

Cromatografia em papel de filtro*

JOSE' DAL POZZO ARZOLLA

20a. Cadeira — Química Orgânica e Biológica
E. S. A. "Luiz de Queiroz" — Piracicaba

ÍNDICE

1 — Histórico	180
2 — Eletrocromatografia	182
3 — Radiocromatografia	184
4 — Técnica cromatográfica	186
5 — Bibliografia	201

(*)

Entregue para publicação em 23-2-1955.

1 — HISTÓRICO

A cromatografia em papel de filtro trouxe para o analista grandes possibilidades para estudar melhor não só os compostos orgânicos como também os inorgânicos permitindo a separação espacial dos constituintes de uma mistura.

Atribue-se a origem da cromatografia à descrição de Plínio, do uso do papiro impregnado com extrato de noz de galha para a retenção do sulfato ferroso e aos posteriores estudos de Runge, Schoenbein, Gopelsroeder e outros, no período de 1850 a 1910.

Nas décadas seguintes, até 1931, pode-se dizer que houve um período latente para a cromatografia, embora tivesse surgido um trabalho de Tswett (1910), muito compreensível, "Chromophylls in Plant and Animal World", mostrando as possibilidades de um novo método para o estudo dos pigmentos verdes das plantas.

Em 1933 e 1934, Winterstein e Schon, e, também Karrer e Schopp, recomendaram o emprêgo da luz ultra-violeta para distinguir as substâncias pelas suas diferentes fluorescências.

Em 1937 já se pode observar a introdução dos conceitos cromatográficos na química inorgânica, por intermédio de Schwab e Jockers. Muito cresceu a literatura nos últimos anos, o que se pode verificar pelas imensas bibliografias apresentadas, devendo-se isto aos trabalhos de Winterstein, Wiltaedt, Armstrong, Celsi, Coffari, Cook, Dam, Hesse, Koschara, Lederer, Schwab, Sorensen, Stix, Zechmeister, Block, Cramer, etc.

Prosseguindo, temos em 1938 um grande número de observações mais ou menos gerais acerca da cromatografia, publicadas especialmente por Blockmann, Cassidy, Clark, Cook, Copley, Fleser, Fisk, Griffiths, Gull e Walley, Hesse, Lederer, Meyer, Robinson, Bacharach, Tawana, Jejen, Wahrman, Water e Wilstaedt, e por Strain uma detalhada monografia denominada "Chromatographic Adsorption Analysis".

Num resumo de Martin contido no recente manual de T. I. Williams, no "Papier Chromatografie" de Friedrich Cra-

mer (1953) e também no "Paper Chromatography" de J. Block (1952), temos reproduções coloridas de cromatogramas em papel, e em colunas.

Em 1938 Neuberg estava interessado em separar os ácidos aminados neutros e observou que o coeficiente de partição desses ácidos, entre a água e um solvente orgânico não miscível, diferia para cada um. Essa observação foi confirmada por Martin e Singe (1941), os quais construíram um complicado aparelho para a separação contínua daqueles compostos e, posteriormente para simplificar o dispositivo e separar as substâncias com coeficientes de partição muito próximos, resolveram usar um suporte inerte, o gel de sílica, para reter a fase aquosa e passar através da mesma o solvente imiscível.

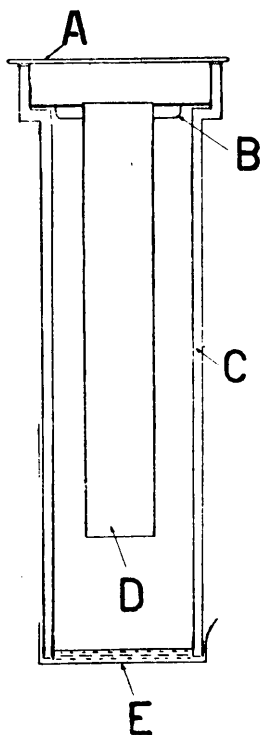


Fig. 1 — A-placa de vidro; B-cuba de vidro; C-manilha de barro; D-papel de filtro; E-solvente.

