarelas, verdes e uma banda rosada no topo da coluna.

A substituição do amido de milho comercial por fécula de bata ofereceu ainda melhores resultados, a eluição foi mais fácil e a resolução foi excelente pois foi possível obter-se o efeito visual pretendido na coluna: uma banda corada de amarelo intenso na base da coluna seguida de uma banda nítida verde azulado, outra banda perfeitamente separada de verde amarelado e uma banda rosada no topo da coluna. Foi possível isolar frações correspondentes e os resultados da cromatografia em papel demonstraram a separação de uma primeira fração composta por carotenos, a segunda fração era composta por xantofilas e clorofila *a* e a terceira fração era maioritariamente composta por clorofila *b*.

Foram realizadas novamente as atividades com os adsorventes : bicarbonato de sódio e açúcar em pó (em vez do granulado), de acordo com as novas condições encontradas, com vista a otimizar o método e reproduzi-lo numa sala de aula normal. Com a aplicação do extrato bruto sólido anidro (preparado com fécula de batata), na coluna de bicarbonato de sódio, foi possível separar pela primeira vez, com éter de petróleo os pigmentos amarelos, constituídos pelas xantofilas e carotenos, facto comprovado com cromatografia em papel, tendo-se ainda verificado que, os verdes não tinham uma cor ténue como tinha acontecido anteriormente. A mistura acetona / éter de petróleo 25:75 separou uma banda verde formada por xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b* (evidência de cromatografia em papel). Os pigmentos carotenos como são os mais apolares, são os que mais se afastam do ponto de aplicação, seguidos pelas xantofilas,

clorofila *a* e clorofila *b*, as antocianinas como são moléculas muito polares e solúveis em água, não saem do ponto de aplicação.

Para confirmar estes resultados e comprovar a sua reprodutibilidade realizou-se um estudo em paralelo com quatro colunas de bicarbonato de sódio (seringa de 20mL), a amostra foi obtida a partir de folhas de planta verde e vermelha. A cada coluna foi aplicado um extrato preparado de forma diferente. Assim aplicou-se sucessivamente o extrato bruto líquido, o extrato bruto líquido anidro, o extrato bruto sólido anidro (preparado com bicarbonato de sódio) e por último o extrato orgânico no estado sólido. As primeiras frações verdes obtidas foram comparáveis e apresentaram uma cor intensa. Para analisar a composição das frações recolhidas efetuou-se uma cromatografia em papel no eluente acetona / éter de petróleo 10:90. A análise da primeira fração verde da coluna de bicarbonato de sódio, onde foi também aplicado um extrato bruto sólido anidro, preparado com bicarbonato de sódio, era formada por: carotenos, xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b*.

A análise das frações recolhidas da coluna de bicarbonato de sódio, onde foi aplicado o extrato orgânico sólido anidro, preparado com bicarbonato de sódio, permitiram verificar que o éter de petróleo separou uma banda amarela, constituída por carotenos e xantofilas. A mistura acetona / éter de petróleo 10:90 separou uma banda verde amarelada com xantofilas, clorofila *a* e clorofila *b*. Uma repetição da coluna de bicarbonato de sódio, onde foi também aplicado um extrato bruto sólido anidro, mas preparado com fécula de batata apresentou separação de bandas e frações comparáveis aos resultados obtidos com o ensaio em que foi aplicado um extrato orgânico anidro. Uma vez que os amidos possuem a capacidade de absorver água, uma possível explicação para este resultado será a retenção de água residual presente no extrato pela fécula. Este resultado sugere que a presença de água, devida possivelmente a uma deficiente eficácia do agente exsicante na preparação do extrato, deverá também interferir na separação dos pigmentos ao longo da coluna.

Assim, os resultados mostram que o bicarbonato de sódio permite a realização de atividades com impacto visual, pois, na coluna separam-se bandas de cor amarela, verde e castanha num curto espaço de tempo. No entanto, se o objetivo da atividade for a separação da clorofila *a* e *b* então é necessário recorrer a outro adsorvente.

Para comprovar a estabilidade da clorofila em meio ácido e básico, colocou-se em cinco frascos de recolha, solução de extrato bruto líquido. O primeiro frasco funcionou como branco, só com o extrato; ao segundo, adicionou-se solução de bicarbonato de sódio a 10% (pH 12,2); ao terceiro, adicionou-se solução saturada de bicarbonato de sódio (pH =12,5); ao quarto, solução de hidróxido de sódio 0,002M (pH= 11,3) e ao último, solução de HCl 1M (pH =1). Os frascos com soluções básicas e o ensaio em branco apresentaram cores comparáveis, já o frasco com solução ácida apresentou cor castanha. Este facto confirma que a clorofila é muito sensível aos ácidos, neste meio perde o catião magnésio e forma compostos com cor castanha (Kamerling, 1946). O ião metálico é substituído por dois átomos de hidrogénio através da reação de hidrólise ácida dando origem à feofitina (Soares, 2006). Em relação às soluções básicas a cor não apresentou alteração apreciável nos ensaios em solução e, quer a observação visual das cores das frações recolhidas, quer a análise por cromatografia em papel não são conclusivas. Seria necessário recorrer a métodos de análise mais rigorosos para averiguar a degradação.

Relativamente à influência dos diferentes extratos na separação dos pigmentos, a aplicação do extrato bruto líquido e do extrato bruto líquido anidro, impossibilitou a separação dos pigmentos carotenoides, devido à presença de acetona e possíveis vestígios de água. Assim, não estavam reunidas as condições para uma boa separação dos pigmentos da amostra, uma vez que a presença de acetona e, possivelmente, água no extrato reverteu a polaridade crescente dos eluentes.

Com a aplicação do extrato bruto sólido anidro e orgânico sólido anidro, para além de se eliminar a acetona também se retirou a água e assim, iniciou-se a eluição com um solvente de baixa polaridade, o éter de petróleo, que arrastou preferencialmente os componentes mais apolares separando os amarelos. Deste modo conseguiu-se o objetivo primário pretendido, que era separar os pigmentos verdes e amarelos, sem recorrer a procedimentos experimentais complexos e a equipamentos sofisticados.

Para avaliar a capacidade separativa das diferentes colunas testadas, analisou-se a composição de frações recolhidas por cromatografia em papel usando a mistura acetona / éter de petróleo 10:90, como eluente.

A análise das frações recolhidas da coluna de amido de milho comercial, com a aplicação do extrato bruto sólido anidro, preparado com fécula de batata permitiu

verificar que a primeira fração separada com o éter de petróleo era constituída por carotenos, a mistura acetona / éter de petróleo 10:90 separou uma banda verde amarelada com xantofilas e clorofila *a*, a mistura acetona / éter de petróleo 25:75 separou uma banda verde com clorofila *a* e clorofila *b*.

A análise das frações recolhidas da coluna de fécula permitiu verificar que o éter de petróleo separou uma primeira banda amarela formada pelos carotenos, a mistura acetona / éter de petróleo 10:90 separou uma banda amarelo intenso de xantofilas, ligeiramente contaminada com clorofila *a*. A fração seguinte (verde azulada) revelou conter clorofila *a*. A eluição com a mistura acetona / éter de petróleo 25:75 arrastou uma banda verde amarelado composta por clorofila *b*. Assim, pode concluir-se que estas condições permitem uma excelente capacidade separativa.

Em todas as atividades realizadas constatou-se que a aplicação do extrato bruto sólido anidro, aumentou a eficácia da separação dos pigmentos por cromatografia em coluna. Este procedimento simples não foi encontrado na pesquisa bibliográfica realizada.

Em relação aos adsorventes utilizados, verificou-se que o bicarbonato de sódio apresentou menor capacidade de adsorção pois, não foi possível separar a clorofila *a* da clorofila *b*.

Comparando os adsorventes testados em termos de capacidade separativa, neste estudo constatou-se que a fécula de batata ofereceu os melhores resultados, tendo sido possível a separação dos pigmentos carotenoides, clorofila *a* e *b* e flavonoides, por cromatografia em coluna, num período de tempo que permite a realização da atividade numa sala de aula. Com este adsorvente conseguiu-se uma boa resolução da coluna. Para além de reunir as condições mencionadas foi pela primeira vez testada neste estudo.

Em termos de rapidez, o bicarbonato de sódio foi o adsorvente que permitiu a separação mais rápida, em particular dos pigmentos flavonoides. Quanto ao açúcar em pó e amido de milho comercial apresentaram a desvantagem de serem mais demorados e não ter sido possível eluir os pigmentos flavonoides, por cromatografia em coluna. Em relação à areia, esta não ofereceu os resultados pretendidos devido à granulometria das

suas partículas, o que provocou um escoamento muito rápido dos solventes ao longo da coluna.

Nas primeiras atividades realizadas com coluna de bicarbonato de sódio, os verdes eram exíguos, talvez devido à elevada quantidade de água que estava presente nas folhas de alface verde e vermelha, muito superior à que se encontrava nas folhas da planta verde e vermelha.

Verificou-se ainda que com o amido de milho e com o açúcar foi necessário aumentar a polaridade do eluente para se conseguir uma boa separação dos pigmentos.

Assim, o resultado obtido parece depender essencialmente da polaridade dos eluentes, ao serem afetados pelos solventes que acompanham o extrato aplicado. Outra hipótese para explicar os resultados obtidos, pode estar relacionada com a granulometria dos diversos adsorventes e assim, provocar diferentes capacidades de adsorção. O amido de milho e o açúcar retêm mais umidade que os outros adsorventes. O amido de milho tem uma capacidade de hidratação do grão superior ao amido da batata e ainda o facto de o açúcar ser um composto higroscópico.

Assim, e de acordo com o exposto considera-se que a fécula de batata é o melhor adsorvente porque reúne melhores condições na cromatografia em coluna, para a separação dos pigmentos carotenoides, das clorofilas *a* e *b* e ainda dos flavonoides.

Relativamente aos solventes testados os que permitiram a obtenção de melhores resultados foram: o éter de petróleo, a mistura acetona / éter de petróleo 10: 90 e a mistura acetona / éter de petróleo 25: 75.

3.5 Cromatografia de carotenoides

3.5.1 Revisão de Literatura

Na literatura existem relatos, com exemplos de trabalhos que descrevem a extração de carotenoides e flavonoides de alimentos e plantas como propostas, para a realização de atividades laboratoriais nas aulas de Química. Muitos autores têm revelado interesse em aproveitar as cores dos pigmentos naturais para aplicar no ensino da Química. Assim, muitas atividades laboratoriais que recorrem a estes pigmentos podem ser encontradas em diversas revistas de Química, nomeadamente no *Journal of Chemical Education* e na *Revista de Química Nova*, conforme se descreve a seguir.

Zeraik *et al* (2008) descreveram a extração do β -caroteno das cenouras, maceraram as cenouras com éter de petróleo, filtraram e o resíduo foi novamente extraído com éter de petróleo. As soluções obtidas foram evaporadas em rotaevaporador. O extrato obtido foi dissolvido em diclorometano e analisado por espectrofotometria UV-Visível. Os mesmos autores sugeriram outros alimentos com β -caroteno (por exemplo: abóbora, manga, espinafre).

Harold McKone propôs uma técnica para o isolamento dos carotenoides da polpa de tomate e das cenouras. Para isso adicionou aos alimentos etanol a 95% e agitou vigorosamente durante um minuto, tendo de seguida efetuado uma filtração e rejeitado a solução etanólica. Ao resíduo desidratado adicionou cloreto de metileno, agitou e evaporou até obter aproximadamente 1 mL. Posteriormente efetuou um TLC com a seguinte mistura de solventes, cloreto de metileno / hexano 3:10 e obteve três compostos coloridos: licopeno, xantofilas e β -caroteno.

Miller *et al* (2009) descreveram a extração dos carotenoides do tomate fresco. Cortaram o tomate em bocados pequenos e trituraram e, para efetuar a extração juntaram clorofórmio e deixaram repousar durante 15 minutos. Seguidamente filtraram com funil de Buchener. O extrato foi evaporado até à secura com evaporador rotativo, o sólido obtido foi dissolvido em acetona e analisado imediatamente por HPLC.

Silveira & Evans (1995) reportaram a extração dos carotenoides da polpa de tomate e das cenouras de boiões de alimentos de crianças. Colocaram os alimentos numa proveta, acrescentaram etanol a 95% e deixaram macerar durante 5 minutos. De

seguida removeram o etanol por filtração por vácuo e transferiram o resíduo para um balão de fundo redondo. Ao balão adaptaram um condensador, juntaram cloreto de metileno e deixaram em refluxo durante 3-4 minutos. O solvente recolhido foi filtrado por vácuo e o sólido voltou novamente para o balão. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, os líquidos foram combinados e lavados com água e sal por extração. À solução orgânica recolhida acrescentaram sulfato de sódio anidro, filtraram e evaporaram até à secura com evaporador rotativo. Para analisar a pureza das frações realizaram separadamente TLC com três placas de alumina e utilizaram os seguintes solventes: uma a mistura a 2% de cloreto de metileno / pentano, outra só com pentano e uma só com cloreto de metileno. Por fim, separaram o β - caroteno e o licopeno em coluna de alumina eluindo a banda amarela com a mistura anterior e a banda laranja avermelhada foi extraída com cloreto de metileno. Os carotenoides isolados foram analisados por espectrofotometria de UV- visível.

Ribeiro & Nunes (2008) apresentaram uma técnica de análise de carotenoides de pimentão por cromatografia em papel. Para a obtenção dos extratos, foram macerados pimentos em almofariz com uma mistura de acetona / hexano 1:5 e deixados em repouso durante 1 hora. Após este período a mistura foi filtrada com papel de pregas para um funil de separação. A fase aquosa foi separada da fase orgânica e a esta última acrescentaram sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi filtrada e concentrada até um volume de 1mL com aquecimento em banho maria mantido a 70°C e sob agitação. Posteriormente o extrato concentrado foi aplicado no papel de cromatografia, como eluentes recorreram à mistura de hexano com 5% de acetona.

3.5.2 *Resultados de investigação da cromatografia de carotenoides*

Os pigmentos existentes nas plantas e alimentos, nomeadamente os carotenoides e as antocianinas favorecem perspectivas de trabalho pedagógico, que podem ser desenvolvidas com a utilização dos extratos dos tecidos vegetais em atividades didáticas e representam um importante recurso que fomenta a articulação entre a teoria e a prática.

Tendo por base a pesquisa bibliografia efetuada iniciou-se o estudo pela separação dos pigmentos existentes no pimento vermelho, na polpa de tomate e na

cenoura raspada. Os alimentos foram triturados e macerados separadamente na mistura acetona / éter de petróleo 1:1. Seguiu-se uma filtração e extração com solução saturada de água com sal de cozinha, em funil de separação, desprezou-se a fase aquosa e à fase orgânica adicionou-se novamente a solução saturada. Reservou-se a fase orgânica e desprezou-se a fase aquosa.

Prosseguiu-se o estudo dos pigmentos carotenoides com a desidratação do pimento vermelho, da cenoura e da polpa de tomate. A cenoura foi desidratada em etanol e seguiu-se uma filtração, o resíduo obtido foi primeiro macerado em acetona e depois foi adicionado de um volume igual de éter de petróleo. O extrato foi então filtrado extraído em funil de separação com solução saturada de água com sal de cozinha. Desprezou-se a fase aquosa e a fase orgânica foi novamente extraída com água. Reservou-se a fase orgânica e desprezou-se a fase aquosa.

O pimento vermelho foi sujeito a uma desidratação em etanol, de seguida efetuou-se uma filtração e o resíduo foi novamente desidratado. O resíduo foi então macerado numa mistura acetona / éter de petróleo 1:1. Seguiu-se uma filtração e extração com solução saturada de água com sal de cozinha, em funil de separação, desprezou-se a fase aquosa e reservou-se a fase orgânica. Repetiu-se esta atividade para a polpa de tomate.

