

MÉTODO PARA SÉPARAÇÃO DE CONSTITUINTES COMUNS DE CERAS VEGETAIS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.

ANTONIO SALATINO e JOSÉ BONZANI DA SILVA

Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CP 11461 - 05499 - São Paulo, SP.

ABSTRACT - (A method for separation of common constituents of plant waxes by means of thin layer chromatography). A method for thin layer chromatographic separation of classes of common constituents of plant waxes is described. A device is suggested, which enables the simultaneous development of up to 12 plates for preparative work.

RESUMO - (Método para separação de constituintes comuns de ceras vegetais por cromatografia em camada delgada). Descreve-se um método para separação de classes de constituintes comuns de ceras vegetais por cromatografia em camada delgada. Um dispositivo que permite o desenvolvimento simultâneo de até 12 placas para trabalhos preparativos é apresentado.

Key words - waxes, TLC.

INTRODUÇÃO

Vários métodos foram propostos para a separação das classes de constituintes mais comuns de ceras vegetais por cromatografia em placas de gel de sílica. Um deles (Tulloch 1976) recomenda o emprego de clorofórmio como fase móvel e ácido sulfúrico 50% com aquecimento a 110°C para a visualização das manchas no cromatograma. Outro método (Moyna e Garcia 1983) propõe duas migrações, uma delas com um sistema mais polar de solventes (MeOH - CHCl₃, 2:98) e outra com um sistema apolar (éter de petróleo-benzeno, 80:20). A visualização é feita também mediante carbonização dos constituintes com H₂SO₄. Embora estes métodos sejam eficientes para a separação da maior parte das frações constituintes das ceras, eles mostram alguns inconvenientes: a) não temos conseguido a separação de ésteres, cetonas e β-dicetonas com o emprego de clorofórmio como fase móvel; b) o segundo dos métodos acima exige duas migrações; c) a visualização é feita segundo um método destrutivo (inconveniente para fins preparativos), mediante o uso de um agente extremamente corrosivo.

O presente artigo propõe um método alternativo para a separação das frações biossinteticamente derivadas de ácidos graxos, comumente presentes em ceras vegetais. Propõe-se, além disso, o emprego de um dispositivo que permite o desenvolvimento simultâneo de várias placas cromatográficas em análises preparativas, além de sistema cromatográfico para isolamento de triterpenóides.

MÉTODOS

Foram empregadas placas de vidro de 20x17,5 cm e 2 mm de espessura, recobertas com uma camada de 0,25 mm de espessura de gel de sílica G Typ 60 (Merck), impregnadas com fluoresceína sódica 0,02% (Stahl 1969) e previamente ativadas a 105°C. 2 µl de soluções clorofórmicas a 0,5% de substâncias-modelos, ao lado de 16 µl de uma solução clorofórmica de uma mistura contendo 0,5% de cada uma dessas substâncias, foram depositados sobre as placas cromatográficas. Empregaram-se as seguintes substâncias-modelos: n-tetracosano (alcano), hexadecanoato de triacontila (éster), 16-hentriacontanona (cetona), tritriacontano-16,18-diona (β-dicetona), 16-hidroxi-hentriacontano (álcool secundário), n-triacontanol (álcool primário), ácido triacontanóico (ácido graxo), além da fração de aldeídos da cera foliar de cana-de-açúcar. Efetuou-se uma migração de 15 cm com o sistema ciclohexano: CHCl₃ (73:27) em cuba Desaga, previamente supersaturada. A visualização realizou-se à luz natural e à luz UV de ondas longas.

2 µl de solução clorofórmica a 0,5% de ácido ursólico, isolado da cera foliar epicuticular de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Salatino et al. 1985) foram depositados sobre placas cromatográficas semelhantes às acima descritas, porém sem impregnação com fluoresceína sódica. Foi feita uma migração de 15 cm com o sistema CHCl₃ : Et₂O: AcOEt (30:40:40) em cuba Desaga, previamente supersaturada. As placas foram nebulizadas com solução de fluoresceína sódica 0,2% ou solução clorofórmica saturada com SbCl₃. No primeiro caso, após nebulização, as placas foram postas a secar em local escuro, e visualizadas à luz natural e à luz UV de ondas longas. No segundo caso, as placas foram aquecidas em estufa a 110°C.