Martin e outros (1944), resolveram substituir o gel de sílica pelo papel de filtro, usando os dispositivos abaixo, (Figs. 1, 2), e em virtude da microosidade do processo. Inicialmente pensava-se que o papel de filtro desempenhava somente a função de suporte inerte para a fase aquosa, conforme o nome original "cromatografia de partição, mas reconhece-se atualmente que ele age por uma combinação de partição, adsorção e troca de iônicos.

O papel de filtro é empregado atualmente sem modificação das técnicas originais de R. Consden, A. H. Gordon e A. J. Martin (1944), descritas numa publicação original, "Qualitative Analysis of Proteins". A eles se deve a grande popularidade da cromatografia em geral.

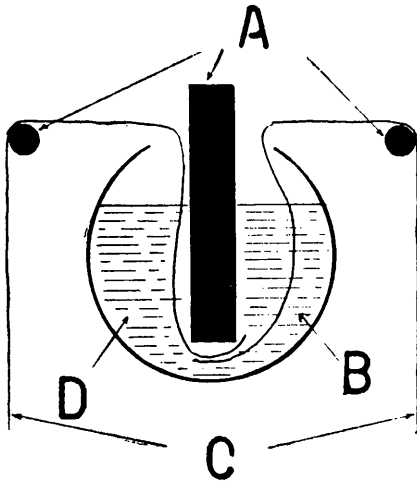


Fig. 2 — A - suportes de vidro;
B - solvente; C - papel de filtro;
D - cuba de vidro.

2 — ELETROCROMATOGRAFIA

Gordon (1952), modificando a técnica cromatográfica, usou um dispositivo extremamente simples, uma tira de papel de filtro, suspensa por dois suportes de vidro e cujas extremidades se achavam mergulhadas em solução "buffer" de veronal, 0,5M, pH 8,5. Por meio desse dispositivo, (Fig. 3), trabalhando com uma corrente de 5 volts/cm², durante 18 horas, pôde proceder à separação de certos compostos. Nesse mesmo ano

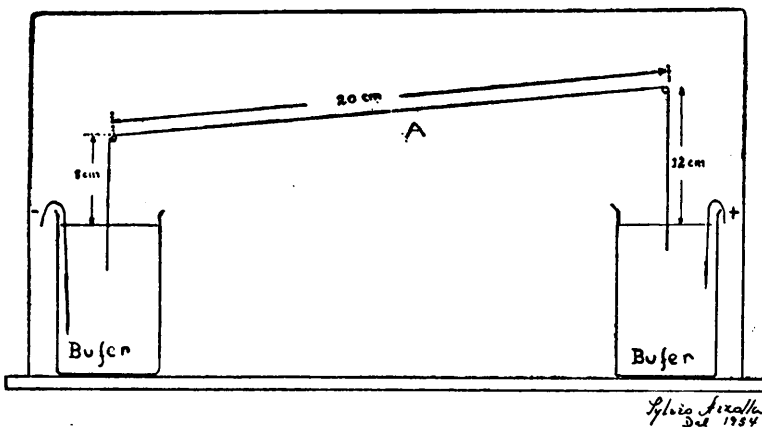
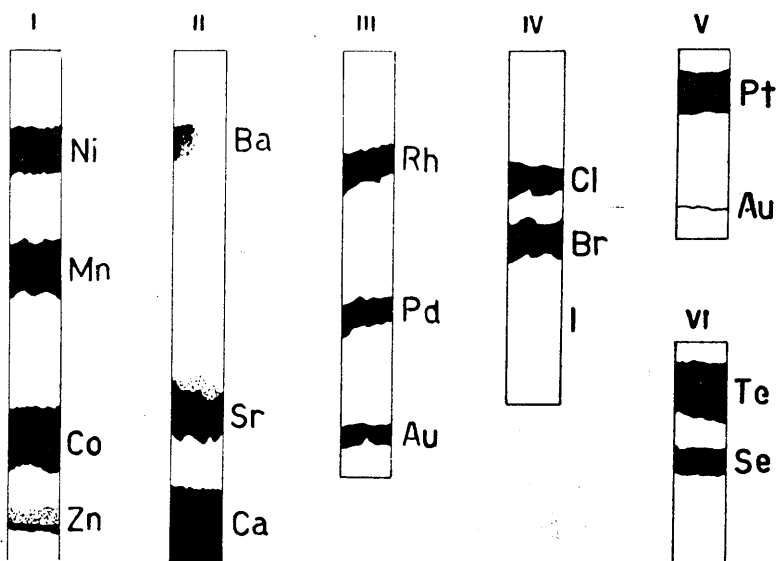