Macerou-se ainda pimentão seco moído, na mistura acetona /éter de petróleo 1:1. Filtrou-se e reservou-se o filtrado.

Para analisar a composição das fases orgânicas, efetuou-se a cromatografia em papel. Na tentativa de encontrar um sistema de eluentes capaz de separar os carotenoides, preparou-se várias câmaras de cromatografia em que se utilizou os seguintes solventes: mistura acetona / éter de petróleo 10: 90, etanol a 99%, acetato de etilo, etanol / éter de petróleo 1:1, etanol / éter de petróleo 8:2. O eluente que permitiu melhor resolução para o extrato de tomate foi a mistura etanol / éter de petróleo 1: 1 e o etanol a 99%, para a cenoura e pimento vermelho foi a mistura de eluentes acetona / éter de petróleo 10:90, sendo então estes utilizados como eluentes.

Efetuuou-se também um estudo comparativo, entre a composição da fração orgânica obtida pelo método da maceração em acetona e a obtida pela desidratação em

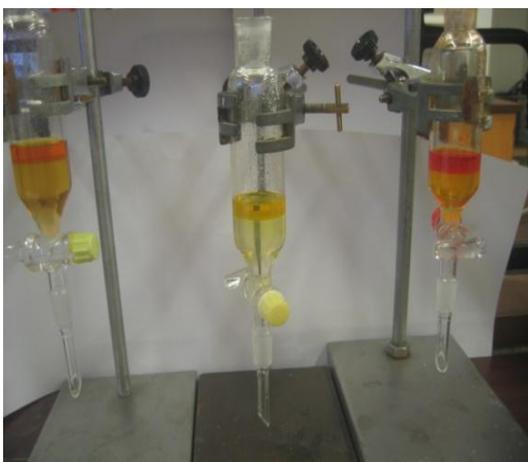
etanol seguida de maceração. Comparou-se ainda a composição do pimento vermelho com a do pimentão seco moído.

Procedeu-se ainda à separação dos pigmentos existentes na polpa de tomate por cromatografia em coluna com fécula de batata. Para isso, a fase orgânica do procedimento anterior foi adicionada de um pouco de fécula e deixou-se evaporar o solvente de modo a preparar um extrato sólido. Aplicou-se este extrato numa coluna empacotada com fécula de batata, eluiu-se a coluna com éter de petróleo e separou-se uma banda amarela seguida de uma alaranjada.

Fig19- Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D)

Maceração em acetona do pimento, cenoura e polpa de tomate

1- Resultados da primeira extração com água e sal de cozinha

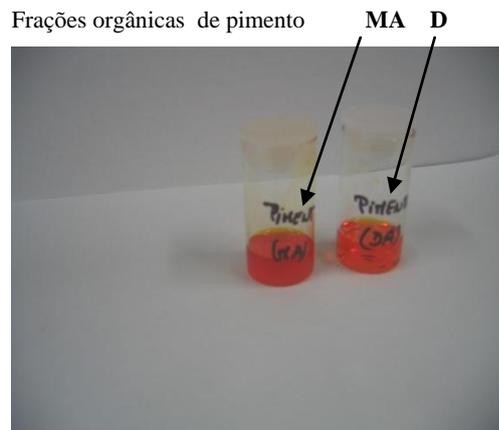
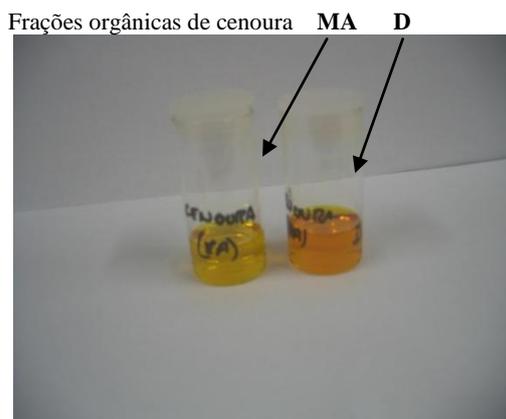
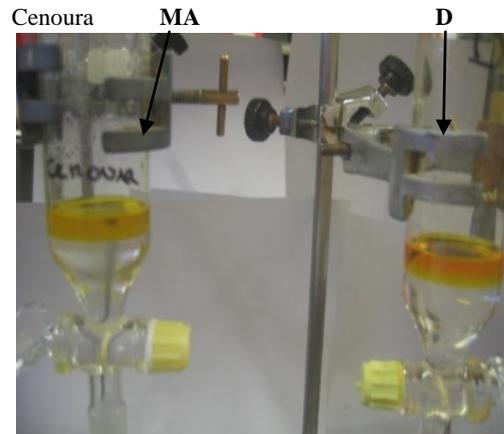
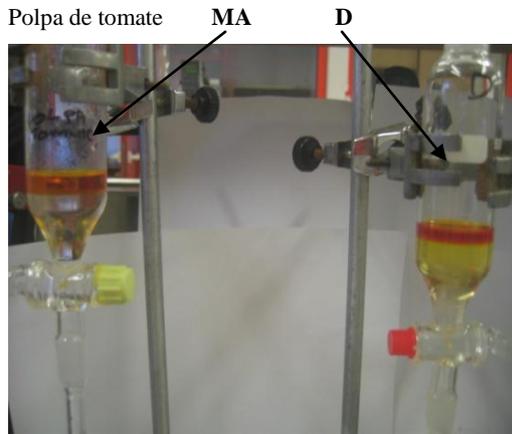


2- Resultados da segunda extração com água



Fig20- Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D) (continuação)

Comparação dos resultados de extração obtidos pelos dois métodos: MA- maceração simples D- desidratação

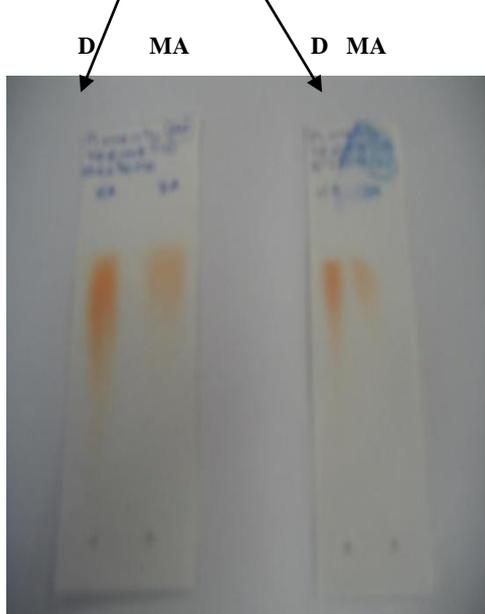


Frações orgânicas de cenoura, tomate e pimento obtidas pelos dois métodos

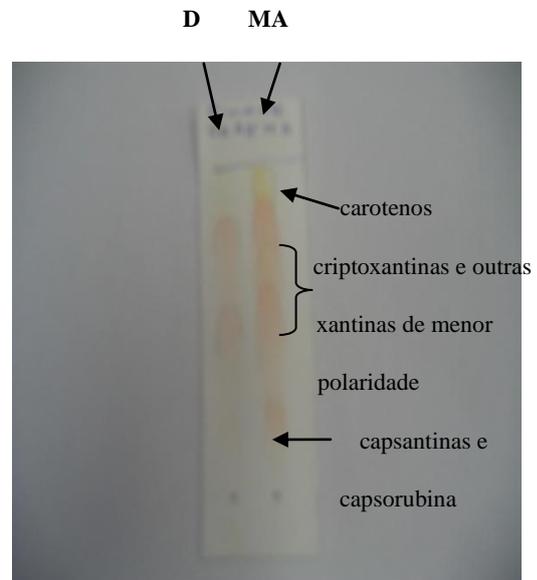


Fig21- Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D) (continuação)

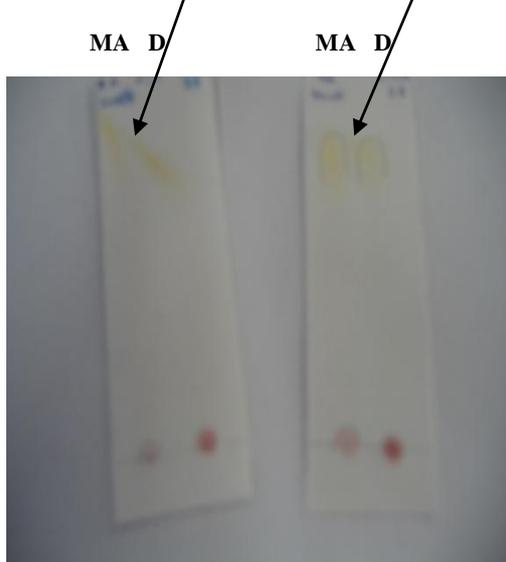
Cromatogramas das frações orgânicas do pimento obtido por maceração direta (eluente: mistura acetona/etanol 1:1 e em etanol)



Cromatogramas das frações orgânicas do pimento na mistura acetona/éter de petróleo 10:90



Cromatogramas das frações orgânicas da polpa de tomate na mistura acetona/etanol 1:1 e em etanol



Cromatograma das frações orgânicas da cenoura na mistura acetona/etanol 1:1 e em etanol

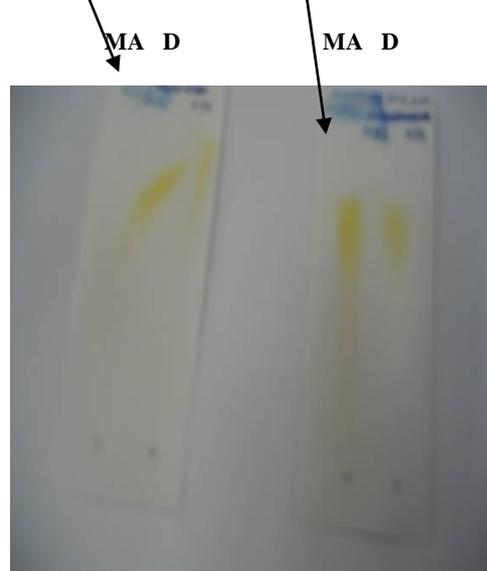
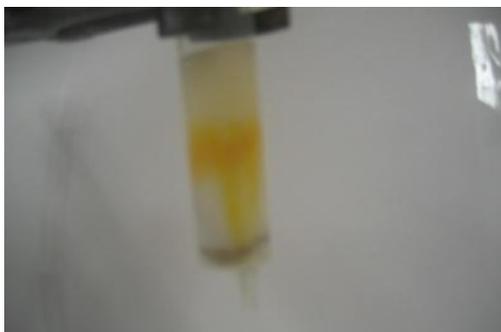


Fig22 Atividades de cromatografia de carotenoides - frações maceradas em acetona (MA) e desidratadas em etanol (D) (continuação).

Cromatografia da polpa de tomate em coluna de fécula de batata



Cromatografia da polpa de tomate em coluna de fécula de batata



Cromatografia da polpa de tomate em coluna de fécula de batata



3.5.3 Discussão dos resultados da cromatografia de carotenoides

Os carotenoides como o β -caroteno e o licopeno são tetraterpenos e caracterizam-se por uma cadeia de polieno com múltiplas ligações duplas conjugadas que são as responsáveis pelas características de absorção do espectro e pelas propriedades fotoquímicas (Miler *et al*, 2009). Existem três isômeros dos carotenos, conhecidos como alfa, beta e gama carotenos. A forma beta é a mais abundante e está presente nas cenouras sendo a responsável pela sua cor característica. O β -caroteno é o precursor da vitamina A (Kamerling, 1946).

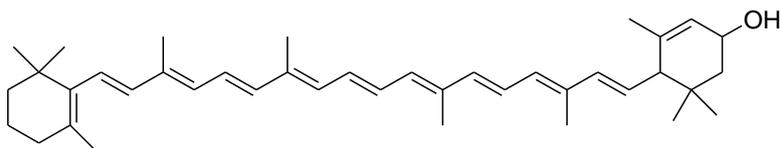


Fig23 - Fórmula de estrutura da α -criptoxantina

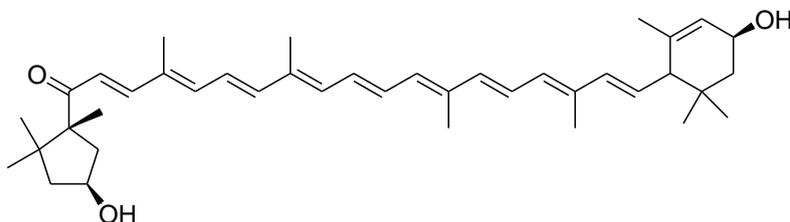


Fig24 - Fórmula de estrutura da capsantina

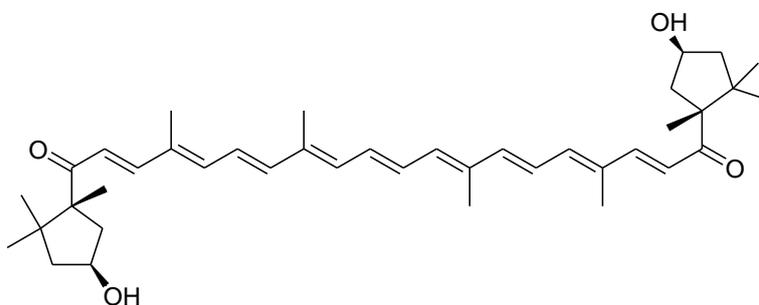


Fig25 - Fórmula de estrutura da capsorubina

Os tomates são fontes de carotenos, principalmente o β -caroteno e o licopeno (Ferrari, 2008). O licopeno compreende cerca de 80% a 90% dos pigmentos presentes nos tomates maduros e é encontrado em maior quantidade na casca (Ferrari, 2008). O responsável pela cor vermelha do tomate é o licopeno (Miller *et al*, 2009). Os isómeros *cis* do licopeno são mais bioativos que os isómeros *trans*, contudo os isómeros *trans* constituem 80% a 90% do total do licopeno presente no tomate fresco (Miller *et al*, 2009). As elevadas temperaturas, a exposição à luz e ao oxigénio e alterações no pH têm um efeito catalítico na isomerização e degradação do licopeno (Miller *et al*, 2009).

No pimento vermelho para além dos carotenos também existem xantofilas, como as capsantinas, as criptoxantinas e capsorubinas (Ribeiro & Nunes, 2008). Os principais cromóforos do pimento vermelho são a capsantina e a capsorubina, que são pigmentos vermelhos (Zeraik. & Yariwake, 2008).

No estudo realizado verificou-se que o procedimento de desidratação dos alimentos em etanol, originou extratos mais coloridos com o tomate e com a cenoura do que com o pimento vermelho. Assim, o extrato de pimento vermelho obtido unicamente por maceração na mistura acetona / éter de petróleo 1:1 apresentou uma coloração mais vermelha do que no extrato tratado por desidratação. A cromatografia em papel dos dois extratos parece ser concordante uma vez que no cromatograma do extrato que não foi desidratado as manchas de capsantina e / ou capsorubina, os principais cromóforos do pimento vermelho, apresentam-se muito mais intensas do que no cromatograma do extrato desidratado.

Quanto ao tomate, o extrato tratado por desidratação apresentou uma coloração mais intensa quando comparado com o extrato obtido da maceração direta na mistura acetona / éter de petróleo 1:1.

A realização da cromatografia em papel e em coluna de fécula de batata do tomate permitiu confirmar que o tomate possui na sua composição o β -caroteno (amarelo) e o licopeno (vermelho). A estrutura química do β -caroteno e do licopeno são semelhantes e por isso ambos são solúveis no éter de petróleo. Assim quando se passa éter de petróleo na coluna, embora o β -caroteno seja o primeiro pigmento a ser separado (amarelo), é logo seguido do licopeno (vermelho), assim a cor que se observa na coluna é o laranja que resultou da combinação do amarelo com o vermelho.