Placas cromatográficas foram colocadas em um dispositivo de aço inoxidável (Figuras 1 e 2) que comporta até 12 placas como as acima descritas. O dispositivo com as placas foi introduzido em cuba Desaga, revestida internamente com papel de filtro, contendo em seu interior o sistema de solventes. O dispositivo foi colocado de tal forma que as placas ficassem sobre o solvente, sem contato com ele. O sistema foi deixado em saturação por 15 min., após o que as placas foram baixadas para iniciar a migração. Foram realizadas análises de derivados de ácidos graxos e também análises de ácido ursólico.

Análises comparativas foram feitas para testar a sensibilidade dos métodos de visualização com fluoresceína-UV e carbonização com ácido sulfúrico, cromatografando-se quantidades crescentes de hexadecanoato de triacontila (0,1g a 10g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 relaciona os Rfs observados. Os dados revelam a total separação de todos os compostos analisados.

Nas placas impregnadas com fluoresceína, as substâncias são visualizadas à luz natural como manchas róseas sobre um fundo amarelo. À luz UV, a visualização é feita com uma sensibilidade muito maior, destacando-se os constituintes como manchas marrom-avermelhadas sobre um fundo verde-amarelado. Isto é válido para todas as funções analisadas, derivadas de ácido graxo, exceto os ácidos carboxílicos propriamente ditos, que aparecem como

TABELA 1. Rfs de substâncias-modelos de classes de constituintes comuns de ceras vegetais. Adsorvente: gel de sílica G Typ 60 (Merck); fase móvel: ciclohexano-CHCl₃ (73:27); visualização: luz UV de ondas longas.

Substância	Rf
n-Tetracosano (alcano)	0,73
Hexadecanoato de triacontila (éster)	0,50
16-Hentriacontanona (cetona)	0,43
Tritriacontano-16,18-diona (β-dicetona)	0,39
Aldeídos*	0,34
16-Hidroxi-hentriacontano (álcool secundário)	0,18
Triacontanol (álcool primário)	0,07
Ácido triacontanóico (ácido graxo)	0,01

* fração da cera foliar de cana-de-açúcar

manchas alaranjadas. Os triterpenóides, como o ácido ursólico, não são visualizados com tanta nitidez, aparecendo como uma área mais clara sobre o fundo verde-amarelado. Isso mostra que a fluoresceína interage de modos diversos com diferentes classes de substâncias, resultando manchas de distintos aspectos nos cromatogramas. A sensibilidade da visualização do hexadecanoato de triacontila com o emprego de fluoresceína sódica é pelo menos dez vezes maior que aquela obtida por carbonização com H₂SO₄ (limites de detecção 0,1 µg e 1,0 µg, respectivamente). Para fins preparativos, a eluição dos componentes separados pode ser feita sem nenhum inconveniente com CHCl₃, pois a fluoresceína é insolúvel neste solvente. Embora não tenha sido submetido a um teste quantitativo, a nossa experiência com o gel de sílica GF254 tem mostrado que este material propicia uma sensibilidade de visualização dos compostos das ceras ainda menor que a técnica por carbonização com H₂SO₄.

A análise cromatográfica do ácido ursólico resultou num cromatograma com uma mancha de Rf=0,45. A visualização sendo insatisfatória com fluoresceína-UV, pode ser realizada com reagentes indicados para terpenóides, como o SbCl₃. Para fins preparativos, contudo, uma vez localizada inequivocamente a zona do terpenóide (com o emprego de SbCl₃), pode-se facilmente detectá-la nas placas com fluoresceína, através da zona mais clara à luz UV. Outros terpenóides, como o uvaol, são visualizados de modo idêntico ao ácido ursólico, embora apresentem Rf distinto.

O emprego do dispositivo porta-placas propicia a obtenção de cromatogramas com características idênticas aos obtidos de modo convencional.