Fig. 3 — A - papel de filtro

Sylvio Arraiza
Set 1954

Strain usou sua célula eletrográfica, confeccionada com tiras de papel adsortivo, presas entre lâminas de vidro; trabalhando essa célula com a corrente elétrica, permitia-lhe separar os elementos minerais, graças ao fenômeno da eletromigração, (Fig. 3a.).



Strain, 1951

Fig. 3a — Eletrocromatogramas dos compostos inorgânicos

Outro dispositivo para a eletromigração é o de Burstall (1950) (Fig. 4) para operação contínua, constituído de uma folha de papel de filtro, com dois bordos paralelos, presos a duas hastes e contendo na parte central do bordo superior um compartimento parafinado onde se deve introduzir a substância a ser analisada; o papel se encontra entre eletrodos de platina e se mantém na posição vertical.

Assim, com uma corrente de 160 a 400 volts, aplicada à célula e, sob a ação do solvente, o composto ou mistura de compostos se desloca pelo papel tomando cada um uma direção diferente, atingindo finalmente o bordo inferior do mesmo, onde serão coletados em suas diferentes frações, para serem posteriormente identificados.

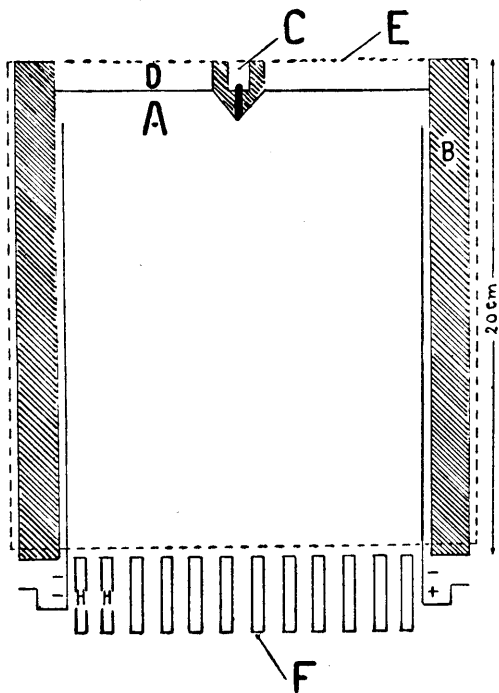


Fig. 4

Fig. 4 — A - papel de filtro; B - região de papel impregnada com parafina; C - compartimento para se introduzir a mistura de compostos; D - compartimento para o solvente; E - placa de vidro; F - tiras de papel de filtro para uniformizar a distribuição do solvente.

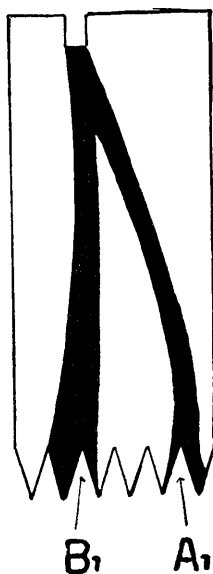


Fig. 4a

Fig. 4a — (A1 e B1) ácidos aminados.