Ao realizar a cromatografia em papel do extrato de cenoura observou-se unicamente uma mancha amarela atribuída aos carotenos. O extrato do tomate apresenta uma mancha amarela idêntica que corresponderá aos carotenos e uma mancha vermelha atribuída o licopeno. Concluiu-se então que os carotenos estão presentes tanto na cenoura como no tomate, mas o licopeno só existe no tomate.

Os carotenos como o α e β -caroteno são hidrocarbonetos apolares nos quais prevalecem as interações do tipo forças de London (forças de atração entre dipolos temporários) e por isso têm pouca afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel, assim são os que mais se distanciam do ponto de aplicação da amostra (Ribeiro & Nunes, 2008). O licopeno deverá estabelecer interações do mesmo tipo e assim apresentar um comportamento semelhante em cromatografia em papel.

Dos solventes utilizados na cromatografia em papel do extrato de tomate os que possibilitaram melhores resultados foram: etanol e a mistura etanol / éter de petróleo 1:1. Os eluentes de baixa polaridade não conseguiram separar os carotenos do licopeno porque devem solubilizar muito bem os dois componentes. O resultado obtido quando se utilizou um eluente polar como o etanol, além da inversão nas características de solubilidade dos componentes, poderá dever-se à forte interação do etanol com a água da fase estacionária que, aumentando o tempo de eluição, contribuirá assim para uma melhor separação.

O pimento vermelho para além dos carotenos, também contém xantofilas, como a criptoxantina, a capsantinas e a capsorubinas. Na cromatografia do pimento vermelho verificou-se que as criptoxantinas como apresentam apenas um grupo hidroxilo não são tão arrastadas pelo solvente como os carotenos, pois são capazes de formar ligações de hidrogénio com a água adsorvida no papel. As capsantinas e capsorubinas apresentando dois grupos hidroxilo e ainda grupos carbonilo estabelecerão mais ligações de hidrogénio e, portanto, têm maior afinidade com a fase estacionária do que com a fase móvel sendo assim, os pigmentos mais retidos. Consequentemente estas últimas xantinas, devido a estas características de polaridade apresentarão também uma maior solubilidade em etanol, e podem ter sido parcialmente eliminadas neste solvente no método da desidratação.

A cromatografia em papel permitiu verificar que, a composição do pimentão seco moído é um pouco diferente da do pimento vermelho. A composição pode estar simplesmente relacionada com a espécie de pimento que deu origem a este produto comercial. Adicionalmente, uma vez que os carotenoides tem na sua composição múltiplas ligações duplas conjugadas, pode colocar-se a hipótese de estas terem sofrido isomerizações durante o processamento do pimentão seco moído e explicar, por exemplo, a presença de manchas extra e / ou ausência das xantinas mais polares.

Assim, a maceração de fontes de carotenoides numa mistura de água e acetona seguida de extração líquido-líquido com água e sal apresentou-se como um método adequado para o isolamento de carotenoides. Uma desidratação prévia em etanol seguida de filtração facilita o isolamento de carotenos, em particular quando a amostra contém um elevado conteúdo hídrico. No entanto, as xantofilas mais polares podem ser eliminadas durante este tratamento.

3.6 Atividades com pigmentos hidrossolúveis

As antocianinas pertencem à classe dos flavonoides e são derivados de sais flavílicos, são solúveis em água e responsáveis pelas cores atrativas de flores, frutos, folhas de frutos e vinho. Na natureza encontram-se ligadas a moléculas de açúcares, quando estão livres destes açúcares chamam-se antocianidinas (agliconas) (Okumura *et al*, 2002).

As cores apresentadas pelas antocianinas depende do pH do meio e por isso podem ser utilizadas como indicadores naturais de pH. Em soluções de pH neutro ou alcalino, as antocianinas são pouco estáveis e em soluções com pH ácido a cor pode desaparecer gradualmente quando a solução é exposta à luz (Março & Poppi, 2008).

Muitos autores têm estudado as propriedades indicadoras de pH das antocianinas tendo em vista aplicações analíticas para o ensino da Química.

Os indicadores de pH são substâncias orgânicas fracamente ácidas (indicadores ácidos) ou fracamente básicas (indicadores básicos) que apresentam cores diferentes em função do pH (Terci & Rossi, 2002).

Em 1835, Marquat efetuou estudos com várias espécies vegetais e designou antocianinas os pigmentos azuis das flores. Mas foi só no início do século XX que Willstatter e Robinson relacionaram as antocianinas com os pigmentos responsáveis pela coloração de diversas flores, dado que os seus extratos apresentavam cores diferentes consoante o pH do meio (Terci & Rossi, 2002).

Como foi referido no subcapítulo 2.4.3.3 (pag 32), as antocianinas em soluções aquosas apresentam diferentes estruturas em função do pH. Num meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração vermelha intensa devido ao predomínio do catião flavílio (AH^+). Num meio com pH maior que 2, observa-se um equilíbrio entre o catião flavílio e a pseudobase carbinol incolor. Para valores de pH acima de 6, a estrutura pseudobase carbinol e a anidrobases quinoidal podem formar a *cis*-chalcona. Com a ionização das antocianinas formam-se estruturas de anidrobases que apresentam a coloração azul. Em meio fortemente alcalino observa-se o equilíbrio entre as formas ionizadas de chalconas *cis* e *trans* que têm cor amarela (Março & Poppi, 2008).

3.6.1 Revisão de Literatura

Curtright *et al* (1996) explicaram como efetuaram a preparação dos pigmentos de antocianinas para TLC, assim, iniciaram a extração com metanol / HCl 99:1. A extração também podia ter sido efetuada com a mistura etanol / HCl 99:1, mas a separação dos pigmentos era mais lenta. As fontes de antocianinas que podem ser utilizadas nestes estudos são: maçãs vermelhas, mirtilos, morangos e couve roxa. Os tecidos vegetais foram macerados com o líquido extrator. No final os extratos foram concentrados com evaporador rotativo Os solventes utilizados no TLC foram a mistura de HCl concentrado / ácido fórmico / água na proporção 19,0: 39,6: 61,4.

Kanda *et al* (1995) prepararam “bolas de camaleão” a partir de extratos de plantas, para serem utilizadas como indicadores de pH. Nesta atividade utilizaram folhas de couve roxa para preparar o extrato, ferveram as folhas em água e a solução obtida foi filtrada com a ajuda de funil e papel de filtro. Para a obtenção das referidas “bolas” recorreram a uma solução aquosa de alginato de sódio a 2% à qual juntaram o extrato de couve roxa com agitação constante. A mistura obtida foi adicionada gota a gota a uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 1% tendo-se formado imediatamente as “bolas”. Os autores recomendam que as “bolas” antes de serem utilizadas devem permanecer na solução de cloreto de cálcio e acondicionadas no frigorífico a uma temperatura de cerca de 4° C.

Terci & Rossi (2002) discutiram as variações de cor observadas com a obtenção de indicadores de pH a partir de extratos de plantas. Os referidos autores utilizaram várias espécies entre as quais amora e uvas. Os extratos foram preparados por maceração da fruta em etanol. Posteriormente os extratos foram filtrados e obtiveram as soluções indicadoras de pH. Para o estudo de preparação de papel indicador de pH, procederam à imersão de tiras de papel de filtro qualitativo de 0,3 x 4,0 cm em cada um dos extratos. De seguida foram deixados secar ao ar durante aproximadamente 1h. Para avaliar a adequação dos extratos como indicadores de pH, foram utilizados soluções tampão com pH que variavam de 1 a 14.

Okumura *et al* (2002) reportaram a identificação de pigmentos naturais por cromatografia em papel. Os extratos das flores foram preparados por imersão de

pequenas quantidades de tecido vegetal em solução etanólica de HCl a 1%, num tubo de ensaio mantido a 80°C durante cerca de 40 minutos. De seguida realizaram a cromatografia em papel e como fase móvel utilizaram o eluente conhecido como BAW, uma solução de butanol, ácido acético e água na proporção de 4:1:5 (v/v).

Couto *et al* (1998) estudaram a aplicação de pigmentos de flores no ensino da Química. Prepararam os extratos de flores por imersão em etanol. De seguida eliminaram o solvente com um evaporador rotativo, sob vácuo e à temperatura máxima de 40°C. Este extrato foi utilizado na obtenção dos espectros de absorção molecular, verificação da Lei de Lambert-Beer e como indicador de ácido-base.

Mihalick & Donnelly (2007) apresentaram um estudo voltado para a educação, onde descrevem o tingimento de tecidos a partir de pigmentos de vegetais.

3.6.2 *Resultados das atividades com pigmentos hidrossolúveis*

3.6.2.1 *Preparação de “bolas camaleão”*

Tendo por base o trabalho de Kanda *et al* (1995) preparou-se “bolas” de alginato de sódio com vários materiais ricos em antocianinas com a finalidade de funcionarem como possíveis indicadores de pH. Os materiais testados foram extratos de couve roxa, mirtilos, jarro roxo e ainda vinho verde tinto e a bebida comercial groselha. Para preparar os extratos de couve roxa, ferveu-se em água quente os tecidos vegetais e filtrou-se. Os extratos de mirtilos foram preparados por maceração em almofariz com água, enquanto os extratos de jarro roxo e de folhas verdes foram obtidos por maceração em acetona. Utilizou-se ainda vinho verde tinto e a bebida comercial de groselha na preparação das referidas “bolas”.

O processo de preparação das “bolas” foi sempre o mesmo, assim preparou-se uma solução aquosa de alginato de sódio a 2%, à qual se juntou os extratos. Num goblé colocou-se uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 1% e adicionou-se gota a gota com pipeta Pasteur a solução de alginato de sódio com o extrato, sempre com agitação

constante. A formação das “bolas” foi imediata, filtrou-se com papel de filtro e lavou-se as “bolas” com água antes da sua utilização.

Num ensaio prévio testaram-se as “bolas” de jarro roxo. Adicionou-se uma “bola” a uma solução de ácido clorídrico a 1M e outra a uma solução de hidróxido de sódio 0,02M e registou-se a alteração da cor: em ácido ficou vermelha e em base ficou verde.

Para comparar a eficiência das bolas camaleão preparadas com as soluções originadas que lhe foram incorporados, foram comparados os resultados obtidos com as bolas e com as soluções.

Para testar as soluções de jarro roxo, colocou-se sucessivamente em tubos de ensaio as seguintes soluções: ácido clorídrico 1M, ácido acético 6M, ácido acético 0,1M, solução de bicarbonato de sódio a 10%, solução saturada de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio 0,02M. A cada uma das soluções adicionou-se extrato de jarro roxo e registou-se a alteração da cor.

Para dois conjuntos paralelos de tubos de ensaio transferiu-se as seguintes soluções: ácido acético 1M, ácido clorídrico 0,1M, hidróxido de sódio 1M, solução de bicarbonato de sódio a 10%, solução saturada de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio 0,02M. A um dos conjuntos acrescentou-se os extratos de couve roxa e registou-se as cores obtidas. Ao outro conjunto foram adicionadas “bolas” e registou-se novamente as cores obtidas. Realizou-se o mesmo procedimento com vinho tinto e groselha. Com o vinho tinto e com a groselha testou-se apenas as “bolas”.

Foi ainda testado o extrato de mirtilos em solução e com bolas. As soluções utilizadas foram as seguintes: ácido clorídrico 0,1M, ácido acético 1M, ácido acético 0,1M, ácido acético 0,01M, solução de bicarbonato de sódio a 1%, solução de bicarbonato de sódio a 0,1%, solução saturada de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio 1M.

Repetiu-se a atividade com a couve roxa usando as seguintes soluções: ácido clorídrico 0,1M, solução de bicarbonato de sódio a 0,1%, solução de bicarbonato de sódio a 1%, solução saturada de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio 1M.

Com estas atividades verificou-se que as “bolas” de alginato preparadas com couve roxa, vinho e mirtilos podem constituir uma forma diferente e interessante do ponto de vista didático, de usar os indicadores naturais de pH. Como um dos objetivos deste estudo era utilizar materiais do cotidiano, realizou-se novamente os procedimentos anteriores, mas as soluções de ácidos e bases foram substituídas por vinagre, limpa vidros, lixívia e solução de água e sabão.

Fig26 - Atividades com “bolas camaleão”

“Bolas” de mirtilos



“Bolas” de couve roxa



“Bolas” de groselha



“Bolas” de vinho

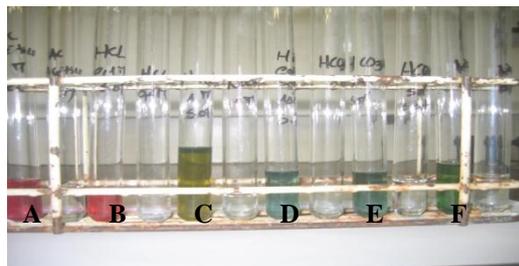


Soluções ácidas e básicas após adição de “Bolas” de couve roxa

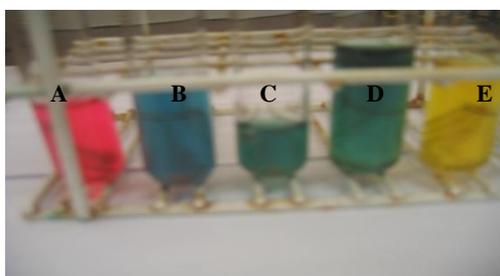


A- Ácido acético 1M; **B-** Ácido clorídrico 0,1M; **C-** Hidróxido de sódio 1M; **D-** Bicarbonato de sódio a 10%; **E-** Solução saturada de bicarbonato de sódio; **F-** Hidróxido de sódio 0,02M

Soluções ácidas e básicas após adição de extrato de couve roxa

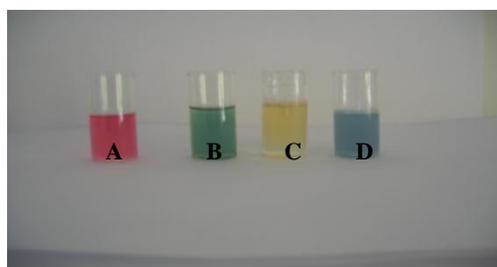


Soluções ácidas e básicas após adição de extrato de couve roxa



A-Ácido clorídrico 0,1M; **B-** Bicarbonato de sódio 0,1%; **C-** Bicarbonato de sódio 0,1%; **D-** Solução saturada de bicarbonato de sódio; **E-** Hidróxido de sódio 1M

Soluções ácidas e básicas após adição de extrato de couve roxa



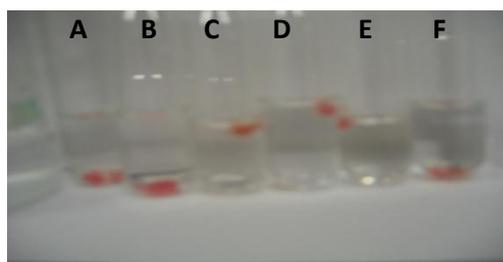
A- Vinagre; **B** – Limpa vidros **C** – Lixívia; **D-** Água com sabão

Adição de “bolas” de couve roxa



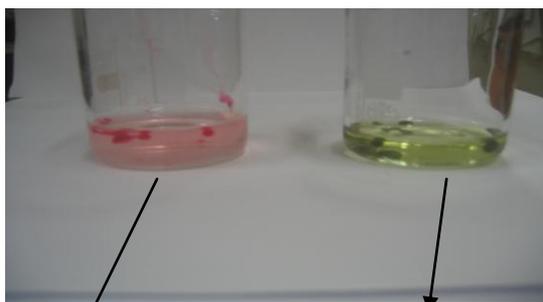
A – Vinagre; **B** – Limpa vidros; **C** – água com sabão

Soluções ácidas e básicas após adição de “Bolas” de groselha



A- Ácido acético 1M; **B-** Ácido clorídrico 0,1M; **C-** Hidróxido de sódio 1M; **D-** Bicarbonato de sódio a 10%; **E-** Solução saturada de bicarbonato de sódio; **F-** Hidróxido de sódio 0,02M