Agradecimentos - Desejamos expressar nossa gratidão ao Dr. A.P. Tulloch, do Prairie Regional Laboratory, National Research Council, Saskatoon, Canadá, pelo envio de substâncias-modelos de constituintes de ceras.

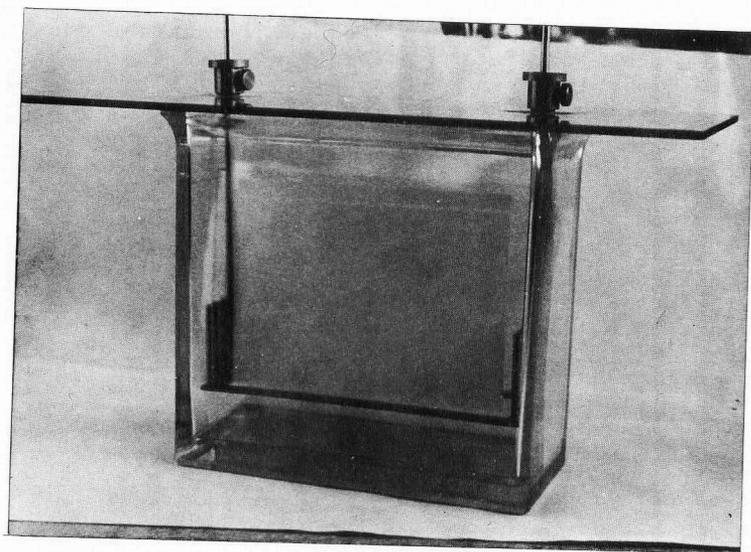


Figura 1. Dispositivo de aço inoxidável para colocação de até 12 placas cromatográficas de 20 cm x 17,5 cm x 2 mm em uma cuba normal (Desaga). Dimensões em milímetros.

Figure 1. Stainless steel device for the placement of up to twelve 20 cm x 17,5 cm x 2 mm chromatographic plates in a normal chamber (Desaga). measures in millimeters.

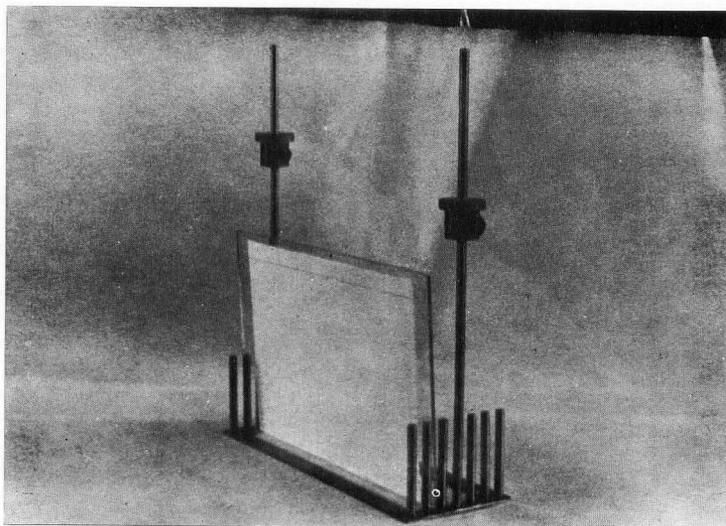


Figura 2. Dispositivo de aço inoxidável com várias placas cromatográficas.

Figure 2. Stainless steel device with several chromatographic plates.

REFERÊNCIAS

- MOYNA, P. & DELLACASSA, E. 1983. Chemical composition of oat seed epicuticular wax. *J. Sci. Food. Agric.* 34: 209-211.
- SALATINO, A., SALATINO, M.L.F., AMARAL, M. C.E. do, ROQUE, N.F. & VILEGAS, W. 1985. Ceras epicuticulares de las superficies adaxial y abaxial de hojas de dicotiledoneas del cerrado brasileiro. *Medio ambiente* 7: 15-20.
- STAHL, E. 1969. *Thin layer chromatography*. Springer Verlag, Berlin.
- TULLOCH, A.P. 1976. Chemistry of waxes of higher plants. In P.E. Kolattukudy ed. *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier. Amsterdam, p. 275-279.