3 — RADIOCROMATOLOGIA

Outro processo na cromatografia é o emprego da radio-autografia para se revelarem os cromatogramas, quando se trabalha com substâncias suscetíveis de serem radioativadas, como os ácidos orgânicos, ácidos aminados, açúcares, ou com aquelas cuja radioatividade pode ser adquirida no próprio organismo vegetal ou animal, uma vez que um desses organismos entre em contato com o elemento radiativo, seja através de uma solução, conforme trabalho realizado por Malavolta (1953), em orquídeas e tomateiros ou pela permanência de seu sistema foliar numa atmosfera de $C^{14}O_2$. A atmosfera desse anidrido

carbônico radioativo, pode ser obtida pela ação do ácido láctico sôbre o $BaC^{14}O_3$, (Fig. 5) conforme descrevem Leo P. Vernon e S. Aronoff (1952).

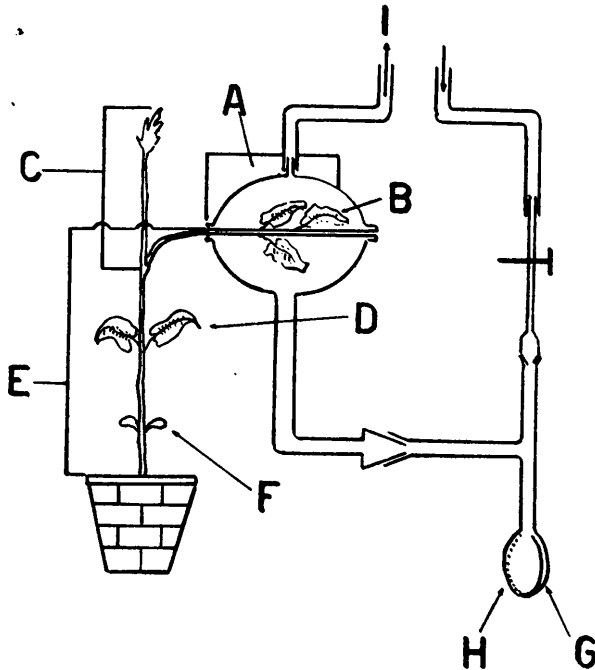


Fig. 5 — A - hemisférios de vidro; B - primeiro ramo trifolhado; C - seção do apice; D - folha primária; E - seção do caule; F - cotilédone; G - $C_3H_6O_3$; H - $BaCl_4O_3$; I - compressor.

A formação dos compostos radioativos na planta revela-se nos cromatogramas, por meio do Eastman Kodak Rontgenfilm, como apresenta A. A. Benson no "Papier Chromatografie" de Friedrich Cramer (1953).

Assim se torna possível verificar também a translocação do material radioativo na planta, fazendo-se radioautógrafos de radio cromatogramas obtidos com o tecido em análise ou então com o contador Geiger.

O radioautógrafo se obtém pela justaposição do cromatograma bidimensional ao "film" citado, observando-se as regras necessárias para isso.

Feito o radioautógrafo, observam-se manchas escuras dos compostos que serão identificados pelas suas posições.

Importante aplicação da cromatografia está no estudo dos antibióticos feitos em papel de filtro, sendo necessária certa umidade relativa na câmara cromatográfica, um período longo de deslocamento e um controle da temperatura.

4 — TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

4.1.. *Papel de filtro*

A cromatografia em papel de filtro se faz com diversos tipos de papel, dependendo da substância a analisar.

Kowkabany, 1950, estudando os diferentes tipos de papel, que podiam ser usados na separação de ácidos aminados, classificou-os, levando em consideração os seguintes fatores :

- 1) Grau de nitidez na separação;
- 2) Difusão de manchas;
- 3) Grau de formação de faixas, produzidas provavelmente pelas impurezas neles contidas;
- 4) Extensão da formação das caudas, dando origem a colorações diferentes com o reativo;
- 5) Desvio do deslocamento vertical;
- 6) Velocidade do solvente.