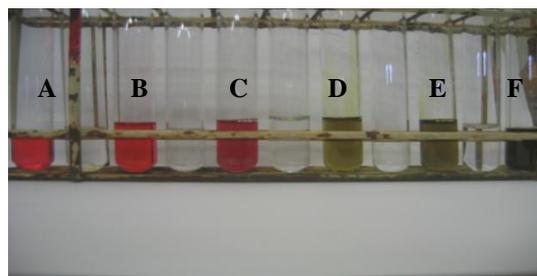
Adição de “bolas” de jarro roxo a solução Ácida e básica



Solução ácida

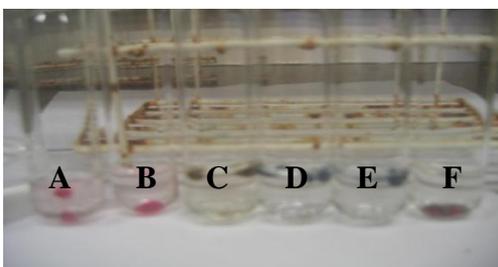
Solução básica

Soluções ácidas e básicas após adição de extrato de jarro roxo



A- Ácido clorídrico 1M; B- Ácido acético 6M; C- Ácido acético 0,1M; D- Bicarbonato de sódio a 10%; E- Solução saturada de bicarbonato de sódio; F- Hidróxido de sódio 0,02M

Adição de “bolas” de vinho



A- Ácido acético 1M; B- Ácido clorídrico 0,1M; C- Hidróxido de sódio 1M; D- Bicarbonato de sódio a 10%; E- Solução saturada de bicarbonato de sódio; F- Hidróxido de sódio 0,02M

3.6.2.2 Tingimento de tecidos

Mihalick, J. & Donnelly, K. (2007) apresentaram um artigo com propostas de atividades para o tingimento de tecidos recorrendo às cores dos vegetais. Assim, tendo por base este estudo, realizou-se o tingimento de tecidos de algodão e fibras sintéticas com pétalas vermelhas de rosas. Num recipiente de alumínio colocou-se água, um comprimido de Kompensan e as pétalas de rosas, deixou-se ferver em lume brando durante 25 minutos em recipiente tapado. Ao fim deste tempo adicionou-se os tecidos e deixou-se ferver mais 25 minutos. Repetiu-se a atividade mais duas vezes: um ensaio na

presença de um prego com ferrugem e num recipiente de inóx e outro ensaio só com os vegetais, os tecidos e recipiente de inóx.

Fig27 - Atividades com tingimento de tecidos

Tecidos de algodão tingidos com pétalas de rosas



Tecido de algodão ficou tingido de rosa;

Tecido de fibra permaneceu branco

Recipiente com prego com ferrugem



Tecido de algodão ficou tingido de rosa

Pétalas de rosa



3.6.3 Discussão dos resultados das atividades com pigmentos hidrossolúveis

Relativamente à utilização das “bolas” como indicadores de pH, as que possibilitaram a obtenção de melhores resultados foram as de couve roxa, mirtilos e vinho. As de jarro roxo ficaram vermelhas em contacto com a solução ácida e verde na solução básica, no entanto apresentaram difusão da cor.

A solução de couve roxa foi a que permitiu a obtenção de melhores resultados como indicador de pH, tanto em solução como em “bolas”. A solução de couve roxa em meio fortemente ácido, com pH=1, adquiriu a cor vermelho intenso, em meio fortemente básico, com pH=14 adquiriu a cor verde escuro que ao fim de alguns minutos passou para amarelo. Assim à medida que o pH aumenta os azuis passam a dar lugar aos verdes (azul + amarelo). Com as “bolas” de couve roxa obteve-se resultados similares aos da solução, no entanto esta permitiu visualizar melhor a mudança de cor. Estes resultados vão ao encontro de algumas investigações sobre a estabilidade das antocianinas e variação de cor com o pH, que permitiram verificar que as mudanças de cor destes compostos é mais significativa na região alcalina devido à sua instabilidade (Castaneda-Ovando *et al*,2009).

Quanto às “bolas” de vinho estas apresentaram cor vermelha em meio ácido, em meio fortemente básico, pH=14 têm cor verde que ao fim de alguns minutos passou a amarelo. Em soluções com pH entre os 12,2 a 12,5 apresentam cor azul e a pH= 11,3 observou-se cor verde

Em relação à solução e às “bolas” de mirtilos estas adquirem cor vermelho intenso a pH=1, a pH=2 a cor é vermelha e a pH = 3 rosa. Na região básica a pH=11 a cor é cinzento, a pH compreendido entre os 12 e 12,5 é verde escuro e a pH=14 é castanho.

Na atividade em que se utilizou a solução de couve roxa em soluções básicas com pH próximo (pH=11,2, 11,7 e 12,5) não se conseguiu distinguir convenientemente a cor azul da verde.

Quando se adicionou extrato e “bolas” de couve roxa ao vinagre obervou-se viragem para a cor vermelha, na solução de limpa vidros viragem para verde, na lixívia viragem para amarela e na água com sabão viragem para azul.

Do exposto pode concluir-se que as “bolas” de soluções de antocianinas podem funcionar como indicadores de pH pois permitem distinguir soluções ácidas das básicas e ainda identificar soluções fortemente ácidas e soluções fortemente básicas. Nas soluções com pH próximo de 1 ficam com uma coloração vermelho intenso, em meio moderadamente ácido adquirem tons entre o vermelho claro e o rosa. Nas soluções moderadamente básicas obtem-se cores entre o azul e verde e no extremo de pH,

próximo de 14, adquirem a cor amarela. As ligeiras diferenças de cores entre os vários extratos das antocianinas, para um mesmo valor de pH, podem ser atribuídas ao fenómeno de associação entre as cores, que é influenciado pela quantidade e pelo tipo de antocianinas presentes nos extratos.

Quando se deseja medir o pH de materiais coloridos estas soluções tornam-se inadequadas devido à dissimulação das cores. Relativamente a aplicações didáticas, o custo e a dificuldade de aquisição podem inviabilizar a utilização de indicadores comerciais. Assim, a facilidade de preparação de extratos de antocianinas tem sido utilizada em substituição de outros indicadores mais dispendiosos quando se pretende apenas diferenciar soluções ácidas de básicas. A incorporação destes extratos em “bolas” de alginato, além de atrair ainda mais a atenção dos estudantes, pode oferecer a vantagem de não contaminar o meio a analisar, se a “bola” for removida imediatamente após observação da viragem.

De facto, verificou-se que as soluções alcalinas de bicarbonato de sódio e de hidróxido de sódio dissolveram as “bolas” ao fim de aproximadamente 5 minutos. O alginato de sódio é um sal de sódio do ácido algínico que é solúvel em água. Na reação química de formação das “bolas” o alginato de sódio reage com o cloreto de cálcio e formam-se as “bolas” constituídas por alginato de cálcio que é insolúvel em água. Quando se junta às soluções de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio, as “bolas” reagem com estas soluções e volta a formar-se o alginato de sódio que é solúvel em água, daí a dissolução das “bolas”.

Nas atividades que envolveram o tingimento de tecidos, só ocorreu tingimento apreciável nos tecidos de algodão. Verificou-se que com pigmentos de pétalas vermelhas, as cores destes tecidos apresentaram uma cor mais intensa e duradoura nos casos em que aos banhos de tingimento se adicionou iões metálicos, alumínio (presente nos comprimidos de Kompensan) e ferro (presente nos pregos com ferrugem). Os resultados desta atividade comprovam que a estabilidade das antocianinas à perda de cor é potenciada pela presença de iões metálicos. Esse aumento de estabilidade é atribuído à copigmentação, ou seja, à associação entre a antocianina e o metal (Março & Poppi, 2008). A adição de iões metálicos aos banhos de tingimento potencia as ligações dos pigmentos do banho, pois aumenta o número de interações ião-dipolo com as fibras e as moléculas dos pigmentos (Mihalick & Donnelly, 2007).

As fibras sintéticas, sendo moléculas mais apolares que o algodão apresentam mais dificuldade em ligar-se às antocianinas que são moléculas polares.

Quando se adiciona o tecido de algodão ao banho com a solução de tingimento, os pigmentos ligam-se ao tecido através de forças intermoleculares. O algodão é composto por fibras de celulose. A estrutura da celulose é formada pela união de moléculas de D-glucose através de ligações glicosídicas β -1,4. As antocianinas, ricas em grupos OH, ligam-se facilmente às fibras de celulose através de ligações de hidrogénio com os grupos OH das unidades de glucose e, por isso, desenvolvem cores mais intensas que as fibras sintéticas. Os compostos metálicos que se adicionam ao banho formam ligações adicionais entre o corante e as fibras. Quando ao banho de tingimento se adicionou um comprimido de kompensan, este como tem na sua composição hidróxido de alumínio, tornou o meio alcalino, e por isso, os tecidos apresentaram a cor verde. Quando se realizou o tingimento com as pétalas e o prego com ferrugem, os tecidos apresentaram uma cor rosa, em relação ao tingimento só com as pétalas em utensílio de inox, verificou-se que os tecidos apresentaram uma cor ténue.

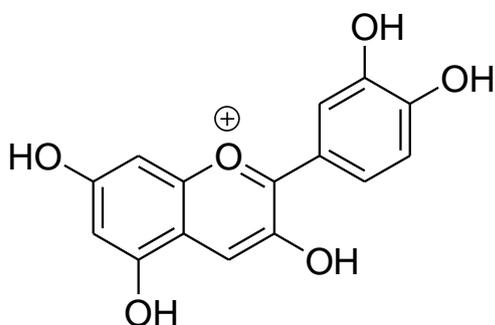


Fig28 - Estrutura da antocianidina cianidina

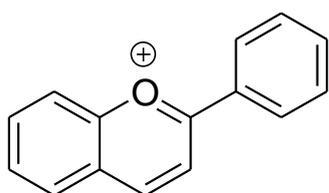


Fig29 -Estrutura do catião flavílio

Tabela 3.7- Soluções ácidas e básicas com o pH respectivo

Soluções ácidas e básicas	pH
Solução de ácido clorídrico 1M	1
Solução de ácido acético 1M	2.4
Solução de ácido acético 0.1M	2.9
Solução de ácido acético 0.01M	3.4
Solução de bicarbonato de sódio a 0,1%	11.2
Solução de hidróxido de sódio 0,02M	11.3
Solução de bicarbonato de sódio a 1%	11.7
Solução de bicarbonato de sódio a 10%	12.2
Solução saturada de bicarbonato de sódio	12.5
Solução de hidróxido de sódio 1M	14

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Introdução

Neste capítulo procede-se à descrição da parte experimental que sustenta o estudo realizado. O capítulo é, assim, constituído por quatro subcapítulos.

No primeiro subcapítulo (4.1) descreve-se como o presente capítulo se encontra estruturado. No segundo subcapítulo (4.2) são apresentadas as atividades referentes ao subcapítulo 3.4 do capítulo 3, nomeadamente: preparação de extratos e empacotamento da coluna (4.2.1), preparação dos extratos (4.2.1.1), empacotamento da coluna e aplicação da amostra (4.2.1.2); coluna de bicarbonato de sódio (4.2.2); coluna de areia / açúcar (4.2.3); coluna de farinha de milho amarela / branca (4.2.4); coluna de amido de milho comercial (4.2.5), coluna de fécula de batata (4.2.6) e preparação da cromatografia em papel (4.2.7). O terceiro subcapítulo (4.3) descreve as atividades do subcapítulo 3.5 do capítulo 3, especificamente: material e reagentes utilizados (4.3.1); maceração dos alimentos na mistura acetona / éter de petróleo 1:1 (4.3.2), maceração dos alimentos antecedida de desidratação em etanol a 99% (4.3.3), cromatografia em papel dos carotenoides (4.3.4), separação dos pigmentos da polpa de tomate por cromatografia em coluna (4.3.5). O quarto subcapítulo (4.4) aborda as atividades referentes ao capítulo 3, ponto 3.6, nomeadamente: material e reagentes (4.4.1), preparação de “bolas” de alginato de sódio (4.4.2) e tingimento de tecidos com pigmentos vegetais (4.4.3).

4.2 Atividades referentes ao Capítulo 3, ponto 3.4

4.2.1 Preparação dos extratos e empacotamento da coluna

Os tecidos vegetais utilizados foram os seguintes: folhas de alface roxa, folhas de uma planta verde e vermelha e folhas verdes (espinafres, relva e ervas daninhas). Os solventes utilizados foram éter de petróleo 40-60°, acetona e etanol. Os adsorventes usados foram bicarbonato de sódio, farinhas de milho, amido de milho e amido de batata, que foram adquiridos em supermercados. Os suportes usados para enchimento da coluna foram seringas descartáveis de 5mL e 20mL, adquiridas em farmácias.

4.2.1.1 Preparação dos extratos

Os extratos líquidos das folhas foram preparados de acordo com os seguintes procedimentos.

Trituração e maceração: Cerca de 12g de folhas foram trituradas em almofariz e, seguidamente, foram submetidas a maceração em 40 mL de acetona durante 15 minutos, mantendo o material tapado com folha de alumínio à temperatura ambiente. Os diferentes tratamentos desta mistura deram origem a cinco tipos de extratos:

Extrato bruto líquido: com auxílio de uma Pipeta Pasteur recolheu-se o líquido sobrenadante da mistura resultante da maceração do processo anterior para aplicação direta na coluna.

Extrato bruto líquido anidro: A solução resultante da maceração foi filtrada com a ajuda de funil e algodão para um goblé ao qual se acrescentou duas espátulas de sulfato de sódio anidro ou sal da cozinha vulgar e deixou-se em repouso cerca de 10 minutos. O líquido sobrenadante foi decantado ou filtrado através de um filtro de pregas.

Extrato orgânico líquido anidro: Após maceração adicionou-se 20mL de água à mistura e deixou-se repousar 10 minutos. A solução resultante foi transferida para um funil de

extração, adicionou-se 30mL de éter de petróleo e agitou-se. Deixou-se repousar e separou-se a fase orgânica (superior) da fase aquosa (inferior). À fase aquosa que apresentava uma cor castanha, juntou-se cerca de 3mL de vinagre (ou HCl 1M) e a mudança de cor para vermelho comprovou a presença de antocianinas. A fase orgânica foi transferida para um goblé, ao qual se acrescentou duas espátulas de sulfato de sódio anidro. Após 10 minutos de repouso o líquido foi filtrado através de um filtro de pregas adaptado a um funil e o filtrado foi acondicionado em frasco de amostras de vidro, que foi coberto com folha de alumínio e conservado no congelador.

Extrato bruto sólido anidro: Para a obtenção do extrato sólido, colocou-se duas espátulas de um sólido adsorvente (amido de milho, fécula de batata ou bicarbonato de sódio) numa placa de petri ou vidro de relógio e adicionou-se o extrato bruto líquido anidro. Deixou-se a mistura secar ao ar até evaporar toda a acetona (aproximadamente 5 minutos).

Extrato orgânico sólido anidro: Para a obtenção deste extrato, colocou-se duas espátulas de um sólido adsorvente (amido de milho, fécula de batata ou bicarbonato de sódio) numa placa de petri ou vidro de relógio e adicionou-se o extrato orgânico líquido anidro. Deixou-se a mistura secar ao ar até evaporar toda a acetona (aproximadamente 5 minutos).

4.2.1.2 Empacotamento da coluna e aplicação da amostra

Para o empacotamento da coluna colocou-se em primeiro lugar um bocado de algodão na extremidade da mesma, com a espessura de aproximadamente 0,5 cm. De seguida acrescentou-se uma espátula de areia, a fase sólida e novamente uma espátula de areia. O adsorvente foi adicionado lentamente à coluna fixada na posição vertical até cerca de três quartos, de modo a obter uma compactação uniforme. Antes da introdução da amostra passou-se éter de petróleo através da coluna e, quando o nível do eluente atingiu a fase estacionária, foi aplicada cuidadosamente a amostra no topo da coluna com a ajuda de uma Pipeta Pasteur ou um conta gotas, sempre que se utilizou um extrato líquido, ou com o auxílio de uma espátula no caso do extrato sólido. Quando a

amostra penetrou na fase estacionária, o eluente foi adicionado cuidadosa e continuamente sem deixar que o nível de solvente descesse abaixo do nível da coluna.

