

SEPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

Objetivos:

- a) Ilustrar um método usado para separação e identificação de aminoácidos por cromatografia em camada fina.

Considerações:

A cromatografia em camada fina é um método de separação essencialmente micro analítico, que se baseia em diferentes partições, do tipo líquido-líquido, dos componentes de uma mistura sobre um suporte de sílica gel.

O fenômeno é, predominantemente de partição, embora outros fenômenos como a adsorção e a troca iônica também possam ocorrer em menor intensidade.

Os componentes básicos da cromatografia em papel são:

- a) **fase estacionária:** formada pelo sistema água-sílica, que resulta da adsorção das moléculas de água pela sílica, através de pontes de hidrogênio entre os grupos hidrofílicos da sílica e as moléculas de água.
- b) **fase móvel:** normalmente constituída de um solvente ou um sistema de solventes orgânicos de baixa polaridade.
- c) **Suporte sólido:** constituído pela placa de sílica, com características adequadas à cromatografia.

Durante o processo, a fase móvel passa sobre a sílica em contato íntimo com a fase estacionária, com a qual é imiscível, provocando uma partição contínua dos componentes da mistura entre as duas fases.

Material:

- a) Câmaras cromatográficas (béquer de 250 ml)
- b) Placa de sílica. (10 x 6 cm)
- c) Sistema de solventes: n-butanol: ácido acético: água (4:1:1) – volume final de 12 ml
- d) Padrões: Arginina, leucina, tirosina, glicina.
- e) Amostra : mistura de aminoácidos
- f) Tubo capilar
- g) Solução reveladora: ninhidrina 0,25% em acetona
- h) Estufa a 100 °C
- i) Plástico filme

Procedimento:

a) Preparo da cuba cromatográfica

Adicionar volume suficiente de fase móvel para realização da corrida e tampar com plástico filme. Deixar equilibrar por, no mínimo, 10 minutos. Em seguida, inserir a placa cromatográfica com as amostras e padrões aplicados.

b) Preparo da placa cromatográfica

Marcar a placa com auxílio de lápis de tal forma a ter 6 pontos equidistantes a 1 cm da extremidade inferior da placa. Identificar cada marcação em que serão aplicadas as amostras.

c) Aplicação das amostras e dos padrões

Aplicar, em quatro pontos, 2 μ L (microlitros) dos padrões preparados (Arginina, leucina, tirosina, glicina). Evitar que o diâmetro das aplicações ultrapasse 5 mm. Em seguida, aplicar a amostra desconhecida que você recebeu, da mesma forma que os padrões.

d) Corrida cromatográfica

Deixar a corrida cromatográfica ocorrer por cerca de uma hora ou até alcançar a marca feita para o final da corrida. Em seguida, remover a placa e secar em estufa a 60°C por cerca de 5 minutos.

e) Revelação

- Verter a solução reveladora de ninhidrina e coloque para secar em estufa a 100 °C durante 5 minutos.
- Delimite o contorno de cada mancha com um lápis.
- Meça as distâncias do ponto de origem aos centros das manchas e calcule os valores de Rf.
- Identifique, comparando com os valores de Rf dos padrões, os aminoácidos presentes na amostra.

Resultados e discussão:

A) Faça um esquema do cromatograma obtido:



B) Calcule os valores de Rf dos padrões e dos aminoácidos constituintes da amostra:

| Componente | Distância percorrida (cm) | Rf |
|------------|---------------------------|----|
| Arginina | | |
| Leucina | | |
| Tirosina | | |
| Glicina | | |
| Amostra: | | |

- C) Quais os aminoácidos estavam presentes na amostra analisada? Como chegou a esta conclusão?
- D) Qual é o princípio da técnica cromatográfica usada? Com base no resultado obtido, coloque os aminoácidos em ordem crescente de polaridade.
- E) Por que o sistema de solventes usado nesta prática não deve ser preparado com muita antecedência? Explique.
- F) Defina R_f e mostre como este valor pode ser usado para identificação dos componentes de uma mistura desconhecida.
- G) Se você quisesse também quantificar os aminoácidos isolados por cromatografia em papel, como faria? Qual é a precisão do método sugerido?
- H) Faça uma pequena revisão de literatura mostrando os principais métodos cromatográficos, suas diferenças e vantagens?