4.2.2 Coluna de bicarbonato de sódio

Método A - extrato bruto líquido (enchimento a seco da coluna): As folhas de alface roxa foram trituradas e maceradas de acordo com o procedimento descrito no ponto 4.2.1.1. Preparou-se uma coluna de bicarbonato de sódio de acordo com o procedimento do ponto 4.2.1.2. Utilizou-se como suporte, uma seringa de 5mL e colocou-se o extrato bruto líquido, tendo-se dado início à eluição com éter de petróleo. Com este solvente deslocou-se uma banda verde. Quando esta banda saiu utilizou-se acetona como eluente que arrastou uma banda de cor verde claro, com o etanol a 96% não se verificou deslocamento de bandas e, por último para eluir a banda castanha, que se encontrava no topo da coluna, utilizou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Os procedimentos foram reproduzidos com folhas de uma planta verde e vermelha. Com éter de petróleo deslocou-se uma banda verde intenso, seguida de outra verde. Com a mistura acetona / éter de petróleo 10:90, não foi possível arrastar este último verde, tendo sido necessário utilizar a mistura acetona / éter de petróleo 25:75. Por último para retirar outros verdes que permaneceram na coluna, utilizou-se o etanol a 99% e com a solução saturada de bicarbonato de sódio conseguiu-se arrastar a banda castanha que se encontrava no topo da coluna.

Método B - extrato bruto líquido (enchimento a húmido da coluna): As folhas de espinafres congelados foram trituradas e maceradas de acordo com o procedimento descrito no ponto 4.2.1.1 Para efetuar o enchimento da coluna a húmido, preparou-se uma suspensão de bicarbonato de sódio em éter de petróleo que foi colocada rapidamente numa coluna de cromatografia (20cm de altura e 2cm de diâmetro) até ao nível do adsorvente atingir três quartos da altura da coluna. Posteriormente adicionou-se o extrato bruto líquido e iniciou-se a eluição com éter de petróleo, tendo-se deslocado uma banda de cor verde. Uma vez recolhida esta fração eluiu-se a coluna com acetona que arrastou uma banda verde claro e, por fim com o etanol a 96% não se conseguiu separar nenhuma banda.

Método C (extrato bruto líquido anidro): As folhas de uma planta verde e vermelha foram maceradas e trituradas de acordo com o descrito no ponto 4.2.1.1 O suporte da coluna foi uma seringa de 20mL e o seu empacotamento foi efetuado como descrito no ponto 4.2.1.2. De seguida adicionou-se o extrato bruto líquido anidro e deu-se início à eluição com éter de petróleo, que separou uma banda verde intenso, continuou-se a eluição com a mistura de solventes acetona / éter de petróleo 25:75 e separou-se uma banda verde, quando esta foi recolhida, utilizou-se como eluente o etanol a 99% para arrastar os pigmentos verdes que permaneciam na coluna e com a solução saturada de bicarbonato de sódio conseguiu-se arrastar a banda castanha que se encontrava no topo da coluna.

Método D (extrato bruto sólido anidro preparado com bicarbonato de sódio): As folhas de uma planta verde e vermelha foram maceradas e trituradas de acordo com o descrito no ponto 4.2.1.1. O suporte da coluna foi uma seringa de 20mL e o seu empacotamento foi efetuado como descrito no ponto 4.2.1.2. De seguida adicionou-se o extrato bruto sólido anidro e deu-se início à eluição com éter de petróleo, que separou uma banda verde amarelado, continuou-se a eluição com a mistura de solventes acetona / éter de petróleo 25:75 e separou-se uma banda verde, quando esta foi recolhida, passou-se etanol a 99% para retirar os outros pigmentos verdes que ficaram na coluna e com a solução saturada de bicarbonato de sódio conseguiu-se arrastar a banda castanha que se encontrava no topo da coluna.

Método E (extrato bruto sólido anidro preparado com fécula): os procedimentos foram reproduzidos com os mesmos eluentes, com o éter de petróleo separou-se uma banda amarela que foi recolhida. Eluiu-se então com a mistura acetona / éter de petróleo 10:90, que arrastou uma banda verde, com a mistura acetona / éter de petróleo 25:75 separou-se uma banda verde, seguiu-se o etanol a 99% que arrastou outra banda verde e com a solução saturada de bicarbonato de sódio conseguiu-se arrastar a banda castanha que se encontrava no topo da coluna.

Método D (extrato orgânico sólido anidro): As folhas de uma planta verde e vermelha foram maceradas e trituradas de acordo com o descrito no ponto 4.2.1.1. O suporte da coluna foi uma seringa de 20mL e o seu empacotamento foi efetuado como descrito no ponto 4.2.1.2. De seguida adicionou-se o extrato orgânico sólido anidro e deu-se início à eluição com éter de petróleo, que separou uma banda verde amarela, continuou-se a

eluição com a mistura de solventes acetona / éter de petróleo 10:90, que separou uma banda verde.

4.2.3 Coluna de areia / açúcar

Método A (extrato bruto líquido): As folhas de alface roxa foram trituradas e maceradas de acordo com o procedimento descrito no ponto 4.2.1.1. Preparou-se uma coluna de areia e outra de açúcar granulado de acordo com o procedimento do ponto 4.2.1.2. Utilizou-se como suporte, uma seringa de 5mL. Após a adição do mesmo extrato nas duas colunas iniciou-se a eluição com éter de petróleo que arrastou uma banda verde intenso e com acetona separou-se uma banda verde e finalmente com o etanol a 96% não se obteve qualquer separação. A eluição dos pigmentos foi demasiado rápida, não permitindo uma separação nítida entre as faixas coloridas.

Método B (extrato bruto sólido anidro, preparado com fécula de batata): As folhas de uma planta verde e vermelha foram maceradas e trituradas de acordo com o descrito no ponto 4.2.1.1. O suporte da coluna foi uma seringa de 20mL e o seu empacotamento foi efetuado como descrito no ponto 4.2.1.2 com açúcar em pó. De seguida adicionou-se o extrato bruto sólido anidro e deu-se início à eluição com éter de petróleo, que separou uma banda amarela, continuou-se a eluição com a mistura acetona / éter de petróleo 10:90, que arrastou uma banda verde amarelado, prosseguiu-se com a mistura acetona / éter de petróleo 25 : 75 que arrastou a banda verde.

4.2.4 Coluna de farinha de milho amarela /branca

Método A (extrato bruto líquido): Preparou-se uma seringa de 20mL com farinha de milho amarela. O extrato de folhas de uma planta verde e vermelha foi preparado como descrito anteriormente. Iniciou-se a eluição com éter de petróleo que arrastou os pigmentos amarelos da amostra e também da farinha. Quando saiu toda a fração amarela é que o extrato líquido foi aplicado. Continuou a utilizar-se o mesmo solvente e separou-se uma banda de cor verde intenso e outra verde. Quando estas frações foram

recolhidas passou a eluir-se a coluna com acetona mas não se obteve nenhuma fração colorida.

Realizou-se novamente a atividade, com o adsorvente anterior e também com a farinha de milho branca. O extrato foi preparado como descrito nos pontos anteriores, mas com folhas de planta verde e vermelha. Os procedimentos foram reproduzidos, mas eluição decorreu de um modo muito lento, o que inviabilizou a sua realização.

4.2.5 Coluna de amido de milho comercial

Método A (extrato orgânico líquido anidro): Preparou-se uma seringa de 20mL como descrito nos pontos anteriores. A amostra foi obtida a partir de folhas de uma planta verde e vermelha. Adicionou-se o extrato líquido purificado por extração. Iniciou-se a eluição com éter de petróleo que arrastou com muita dificuldade a banda amarela, para conseguir separar-se esta banda prosseguiu-se com a mistura de solventes acetona / éter de petróleo 10:90. Quando se recolheu esta fração utilizou-se a mistura de solventes acetona / éter de petróleo 25:75 que separou uma banda verde intenso, seguida de uma verde. Por fim, recorreu-se ao etanol a 99% mas não se verificou a separação nenhuma banda colorida.

Método B (extrato bruto sólido anidro): Os procedimentos foram reproduzidos com o mesmo adsorvente como fase estacionária. Apenas se alterou a aplicação do extrato na coluna. Os eluentes foram os mesmos do método B e os resultados obtidos também foram comparáveis.

Método C (extrato bruto sólido anidro, preparado com fécula de batata): Os procedimentos foram reproduzidos com o mesmo adsorvente como fase estacionária. Apenas se alterou a aplicação do extrato na coluna. Deu-se início à eluição com éter de petróleo, que separou uma banda amarela, recolheu-se esta fração e continuou-se a eluição com a mistura acetona / éter de petróleo 10:90, que arrastou uma banda verde amarelada, prosseguiu-se com a mistura acetona / éter de petróleo 25 : 75 que arrastou uma banda da verde.

4.2.6 Coluna de fécula de batata

Método A (extrato bruto sólido anidro): A amostra foi obtida a partir de folhas de uma planta verde e vermelha. Efetuou-se o empacotamento de uma seringa de 20 mL com fécula de batata, como descrito nos procedimentos anteriores. Aplicou-se cuidadosamente no topo da coluna uma amostra de extrato bruto sólido anidro. A eluição com o éter de petróleo arrastou os pigmentos amarelos, e uma mistura de acetona / éter de petróleo 10:90 separou uma faixa amarelo escuro, seguida de uma verde. Uma vez recolhida esta fração, eluiu-se a coluna com uma mistura acetona / éter de petróleo 25:75 que arrastou uma banda verde, prosseguiu-se com etanol a 99% que arrastou outra banda verde, seguida de uma castanha.

4.2.7 Preparação da cromatografia em papel

O papel de cromatografia utilizado foi da marca Whatman. As amostras foram aplicadas com um capilar a cerca de 1,5cm das extremidades do papel com aproximadamente 5cm de largura por 10cm de altura. Num goblé com capacidade de 250mL colocou-se aproximadamente 15mL da fase móvel e mergulhou-se o papel até cerca de 0,3-0,5cm da extremidade próxima da amostra. O sistema foi tapado com um vidro de relógio até a fase móvel percorrer cerca de 8cm do papel.

4.3 Atividades referentes ao Capítulo 3, ponto 3.5

4.3.1 Material e reagentes

Os tecidos vegetais utilizados foram os seguintes: pimento vermelho, cenoura, polpa de tomate e pimentão seco moído, foram adquiridos no supermercado. A seringa de 20mL foi comprada na farmácia, a fécula de batata usada como adsorvente e o sal de cozinha foram adquiridos no supermercado. Os solventes usados foram éter de petróleo

40-60°, acetona, etanol. O papel de cromatografia utilizado foi da marca Whatman. Para as soluções preparadas em meio aquoso, foi sempre usada água destilada.

4.3.2 Maceração dos alimentos na mistura acetona /éter de petróleo1:1

Num almofariz colocou-se separadamente o pimento vermelho, a cenoura raspada e polpa de tomate, cortados aos bocados e triturou-se. Juntou-se a mistura acetona / éter de petróleo 1:1 e deixou-se macerar. De seguida filtrou-se com a ajuda de papel de filtro e funil para um funil de separação. Acrescentou-se a mistura acetona / éter de petróleo 1:1 e solução saturada de água com sal, agitou-se e quando as fases se separaram, desprezou-se a fase aquosa (inferior) e à fase orgânica juntou-se água. Agitou-se e desprezou-se novamente a fase aquosa, à fase orgânica juntou-se sal de cozinha e reservou-se.

4.3.3 Maceração dos alimentos antecedida de desidratação em etanol a 99%

Triturou-se e macerou-se a cenoura raspada em etanol a 99%. De seguida efetuou-se uma filtração com funil e papel de filtro. O filtrado foi desprezado e o resíduo voltou novamente ao almofariz e macerou-se novamente com etanol. Filtrou-se de novo e o resíduo voltou para o almofariz e macerou-se com a mistura acetona / éter de petróleo 1:1. Filtrou-se com a ajuda de papel de filtro para um funil de separação, acrescentou-se éter de petróleo e solução saturada de água com sal de cozinha. Agitou-se, desprezou-se a fase aquosa e à fase orgânica acrescentou-se uma espátula de sal de cozinha e reservou-se.

O pimento vermelho foi triturado e macerado em etanol a 99%. Seguidamente filtrou-se com a ajuda de papel de filtro e funil, para um copo. O resíduo voltou ao almofariz e macerou-se novamente em etanol. Filtrou-se de novo, rejeitou-se o filtrado e o resíduo foi macerado com a mistura acetona / éter de petróleo 1:1. Filtrou-se para um funil de separação e o resíduo voltou ao almofariz onde foi macerado éter de petróleo.

Realizou-se nova filtração para o funil de separação combinando os filtrados e juntou-se solução saturada de água com sal de cozinha. Agitou-se, desprezou-se a fase aquosa, e à fase orgânica isolada acrescentou-se uma espátula de sal de cozinha e reservou-se.

4.3.4 Cromatografia em papel dos carotenoides

Prepararam-se várias câmaras de cromatografia com eluentes diferentes. Assim, para goblés com capacidade de 250mL adicionou-se separadamente 10mL dos seguintes eluentes mistura acetona / éter de petróleo 10:90, etanol a 99% e mistura acetona / etanol 1:1. O papel de cromatografia utilizado foi da marca Whatman. As amostras foram aplicadas com um capilar a cerca de 1,5cm das extremidades do papel com aproximadamente 5cm de largura por 10cm de altura. No mesmo papel fez-se duas aplicações, a amostra de extrato obtido por maceração direta na mistura acetona / éter de petróleo 1:1 e o extrato submetido a desidratação prévia em etanol a 99% das três fontes: cenoura, polpa de tomate e pimento vermelho. Colocou-se um papel de cromatografia com as amostras de cenoura num goblé com etanol a 99%, outro num goblé com a mistura acetona / etanol 1:1 e outro numa mistura acetona / éter de petróleo 10:90, em ambos os casos obteve-se uma mancha amarela facilmente arrastada em todos os solventes. Quanto ao pimento vermelho utilizou-se os mesmos eluentes da cenoura e ainda a mistura acetona / éter de petróleo 10:90, mas só a última mistura permitiu a separação dos componentes das amostras (nos outros eluentes os componentes sofreram arrastamento comparável e as manchas ficaram sobrepostas próximas da frente dos solventes). Em relação à polpa de tomate os eluentes utilizados foram os mesmos da cenoura; com a mistura acetona / éter de petróleo 10:90 os componentes apresentaram arrastamento semelhante na frente dos solventes e as manchas ficaram praticamente sobrepostas, mas em etanol e na mistura acetona / etanol 1:1 obteve-se uma mancha amarela atribuída ao caroteno próxima da frente do solvente e uma mancha vermelha (atribuída ao licopeno) ficou retida junto do ponto de aplicação. Adicionalmente, testou-se o éter de petróleo puro mas os resultados foram comparáveis aos obtidos com a mistura acetona / éter de petróleo 10:90 Ainda se realizou um estudo comparativo entre o pimento vermelho e o pimentão seco moído.

Num papel de cromatografia aplicou-se a amostra de pimento vermelho preparado por desidratação prévia em etanol e a amostra de pimentão seco moído macerado na mistura acetona / éter de petróleo 1:1, o eluente escolhido foi a mistura acetona / éter de petróleo 10:90. Mergulhou-se os papéis até cerca de 0,3-0,5cm da extremidade próxima da amostra. Os sistemas foram tapados com um vidro de relógio até a fase móvel percorrer cerca de 8cm do papel. As manchas apresentaram uma separação razoável, evidenciando-se diferenças nos dois cromatogramas.

4.3.5 Separação dos pigmentos da polpa de tomate por cromatografia em coluna

Efetou-se o empacotamento de uma seringa de 20 mL com fécula de batata como descrito no ponto 4.2.1.2 deste capítulo e acrescentou-se a amostra (fase orgânica preparada no ponto 4.3.2), à qual se adicionou um pouco de fécula de batata e deixou-se evaporar o solvente para preparar um extrato sólido . Seguiu-se a eluição com o éter de petróleo para separar os pigmentos do tomate, primeiro saiu a fração amarela seguida de uma laranja.

4.4 Atividades referentes ao Capítulo 3, ponto 3.6

4.4.1 Material e reagentes

Couve roxa, faca, recipiente para ir ao lume, almofariz, jarro roxo, solução aquosa de alginato de sódio a 2%, placa de aquecimento, contagotas, solução aquosa de cloreto de cálcio a 1%, quadrados de tecido de algodão e de fibras 4cm x 4cm, pétalas de rosas vermelhas, comprimidos kompensan, ferro com ferrugem, ácido clorídrico 1M, ácido acético 6M, ácido acético 0,1M, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 10%, solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e hidróxido de sódio 0,02M, groselha, vinho verde tinto, mirtilos, vinagre, limpa vidros e água com sabão.

Os tecidos vegetais foram comprados no supermercado e as rosas na florista. Os reagentes utilizados foram adquiridos das firmas Merck.

4.4.2 Preparação de “bolas” de alginato de sódio.

Para a preparação dos extratos de couve roxa cortou-se cerca de 50g dos tecidos vegetais para um recipiente e acrescentou-se 250mL de água, deixou-se ferver durante aproximadamente 10 minutos em recipiente tapado. Após este tempo deixou-se arrefecer e filtrou-se por algodão. Em relação aos extratos de jarro roxo e mirtilos, estes foram preparados por trituração e maceração em almofariz com 20g de tecido vegetal em 20mL de acetona. Após este tempo os extratos foram filtrados por algodão.

Na preparação de “bolas” utilizou-se 20mL de uma solução aquosa de alginato de sódio a 2% à qual se juntou 30mL dos extratos preparados e agitou-se. Numa placa de aquecimento ligou-se a agitação magnética e colocou-se um goblé com 100mL de solução aquosa de cloreto de cálcio a 1%. A esta solução adicionou-se gota a gota com pipeta Pasteur a solução de alginato de sódio com o extrato, sempre com agitação constante. A formação das “bolas” foi imediata, de seguida filtraram-se as “bolas” com papel de filtro e lavaram-se com água antes da sua utilização.

Em tubos de ensaio colocou-se sucessivamente 2mL de cada uma das seguintes soluções: ácido clorídrico 1M, ácido acético 6M, ácido acético 0,1M, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 10%, solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e hidróxido de sódio 0,02M. A cada uma das soluções adicionou-se duas “bolas” de jarro roxo, registou-se a mudança de cor das “bolas”.

Transferiu-se para tubos de ensaio, 2mL das seguintes soluções: ácido acético 1M, ácido clorídrico 0,1M, hidróxido de sódio 1M, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 10%, solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e hidróxido de sódio 0,02M. De seguida acrescentou-se 1mL das soluções dos extratos de couve roxa e registou-se as cores obtidas, voltou-se a repetir a atividade mas substituindo a solução pelas “bolas” e registou-se novamente as cores obtidas. Realizou-se o mesmo procedimento com vinho tinto e groselha. Com o vinho tinto e com a groselha não se adicionou aos tubos de ensaio as soluções, só as “bolas”.

Com os mirtilos, utilizou-se 2mL das seguintes soluções: ácido clorídrico 0,1M, ácido acético 1M, ácido acético 0,1M, ácido acético 0,01M, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 1%, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 0,1%,

solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e hidróxido de sódio 1M. A cada tubo de ensaio adicionou-se 1mL de solução de extrato de mirtilos.

Quanto à couve roxa realizou-se novamente a atividades mas com as seguintes soluções: ácido clorídrico 0,1M, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 0,1%, solução de hidrogenocarbonato de sódio a 1%, solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e hidróxido de sódio 1M.

Para três tubos de ensaio transferiu-se sucessivamente: 2ml de vinagre, 2mL de limpa vidros amoniacal, 2mL de lixívia e 2mL de água e sabão. A cada tubo acrescentamos 1mL de solução de couve roxa. Este procedimento também foi realizado com “bolas” de couve roxa.

4.4.2 Tingimento de tecidos com pigmentos de vegetais.

Num recipiente colocou-se cerca de 10g de pétalas vermelhas de rosas, 300mL de água, um comprimido de Kompensan e deixou-se ferver durante 25 minutos em recipiente fechado. Ao fim deste tempo acrescentou-se quadrados de tecido de algodão e fibras com cerca de 4 cm x 4cm e deixou-se ferver cerca de 25 minutos com o recipiente tapado. Finalmente retirou-se os tecidos e lavou-se com água. Repetiu-se duas vezes o procedimento, um com um prego com ferrugem em vez do comprimido e outro só com as pétalas de rosa e os tecidos

CAPÍTULO V

PROPOSTAS DE ATIVIDADES LABORATORIAIS PARA O ENSINO BÁSICO E SECUNDÁRIO

5.1 Introdução

Neste capítulo são apresentadas propostas de atividades laboratoriais para o ensino básico e secundário, tendo por base os estudos realizados no capítulo III. No primeiro subcapítulo (5.1) procede-se à descrição de como o capítulo se encontra estruturado. Relativamente ao segundo subcapítulo (5.2), este apresenta propostas de atividades laboratoriais de cromatografia em coluna, nomeadamente: cromatografia em coluna de bicarbonato de sódio (5.2.1); cromatografia em coluna de fécula de batata (5.2.2) e explicação das atividades de cromatografia em coluna (5.2.3). No que concerne ao terceiro subcapítulo (5.3), este refere-se a propostas de atividades laboratoriais com pigmentos carotenoides, especificamente: isolamento e separação dos pigmentos do pimento vermelho (5.3.1); isolamento e separação dos pigmentos do tomate numa polpa de tomate (5.3.2); isolamento dos pigmentos da cenoura (5.3.3) e explicação das atividades com pigmentos carotenoides (5.3.4). O quarto subcapítulo (5.4) aborda atividades laboratoriais com pigmentos hidrossolúveis onde se realiza a determinação das propriedades químicas de alguns materiais (5.4.1) e se destacam: “bolas” coloridas de couve roxa (5.4.1.1), separação dos pigmentos flavonoides por extração (5.4.1.2), tingimento de tecidos com vegetais (5.4.1.3) e explicação da atividades com pigmentos hidrossolúves (5.4.1.4).

5.2 Atividades laboratoriais de cromatografia em coluna

5.2.1 Cromatografia em coluna de bicarbonato de sódio

Objetivos

Separação dos pigmentos carotenoides, clorofilas e flavonoides, presentes nas folhas de plantas verdes e vermelhas e de árvores por cromatografia em coluna.

Materiais e reagentes

Folhas de árvores, arbustos, plantas de interior e jardim, seringa descartável de 20mL, algodão, areia, almofariz, contagotas ou pipeta Pasteur, suporte universal, vidro de relógio, éter de petróleo, solução saturada de bicarbonato de sódio, mistura acetona / éter de petróleo, 10:90 (v/v), mistura acetona / éter de petróleo, 25:75 (v/v), acetona, etanol a 96% e sal de cozinha.

Procedimento experimental

1. Utilizar 12g de tecidos vegetais e triturar num almofariz, de seguida acrescentar 40mL de acetona e deixar macerar durante 15 minutos. O material deve ser mantido tapado com folha de alumínio à temperatura ambiente.
2. Filtrar a solução resultante da maceração com a ajuda de funil e algodão para um goblé, acrescentar duas espátulas de sal de cozinha e deixar repousar cerca de 10 minutos.
3. Filtrar o líquido sobrenadante através de um filtro de pregas. Reservar o filtrado.
4. Para preparar o extrato sólido anidro colocar duas espátulas de bicarbonato de sódio numa placa de petri ou vidro de relógio e adicionar cerca de 5mL do filtrado anterior. Deixar a mistura secar ao ar até evaporar toda a acetona (cerca de 5 minutos).

5. Num almofariz triturar o bicarbonato de sódio para desfazer os grumos até ficar em pó solto.
6. Colocar numa seringa de 20mL um bocado de algodão na extremidade da mesma, com a espessura de aproximadamente 0,5cm e acrescentar uma espátula de areia. Fixar a coluna na posição vertical e adicionar o bicarbonato de sódio lentamente até cerca de três quartos, de modo a obter uma compactação uniforme e novamente uma espátula de areia.
7. Colocar por baixo um goblé.
8. Passar éter de petróleo e quando o líquido atingir a superfície da coluna colocar o extrato sólido preparado no ponto 4.
9. Continuar a adicionar éter de petróleo até sair a banda amarela.
10. Utilizar agora a mistura acetona / éter de petróleo, 10:90 até arrastar a banda de cor verde.
11. Seguidamente passar etanol a 96%, para arrastar os outros verdes que ficaram na coluna.
12. Preparar uma solução saturada de bicarbonato de sódio: medir 20mL de água para um goblé e adicionar duas espátulas de bicarbonato de sódio. Agitar com a ajuda de vareta.
13. Eluir a coluna com esta solução para arrastar a banda castanha que se encontra no topo da coluna.
14. Adicionar a esta última fração 3 gotas de HCl 1:1 (ou vinagre) e observar a mudança de cor.

5.2.2 *Cromatografia em coluna de fécula de batata*

Objetivos

Separação dos pigmentos presentes nas folhas verdes e vermelhos encontrados em plantas, arbustos e árvores, por cromatografia em coluna.

Materiais e reagentes

Folhas de árvores, arbustos, plantas de interior e jardim, seringa descartável de 20mL, algodão, areia, almofariz, contagotas ou pipeta Pasteur, suporte universal, vidro de relógio éter de petróleo ou benzina, mistura acetona / éter de petróleo, 10:90 (v/v), etanol a 90% ou 96%, acetona e sal de cozinha.

Procedimento experimental

1. Utilizar 12g de tecidos vegetais e triturar num almofariz, de seguida acrescentar 40mL de acetona e deixar macerar durante 15 minutos. O material deve ser mantido tapado com folha de alumínio à temperatura ambiente.
2. Filtrar a solução resultante da maceração com a ajuda de funil e algodão para um goblé, acrescentar duas espátulas de sal de cozinha e deixar repousar cerca de 10 minutos.
3. Filtrar o líquido sobrenadante através de um filtro de pregas. Reservar o filtrado.
4. Para preparar o extrato sólido anidro colocar duas espátulas de fécula de batata numa placa de petri ou vidro de relógio e adicionar cerca de 5mL do filtrado anterior. Deixar a mistura secar ao ar até evaporar toda a acetona (cerca de 5 minutos).
5. Colocar numa seringa de 20mL um bocado de algodão na extremidade da mesma, com a espessura de aproximadamente 0,5cm e acrescentar uma espátula de areia. Fixar a coluna na posição vertical e adicionar a fécula de batata

lentamente até cerca de três quartos, de modo a obter uma compactação uniforme e novamente uma espátula de areia.

6. Colocar por baixo um goblé.
7. Passar éter de petróleo e quando o líquido atingir a superfície da coluna colocar o extrato sólido anidro.
8. Continuar a adicionar éter de petróleo até sair a banda amarela.
9. Utilizar agora a mistura acetona / éter de petróleo, 10:90 até arrastar as bandas de cor amarelo escuro seguida de uma verde.
10. Seguidamente fazer passar a mistura acetona / éter de petróleo, 25:75 até recolher outra banda verde.
11. Passar etanol a 96% até arrastar a banda castanha.

5.2.3 *Explicação das atividades de cromatografia em coluna*

A cromatografia em coluna foi inicialmente desenvolvida pelo químico do petróleo, o americano D. T. Day, em 1900. O botânico M.S. Tswett usou em 1906, as colunas de adsorção nas suas investigações de pigmentos de plantas, mas só depois de 1930 é que esta técnica foi aproveitada pelos químicos. A cromatografia em coluna pode ser utilizada para a separação dos pigmentos de produtos naturais e em práticas normais de laboratório. Na cromatografia os constituintes da amostra são separados de acordo com a sua afinidade para a fase sólida (fase estacionária) e para os solventes (fase móvel). Os constituintes que têm mais afinidade para a fase estacionária são os últimos a serem separados e os que têm afinidade para os solventes são os primeiros.

Os principais pigmentos fotossintéticos são as clorofilas, os carotenoides e os flavonoides.

Os carotenoides encontram-se nos cloroplastos e acompanham as clorofilas. Dos carotenoides fazem parte os carotenos que são moléculas apolares e as xantofilas que são moléculas polares. Os carotenoides são solúveis em solventes apolares como o éter de petróleo, sendo a primeira fração a sair, têm cor amarela, seguidos pelas xantofilas também com cor amarela

As clorofilas apresentam a cor verde, a clorofila *b* é mais polar e apresenta a cor verde amarelada, a clorofila *a* é menos polar e apresenta a cor verde azulada.

A faixa castanha é composta pelos pigmentos flavonoides que são solúveis em solventes aquosos, por isso foi necessário recorrer à solução saturada de bicarbonato de sódio ou ao etanol para os conseguir separar.

5.3 Atividades com pigmentos carotenoides

5.3.1 Isolamento e separação dos pigmentos do pimento vermelho

Objetivo

Isolamento dos pigmentos do pimento vermelho e análise por cromatografia em papel.

Reagentes e materiais

Almofariz, balança, papel de filtro, funil de vidro, funil de separação de 50mL, proveta, espátula, vidro de relógio, goblés de 250mL, pipetas Pasteur, acetona, éter de petróleo, água, sal de cozinha, etanol a 99% e pimento vermelho.

Procedimento Experimental

1. Num almofariz colocar 10g de pimento vermelho e triturar bem, acrescentar 6mL de acetona e 6mL de éter de petróleo. Deixar macerar durante 10 minutos.
2. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para um funil de separação.
3. Acrescentar ao funil de separação, 10mL de solução saturada de água com sal de cozinha, 5mL éter de petróleo e 5mL de acetona. Agitar bem e esperar que as fases se separem, a fase aquosa (inferior) e fase orgânica (superior).
4. Desprezar a fase aquosa.
5. À fase orgânica adicionar 10mL de solução saturada de água com sal de cozinha.
6. Reservar a fase orgânica num frasco de recolha e adicionar uma espátula de sal de cozinha.
7. Preparar uma câmara de cromatografia: num goblé de 250mL adicionar 10 mL da mistura acetona / éter de petróleo 10:90. Tapar com vidro de relógio.

8. Cortar 1 retângulo de papel de filtro com 5cm de largura por 8cm de altura. Mergulhar um capilar na amostra que se encontra no frasco de recolha com a fase orgânica e aplicar no papel de filtro, a uma altura de 1cm da base do papel. Fazer sucessivas aplicações dos extratos com os capilares e deixar secar.
9. Colocar o papel de filtro na câmara e deixar o solvente atingir cerca de 6cm (2/3) do papel. Secar e observar o aspeto do cromatograma.

5.3.2 *Isolamento e separação dos pigmentos do tomate numa polpa de tomate*

Objetivo

Separação dos pigmentos do tomate por extração e separação dos dois carotenoides por cromatografia em papel.

Reagentes e materiais

Almofariz, balança, papel de filtro, funil de vidro, funil de separação de 50mL, frasco cónico, proveta, espátula, vidro de relógio, goblés de 250mL, pipetas Pasteur, acetona, éter de petróleo, água, sal de cozinha, etanol a 99% e tomate ou polpa de tomate.

Procedimento Experimental

1. Num almofariz colocar 10g de tomate e triturar bem, acrescentar 10mL de etanol. Deixar macerar durante 10 minutos.
2. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para um frasco cónico.
3. Colocar o resíduo no almofariz e acrescentar 20mL de etanol. Deixar macerar 5 minutos.
4. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para o mesmo frasco cónico e desprezar o líquido.

5. Colocar o resíduo no almofariz e juntar 5mL de acetona e 5mL de éter de petróleo. Deixar macerar 5 minutos.
6. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para um funil de separação.
7. O resíduo volta ao almofariz e acrescentar 5mL de éter de petróleo. Deixar macerar 5 minutos.
8. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para o funil de separação.
9. Acrescentar 10mL de solução saturada de água com sal de cozinha. Agitar bem e esperar que as fases se separem, a fase aquosa (inferior) e fase orgânica (superior).
10. Desprezar a fase aquosa.
11. À fase orgânica adicionar 10mL de água.
12. Reservar a fase orgânica num frasco de recolha e adicionar uma espátula de sal de cozinha.
13. Preparar duas câmaras de cromatografia: num goblé A de 250mL adicionar 10mL da mistura acetona / etanol 1:1; num goblé B de 250mL colocar 10mL de etanol. Tapar com vidro de relógio.
14. Cortar 2 retângulos de papel de filtro com 5cm de largura por 8cm de altura. Mergulhar um capilar na amostra que se encontra no frasco de recolha com a fase orgânica e aplicar no papel de filtro, a uma altura de 1cm da base do papel. Fazer sucessivas aplicações dos extratos com os capilares e deixar secar.
15. Colocar um papel de filtro na câmara A e outro na câmara B, deixar o solvente atingir cerca de 6cm (2/3) do papel. Secar e observar o aspeto do cromatograma.

5.3.3 *Isolamento dos pigmentos da cenoura*

Objetivo

Separação dos pigmentos da cenoura por extração e análise por cromatografia em papel.

Reagentes e materiais

Almofariz, balança, papel de filtro, funil de vidro, funil de separação de 50mL, frasco cônico, proveta, espátula, vidro de relógio, goblés de 250mL, pipetas Pasteur, acetona, éter de petróleo, água, sal de cozinha, etanol a 99% e cenoura.

Procedimento Experimental

1. Num almofariz colocar 10g de cenoura raspada e triturar bem, acrescentar 10mL de etanol. Deixar macerar durante 10 minutos.
2. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para um frasco cônico.
3. Colocar o resíduo no almofariz e acrescentar 10mL de etanol. Deixar macerar 5 minutos.
4. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para o mesmo frasco cônico.
5. Colocar o resíduo no almofariz e juntar 5mL de acetona e 5mL de éter de petróleo. Deixar macerar 5 minutos.
6. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para um funil de separação.
7. O resíduo volta ao almofariz e acrescentar 5mL de éter de petróleo. Deixar macerar 5 minutos.
8. Filtrar com o auxílio de funil e papel de filtro para o funil de separação.

9. Acrescentar 10mL de solução saturada de água com sal de cozinha e 5mL de éter de petróleo. Agitar bem e esperar que as fases se separem, a fase aquosa (inferior) e fase orgânica (superior).
10. Desprezar a fase aquosa.
11. À fase orgânica adicionar 10mL de água.
12. Reservar a fase orgânica num frasco de recolha e adicionar uma espátula de sal de cozinha.
13. Preparar duas câmaras de cromatografia: num goblé A de 250mL adicionar 10mL da mistura acetona / etanol 1:1; num goblé B de 250mL colocar 10mL de etanol. Tapar com vidro de relógio.
14. Cortar 2 retângulos de papel de filtro com 5cm de largura por 8cm de altura. Mergulhar um capilar na amostra que se encontra no frasco de recolha com a fase orgânica e aplicar no papel de filtro, a uma altura de 1cm da base do papel. Fazer sucessivas aplicações dos extratos com os capilares e deixar secar.
15. Colocar um papel de filtro na câmara A e outro na câmara B, deixar o solvente atingir cerca de 6cm (2/3) do papel. Secar e observar o aspeto do cromatograma.

5.3.4 *Explicação das atividades com pigmentos carotenoides*

Os pigmentos que estão presentes nas cenouras, tomate e pimento vermelho são os carotenoides, que são compostos apolares e por isso solúveis em solventes orgânicos como o éter de petróleo.

Dos carotenoides fazem parte os carotenos que são hidrocarbonetos insaturados e as xantofilas que têm oxigénio na sua composição, sendo por isso mais polares que os carotenos.

O pimento vermelho possui na sua composição carotenos e xantofilas. A cenoura tem carotenos, principalmente o β -caroteno que é o responsável pela cor das

cenouras. Os tomates para além dos carotenos também têm licopeno que lhe confere a cor vermelha. O pimento vermelho possui na sua composição carotenos e xantofilas (criptoxantinas, capsantinas e a capsorubinas).

Na cromatografia do pimento vermelho verificou-se que as criptoxantinas, como apresentam apenas um grupo hidroxilo, não são tão arrastadas pelo solvente como os carotenos, pois são capazes de formar ligações de hidrogénio com a água adsorvida no papel. As capsantinas e capsorubinas são substâncias polioxigenadas e portanto têm maior afinidade com a fase estacionária do que com a fase móvel sendo assim, os pigmentos que ficam mais tempo retidos. A mancha de cor amarela que é mais arrastada pelo solvente corresponde aos carotenos.

Na cromatografia do tomate aparece uma mancha amarela característica dos carotenos e uma alaranjada do licopeno que fica mais tempo retida. Na cenoura só aparece a mancha amarela característica dos carotenos.

5.4 Atividades com pigmentos hidrossolúveis

5.4.1 Determinação das propriedades químicas de alguns materiais

5.4.1.1 “Bolas” coloridas de couve roxa

Objetivos

Identificar materiais ácidos e básicos com “bolas” de alginato preparadas com couve roxa.

Materiais e reagentes

Couve roxa, sumo de limão, vinagre, pano, limpa vidros, água e sabão e lixívia, tubos de ensaio, suporte de tubos de ensaio, conta gotas, solução aquosa de alginato de sódio a 2%, agitador magnético, barra magnética, goblés de 100mL, solução aquosa de cloreto de cálcio a 1%, vareta de vidro, recipiente para ir ao lume, placa de aquecimento, faca.

Procedimento experimental

1. Cortar 50g de couve roxa para um recipiente, juntar 250mL de água. Deixar ferver durante 10 minutos em recipiente tapado.
2. Deixar arrefecer e filtrar por algodão para um goblé.
3. Num goblé 1 colocar 20mL de uma solução aquosa de alginato de sódio a 2% e adicionar 30mL da solução de couve roxa preparada no ponto 1. Agitar.
4. No goblé 2 colocar 100mL de solução aquosa de cloreto de cálcio a 1% e adicionar uma barra magnética.
5. Colocar o goblé 2 em cima de um agitador magnético e ligar a agitação.
6. Adicionar gota a gota o conteúdo do goblé 1 ao copo 2.
7. Filtrar as “bolas” formadas com pano e lavar bem com água.

8. Colocar num suporte 6 tubos de ensaio e numerar de 1 a 6,
9. Adicionar com conta gotas a cada tubo de ensaio cerca de 2mL das seguintes soluções: água destilada, sumo de limão, vinagre, limpa vidros, água e sabão e lixívia.
10. Acrescentar a cada uma das soluções anteriores 2 “bolas” de couve roxa.
11. Observar a alteração das cores das bolas em cada tubo e indicar o caráter químico de cada solução.

5.4.1.2 *Separação dos pigmentos flavonoides por extração*

Objetivo

Separação dos pigmentos da folha de uma planta de cor verde e vermelha de acordo com as características de solubilidade dos pigmentos presentes.

Reagentes e materiais

Pipeta Pasteur, folhas de planta verde e vermelha, HCl 1: 1 (ou vinagre), éter de petróleo, água, funil de separação.

Procedimento Experimental

1. Utilizar 12g de tecidos vegetais e triturar num almofariz, de seguida acrescentar 40mL de acetona e deixar macerar durante 15 minutos. O material deve ser mantido tapado com folha de alumínio à temperatura ambiente.
2. Filtrar a solução resultante da maceração com a ajuda de funil e algodão para um goblé, acrescentar duas espátulas de sal de cozinha e deixar repousar cerca de 10 minutos. Filtrar o líquido sobrenadante através de um filtro de pregas. Reservar o filtrado.

3. Transferir 8mL da solução de extrato para um goblé e adicionar 20mL de água e uma espátula de sal de cozinha. Deixar repousar 10 minutos.
4. Transferir 8mL do extrato para um goblé e adicionar 20mL de água e uma espátula de sal de cozinha. Deixar repousar 10 minutos.
5. Transferir a solução resultante para um funil de extração, adicionar 30mL de éter de petróleo, agitar. Deixar repousar as fases e separar a fase orgânica (fase superior) da fase aquosa (fase inferior).
6. Após este tempo de repouso, introduzir com uma pipeta Pasteur umas gotas ácido diretamente na fase inferior.
7. Observar duas fases coloridas imiscíveis, a fase superior de cor verde e a fase inferior de cor vermelha.

5.4.1.3 *Tingimento de tecidos com vegetais*

Objetivos

Demonstrar que é possível tingir tecidos com extratos de vegetais e que a presença de iões metálicos pode favorecer o processo.

Materiais e reagentes

Pétalas de rosas, prego com ferrugem, recipiente para ir ao lume, recortes de pano de algodão (5 x 5cm).

Procedimento experimental

1. Colocar cerca de 10g de pétalas de rosa num recipiente, adicionar 200mL de água, um prego com ferrugem,
2. Deixar ferver durante cerca de 25 minutos em recipiente tapado.

3. Colocar os recortes de tecido de algodão (5 x 5cm). Deixar ferver 25 minutos em recipiente tapado.
4. Deixar arrefecer e lavar os tecidos com água. Observar as cores formadas.

5.4.1.4 *Explicação das atividades com pigmentos hidrossolúveis*

As antocianinas são pigmentos que pertencem à classe dos flavonoides, estão presentes nas flores e folhas e noutras partes das plantas conferindo-lhes aspeto colorido. São moléculas hidrossolúveis, cujas cores variam em função do pH.

Assim, a pH entre 1 e 2 observa-se a cor vermelha, a valores de pH entre 5 e 6 são incolores e para valores superiores a 7, as antocianinas sofrem processos de degradação que dependem dos grupos substituintes que a formam e observa-se a cor amarela. À medida que o pH aumenta os azuis passam a dar lugar aos verdes (azul + amarelo) e a pH muito elevado aparecem os produtos de degradação amarelos.

As antocianinas são moléculas solúveis em água devido à presença de grupos polares, nomeadamente grupos hidroxilo que estabelecem ligações de hidrogénio com a água. Em contrapartida as clorofilas são moléculas de baixa polaridade devido ao predomínio de grupos apolares. Assim, as clorofilas são pigmentos lipossolúveis e ficam dissolvidas num solvente apolar como o éter de petróleo enquanto as antocianinas sendo hidrossolúveis ficam retidas na fase aquosa.

Quando se adiciona o tecido de algodão ao banho com a solução de tingimento, os pigmentos antociânicos ligam-se ao tecido através de ligações de hidrogénio, uma vez que o algodão, constituído por celulose, também tem na sua composição numerosos grupos hidroxilo. Os compostos metálicos que se adicionam ao banho formam ligações adicionais entre o corante e as fibras. Assim, os resultados desta atividade comprovam que a estabilidade das antocianinas à perda de cor é potenciada pela presença de iões metálicos. Esse aumento de estabilidade é atribuído à copigmentação, ou seja, associação entre a antocianina e o metal que protege a antocianina.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES, IMPLICAÇÕES E SUGESTÕES PARA FUTURAS INVESTIGAÇÕES

6.1 Introdução

Neste capítulo pretende-se apresentar as conclusões e implicações da investigação, levada a cabo com pigmentos dos vegetais, bem como sugestões para futuras investigações.

O capítulo encontra-se organizado em três subcapítulos: conclusões da investigação (6.2); implicações da investigação para o ensino da Química (6.3); e, por último, sugestões para futuras investigações (6.4).

6.2 Principais Conclusões

A análise dos resultados obtidos possibilita retirar algumas conclusões. Essas conclusões tentam dar resposta aos objetivos da investigação apresentados no capítulo I.

Com o primeiro objetivo da investigação pretendia-se desenvolver técnicas simples que permitissem a separação dos pigmentos vegetais carotenoides, clorofilas *a* e *b* e flavonoides presentes em folhas, com base nos métodos de cromatografia em coluna e papel recorrendo a solventes acessíveis e não tóxicos do quotidiano. Este foi o tema central do trabalho e após um estudo sistemático de vários adsorventes do quotidiano os resultados obtidos neste trabalho permitiram:

- A. Otimizar as condições de uma técnica de cromatografia em coluna de bicarbonato de sódio reportada na literatura que permitia separar basicamente uma banda verde, correspondente a uma mistura de carotenoides e clorofilas, e bandas castanhas de flavonoides. A otimização das condições experimentais reportadas tornou possível a separação de uma banda amarela de carotenoides e de uma banda verde de clorofilas, usando como solventes éter de petróleo e misturas de éter de petróleo e

acetona. Esta técnica demonstrou ser rápida e efeito visual apelativo, em particular quando a última fração de flavonoides vira para vermelho quando é tratada com ácido. No entanto, uma análise das frações por cromatografia em papel demonstrou falta de eficiência na separação dos diferentes pigmentos.

B. Encontrar um adsorvente que, para além de fornecer excelentes resultados, é de fácil acesso no quotidiano e não foi encontrado nenhum registo da sua utilização para este fim: a fécula de batata. Com este adsorvente foi possível a separação de bandas amarelas correspondentes aos carotenos e carotenoides, uma banda verde azulado correspondente à clorofila *a*, uma banda verde amarelado correspondente à clorofila *b* e uma banda rosada correspondente à fração dos flavonóides. Os solventes usados foram éter de petróleo, misturas de éter de petróleo e acetona, e etanol. O impacto visual mais desejado foi alcançado e a análise das frações por cromatografia em papel demonstrou uma excelente eficiência na separação dos diferentes pigmentos.

C. Implementar um procedimento simples, muito rápido, realizado à temperatura ambiente e que permite eliminar o solvente de maceração e a água residual das folhas sem recorrer a nenhum equipamento de laboratório e sem necessidade separar os pigmentos lipossolúveis dos hidrossolúveis.

No que respeita ao desenvolvimento de técnicas simples que possibilitassem a separação e análise dos pigmentos vegetais presentes em diversas fontes naturais (segundo objetivo da investigação), os resultados obtidos permitiram constatar que:

A. Adaptando métodos reportados na literatura aos objetivos deste trabalho, foi possível isolar / separar os pigmentos carotenoides existentes no pimento vermelho, na polpa de tomate e na cenoura raspada por dois métodos; maceração direta numa mistura acetona / éter de petróleo 1:1 e desidratação em etanol seguida de maceração numa mistura acetona / éter de petróleo 1:1. Um estudo comparativo destes dois métodos permitiu concluir que, o primeiro método é mais eficiente para o pimento vermelho enquanto que o segundo apresenta melhores resultados para o tomate e a cenoura.

B. Após experimentação de vários solventes foi possível encontrar eluentes adequados para analisar os diferentes extratos obtidos por cromatografia em papel:

uma mistura acetona / etanol 1:1 para o pimento vermelho e etanol para o tomate e a cenoura.

No que concerne ao terceiro objetivo da investigação, centrado em aplicações da variação de cor das antocianinas em função do pH reportadas na literatura, verificou-se que “bolas” alginato de sódio preparadas com couve roxa e mirtilos apresentaram bons resultados na identificação de substâncias ácidas e básicas do quotidiano. Testou-se também o tingimento de tecidos, e concluiu-se que as antocianinas tingiram bem tecidos de algodão e foi possível intensificar essa cor por adição de metais presentes em materiais do quotidiano.

Finalmente, cumprindo quarto e quinto objetivo pode afirmar-se que é possível elaborar propostas de atividades laboratoriais para o Ensino Básico e Secundário com a utilização de materiais do quotidiano passíveis de serem executadas em segurança, numa sala de aula normal.

6.3 Implicações para o Ensino da Química

As conclusões deste estudo sugerem algumas implicações para as práticas letivas, no domínio da componente laboratorial. Assim:

- Constatou-se que é possível realizar atividades laboratoriais com materiais pouco dispendiosos e que envolvam baixos riscos de segurança no que respeita à sua manipulação;
- Dada a falta de condições evidenciada em grande parte das escolas, nomeadamente de equipamento, é possível realizar várias atividades com material pouco sofisticado e em salas de aula normais;
- Necessidade de adaptar os métodos de ensino à realidade, articulando os conteúdos com o dia a dia, com o intuito de motivar os alunos para o estudo da Química e assim contrariar os níveis de insucesso escolar.

As atividades apresentadas foram otimizadas de modo a poderem ser realizadas nas escolas do Ensino Básico e Secundário, com aplicação a vários níveis de ensino. Cada atividade pode ser inserida nos conteúdos curriculares, permitindo fazer a ligação

com conceitos teóricos atualizados e apelativos, muitas vezes não mencionados nos referidos currículos.

Os protocolos das atividades apresentam-se de modo sistematizado, para facilitar a sua aplicação por parte do professor e respetiva execução pelo aluno.

Por outro lado permite também chamar a atenção para protocolos exequíveis e que podem ser implementados em salas de aula, sem recurso ao laboratório.

6.4 Sugestões para Futuras Investigações

Atendendo aos resultados obtidos neste estudo e às suas limitações, apresentam-se de seguida e neste contexto algumas sugestões para futuras investigações:

- Estender a investigação ao estudo de outras substâncias que não sejam os pigmentos vegetais;
- Averiguar que outros materiais existentes nos vegetais podem ter aplicações práticas no estudo da Química;
- Com os materiais utilizados neste estudo propor outras atividades laboratoriais;
- Analisar o impacto que, a aplicação destes materiais tem nas aulas e na motivação dos alunos para o estudo das ciências e da Química em particular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, A. & Leite, L. (2000a). Conceções de futuros professores de Ciências Físico-Químicas sobre a utilização de atividades laboratoriais. *Revista Portuguesa da Educação*, 13 (1), p. 185 – 208.
- Afonso, A. & Leite, L. (2000b). O ensino contextualizado de “pressão”. Algumas propostas de atividades práticas, com recurso a materiais do dia a dia. *Boletín das Ciencias*. XIII Congreso de Enciga.
- Amorim, A. T. (2009). A História das Ciências e a Adoção dos Manuais Escolares: uma investigação com manuais escolares e professores de Ciências Físico-Químicas, centrada no tema “Viver Melhor na Terra”. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho.p. 2- 4.
- Barberá, O. & Valdés, P. (1996). El trabajo práctico en la enseñanza de las ciencias: Una revisión. *Enseñanza de las Ciencias*, 14(3), p. 365-379.
- Barros, S. & Losada, C. (2003). Análisis del trabajo práctico en textos escolares de primaria y secundaria. *Enseñanza de las Ciências*, número extra, p.5-16.
- Barros, S., Losada, C. & Mondelo, M. (1998).Hacia de la innovación de las atividades prácticas desde la formación del profesorado. *Enseñanza de las Ciências*, 16 (2), p.353-366.
- Cabral, João. (2006). História breve dos pigmentos: das Artes da Idade Média (1ª parte). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*.103, outubro/dezembro.
- Cabral, João. (2007). História breve dos pigmentos: das Artes da Idade Média (2ª parte). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*.104, janeiro/março.
- Castaneda-Ovando, Pacheco-Hernandez, M., Paez-Hernandez,M. Rodriguez,J.& Galan-Vidal, A. (2009). Chemical studies of anthocyanins. *Food Chemistry*, 113, p.859-871.

Coelho, L. (2009). Atividades laboratoriais e autonomia na aprendizagem das ciências . In F. Vieira, M. A. Moreira, J. L. Coelho da Silva & M. C. Melo (eds.). *Pedagogia para a autonomia - Reconstruir a esperança na educação*. Atas do 4º Encontro do GT-PA (Grupo de Trabalho - Pedagogia para a Autonomia). Braga: Universidade do Minho, Centro de Investigação em Educação. CD-ROM.

Correia, M. & Freire, A. (2009). Trabalho laboratorial e práticas de avaliação de professores de Ciências Físico-Químicas do Ensino Básico. *Ensaio, pesquisa em educação em ciências*, 11 (1), junho.

Costa, Aloísio. (1982). *Farmacognosia, III volume, farmacognosia experimental*. 2ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian.

Couto, A. & Ramos, L. & Cavalheiro, E. (1998). Aplicação de Pigmentos de Flores no Ensino de Química. *Química Nova*. 21 (3), p. 221-227.

Cruz, A. (2006 a). As cores dos artistas História e ciência dos pigmentos utilizados em pintura.

<http://ciarte.no.sapo.pt/textos/html/cores/cores.html>, consultado em 03-07-2011.

Cruz, A. (2006 b). Para que serve à história da arte a identificação dos pigmentos utilizados numa pintura?

<http://ciarte.no.sapo.pt/textos/html/cores/cores.html>, consultado em 03-07-2011

Curtright, R. & Rynearson, J. & Markwell, J. (1996). Anthocyanins. Model Compounds for Learning about More than pH. *Journal of Chemical Education*. 73 (4), P.306-309.

DES (2001). Departamento Ensino Secundário. Programa de Física e Química A 10º ou 11º anos. Lisboa: Ministério da Educação.

DEB (2001a). Currículo Nacional do Ensino Básico – Competências Essenciais. Lisboa: Ministério da Educação.

DEB (2001b). Orientações Curriculares para o 3º Ciclo do Ensino Básico – Ciências Físicas e Naturais. Lisboa: Ministério da Educação.

- DES (2000). Revisão Curricular no Ensino Secundário. Lisboa: Ministério da Educação.
- Degani, Cass & Vieira. (1998). Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, 7 (5), p.21-23.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. & Paredes-Lópes. (2004). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.40 (3), p. 173-289.
- Dias, M., Guimarães, P. & Merçon, F.(2003) Corantes Naturais: Extração e Emprego como Indicadores de pH. *Química Nova na Escola*, 17 (5), p.27-29.
- Diehl-Jones, S. (1984). Chlorophyll Separation and Spectral Identification. *Journal of Chemical Education*. 61 (5), p.454-456.
- Dourado, L. (2006). Conceções e práticas dos professores de Ciências Naturais relativas à implementação integrada do trabalho laboratorial e do trabalho de campo. *Revista Eletrónica de Enseñanza de las Ciências*, 5 (1), p. 192-207.
- Esteves, E. & Leite, L. (2004). Atividades Laboratoriais e Evidências Indiretas. Um estudo com futuros professores. *Atas do XVII Congreso de Enciga*.
- Esteves, E. & Leite, L. (2005). Análise crítica de atividades laboratoriais: um estudo envolvendo estudantes de graduação. *Revista Eletrónica de Enseñanza de las Ciências*, 4 (1).
- Figueiroa, A. (2001). Atividades laboratoriais e educação em ciências: um estudo com manuais escolares de ciências da natureza do 5º ano de escolaridade e respetivos autores. *Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho*, p. 3- 7.
- Figueiredo, M. & Maia, M. (2005). Uma abordagem investigativa do trabalho experimental no ensino da química a alunos não-químicos na Universidade. *Enseñanza de las Ciências*. VII congreso. Número extra.
- Fonseca, S. & Gonçalves, C. (2004). Extração de Pigmentos do Espinafre e Separação em Coluna de Açúcar Comercial. *Química Nova na Escola*, 20 (11), p.55-57.

- Ferrari, A. (2008). Caracterização química de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill) empregando análise por ativação neutrônica instrumental. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Centro de energia nuclear na agricultura.
- Gaucher, G. (1969). An Introduction to Chromatography. *Journal of Chemical Education*. 46 (11), p. 729-733.
- Hodson, D. (1994). Hacia un enfoque más crítico del trabajo de laboratório. *Enseñanza de las Ciencias*, 12 (3), p.299-313.
- Horowitz, G. (2000). Undergraduate Separations Utilizing Flash Chromatography. *Journal of Chemical Education*. 77 (2), p.263-264.
- Jecks, A., Maestrin, A., Neri, C., Oliveira, K., Serra, O. & Yamamoto, J. (2009). Extração e purificação de clorofila *a*, da alga *Spirulina máxima*: um experimento para os cursos de química. *Química Nova*, (6) 32, p.1670-1672.
- Kanda, N. & Asano, T. & Itoh, T. (1995). Preparing “Chameleon Balls” from Natural Plants. *Journal of Chemical Education*, 72 (12), p.1131-1132.
- Kamerling, S. (1946). Leaf Pigments. *Journal of Chemical Education*. (4), p.202-204.
- Leite, Laurinda (2002 a). A inter-relação dados-evidências-conclusões: Um estudo com atividades laboratoriais incluídas em manuais escolares. *In Atas do II Congreso Internacional “Didática de las Ciencias” (Cd-Rom)*. La Habana: Ministerio de Educación.
- Leite, L. (2000). As atividades laboratoriais e a avaliação das aprendizagens dos alunos. *In Sequeira, M. e al. (Org). Trabalho Prático e Experimental na Educação em Ciências*. Braga: Universidade do Minho, p. 91-108.
- Leite, L. (2003). A promoção da aprendizagem das ciências no contexto da reorganização curricular: contributos do trabalho prático. Parte 2 – Didáticas e metodologias de educação: conceitos especificidade e sinergias. *Didática das ciências da Natureza e da Matemática*, p. 1105-1110.

Leite, L. & Dourado, L. (2005). A Reorganização Curricular do Ensino Básico e a utilização de Atividades Laboratoriais em Ciências da Natureza. Atas do XXVII Congresso de Enciga (Cd-Rom).

Leite, L.(2001). Contributos para uma utilização mais fundamentada do trabalho laboratorial no ensino das ciências. *In* Caetano, H. & Santos, M. (Org.). *Cadernos Didáticos de Ciências*. Lisboa: DES, p. 77-96.

Leite,L. (2006). Da complexidade das atividades laboratoriais à sua simplificação pelos manuais escolares e às suas consequências para o ensino e a aprendizagem das ciências. Atas do XIX Congresso de Enciga (Cd-Rom). Póvoa de Varzim: Escola Secundária Eça de Queirós.

Mamprin, M., Laburú, C. & Barros, M. (2008). La implementación o no de actividades experimentales en Biología en la enseñanza media y las relaciones on el saber profesional, basados en el lectura de Charlot. *Revista Eletrónica de Enseñanza de las Ciências*, 7 (3), p. 524-537.

Machado, Adélio. (2007). Métricas da Química Verde – A produtividade Atómica. *Química*. *Química* 107, p.47-55.

Março & Poppi. (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, 31 (5), p. 1218-1223.

Matos, G. & Valadares, J. (2005). O efeito da atividade experimental na aprendizagem da ciência pelas crianças do primeiro ciclo do Ensino Básico. *Investigações em ensino de ciências*, 6 (2), p. 227-239.

Merino, M. & Herrero, F. (2007). Resolución de problemas experimentales de Química: una alternativa a las prácticas tradicionales. *Revista Eletrónica de Enseñanza de las Ciências*, 6 (3), p. 630-648.

Mickey, C. (1981). Separation Technology. *Journal of Chemical Education*. 58(12), p. 997-1002.

Mihalick, J. & Donnelly, K. (2007). Cooking Up Colors from Plants, Fabric, and Metal. *Journal of Chemical Education*. 84 (1), activity 86.

- Miller, A. & Vaughan, P. & Sirvente, T. (2009). Effects of Storage Conditions on Lycopene Stability in Tomato Extracts. *Journal of Chemical Education*. 86 (11), p.1304-1306.
- Morais, F. (2006). Carotenóides: Características Biológicas e Químicas. Curso de Especialização em Qualidade em Alimentos. Universidade de Brasília, CET- Centro de Excelência em Turismo, p.3-9
- Oliveira, A. & Simonelli, F. & Marques, F. (1998). Cromatografando com giz e espinafre: um experimento de fácil reprodução nas escolas do ensino médio. *Química Nova na Escola*, 7(5)p. 37-38.
- Okumura, Soares & Cavalheiro. (2002). Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. *Química Nova*, 25(4), p .680-683.
- Paloschi, R. & Zeni, M. & Riveros, R. (1998). Cromatografia em giz no ensino da química: didática e economia. *Química Nova na Escola*, 7 (5), p.35-36.
- Praia, J. & Cachapuz, F. (1994). Un análisis de las concepciones acerca de la naturaleza del conocimiento científico de los profesores portugueses de la enseñanza secundaria. *Enseñanza de las Ciencias*, 12(3), p.350-354.
- Ribeiro, N. & Nunes, C. (2008). Análise de Pigmentos de Pimentões por Cromatografia em Papel. *Química Nova na Escola*, 29 (8) p.34-37.
- Rocha, T. & Demiate, I. & Franco, C. (2008). Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28 (3), 620-628.
- Rosa, C. & Rosa, A. & Pecatti, C. (2007). *Revista Eletrónica de Enseñanza de las Ciencias*, 6 (2), p. 263-274.
- Sequeira, M. (2000). O ensino prático e experimental em educação em ciências na revisão curricular do ensino secundário. *In Sequeira, M. et al. (org.). Trabalho Prático e Experimental na Educação em Ciências*. Braga: Universidade do Minho, 19-27.

- Sousa, M. (2009). As atividades laboratoriais e a adoção de manuais escolares de Ciências Físico-Químicas: uma investigação centrada no tema Viver Melhor na Terra. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, p. 17- 23.
- Silva, A. & César, M. (2005). Ver e inovar: atividades experimentais em Ciências Físico-Químicas. Enseñanza de las Ciências. VII congreso. Número extra.
- Soares, R. (2006). Estudo de Propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, p.11-13.
- Strain, H. & Sherma, J. (1969). Modifications of Solution Chromatography Illustrated with Chloroplast Pigments. Journal of Chemical Education. 46 (8), p.476-483.
- Streit, N. & Canterle, L. & Canto, M. & Hecktheuer, L. (2005). As Clorofilas. Ciência Rural, Santa Maria. 35(3), p.748-755, Maio-Junho.
- Szajdek, A. & Borowska, E. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits. Plant Foods Hum Nutr, 63, p. 147-156.
- Terci, D. & Rossi, A. (2002). Indicadores Naturais de pH: Usar Papel ou Solução? Química Nova . 25 (4), p.684-688.
- Valente, Collins & Manfredi. (1983). Conceitos de cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, julho, p.103-109.
- Vieira, R. & Vieira, C. (2005). O trabalho laboratorial na educação em ciências do ensino básico na perspetiva da promoção do pensamento crítico. Enseñanza de las ciencias. Número extra. VII congreso.
- Vieira, C. (2006). A avaliação das aprendizagens no contexto das atividades laboratoriais: influências de uma ação de formação nas conceções de professores de Biologia e Geologia. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, p. 2-4.
- Weil, Jacques. (1983). Bioquímica Geral. 4ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Zeraik, M. & Yariwake, J. (2008). Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. Química Nova . 31 (5), p. 1259-1262.

Legislação citada

Decreto – Lei nº 6 / 2001 de 18 de janeiro – Estabelece os princípios orientadores da organização e da gestão curricular do ensino básico, bem como a avaliação das aprendizagens e do processo de desenvolvimento do currículo nacional.