Vemos portanto que qualquer papel não se presta para a cromatografia, sendo necessário, na opinião de Rockland 1951, fazer-se um ensaio preliminar com os diferentes papéis em relação à textura, uniformidade e velocidade do solvente.

Mesmo não podendo predizer o tipo de papel para a análise deste ou daquele composto, Rockland (1951) classificou-os nos seguintes tipos :

- a) Papel liso;
- b) Papel meio áspero;
- c) Papel áspero;
- d) Papel muito áspero.

Rockland (1951) observou a velocidade de deslocamento, a nitidez das manchas, pulverizando o papel com o reativo especial da substância, como recomenda Kowkabany (1950).

Os tipos de papéis mais usados, de acordo com o solvente, temperatura e saturação, são na ordem decrescente de sua im-

portância, em relação à determinado solvente, da esquerda para a direita, os seguintes :

Whatman 3, Schleicher & Schuell 595, W 4 e W 1, para a colidina.

Whatman 3, S & S 595, 598, W 1 e W 4, para o fenol.

Schleicher & Schuell 589-faixa preta, 595, 598 e W 3 para o butanol.

Whatman 3, W 1, W 2, e S & S 602, para butanol-ácido fórmico.

Shleicher & Schuell 589-fita vermelha, fita azul, fita branca e W 1, para o butanol e amônia.

4.2. Solventes

São muitos os pares de solventes empregados na cromatografia em papel de filtro. No estudo dos ácidos aminados são usadas combinações de solventes tais como : fenol-colidina, lutidina-colidina, butanol normal-ácido acético, butanol normal-álcool benzílico, butanol terciário-ácido fórmico, óxido de mesitilo-ácido fórmico, etc.

Além desses pares de solventes, outras misturas são usadas tais como : butanol terciário-etilmetil cetona-ácido fórmico, butanol normal-butanol terciário-ácido clorídrico, butanol normal-monocloridrina de glicol-amoniaco, assim como misturas de alcoóis tais como : metanol, etanol, isopropanol, butanol secundário, álcool amílico, com quantidades variáveis de água, ácidos diluídos, amoniaco, etc.

4.3. Operação

A cromatografia em papel de filtro se faz da seguinte maneira : Introduce-se o solvente na cuba colocada no interior da manilha; saturada a câmara, pelos vapores do solvente, saturado com água, colocado no fundo da manilha, corta-se uma tira de papel de filtro de 2,5cm de largura e 6cm de comprimento, descreve-se um círculo de 0,5cm de diâmetro a 5cm de uma das extremidades. Nesse círculo coloca-se o material a ser analisado, com o auxílio de uma micropipeta graduada, cuja capacidade deve ser de 2,5 μ l a 5 μ l .

Quando se trabalha com ácidos amidos, a gota pode ser de uma solução contendo uma mistura dos mesmos, puros, ou de um hidrolizado de proteína, devendo conter aproximadamente 40mcg da mistura. Se houver necessidade de uma concentração maior, deixa-se secar a primeira gota e se coloca uma nova

quantidade da substância. Se se trata de hidrolizado ácido de proteína, submete-se a tira aos vapores de amoníaco, para neutralizar a acidez e em seguida ao vapor d'água para uma necessária hidratação; introduz-se a extremidade mais próxima à substância no solvente orgânico, parcialmente miscível com a água, contido no cuba, apoiada em suportes, no interior da manilha de barro ou proveta de vidro, cuja parte superior é hermeticamente fechada. O papel não deve tocar nos bordos do recipiente que contém o solvente ou em qualquer parte da manilha, mantendo-se o mesmo suspenso por um bastonete horizontal, de vidro, para se ter um deslocamento uniforme.

O solvente se desloca lentamente, por capilaridade, ao longo do papel, passando pelo local onde está o composto ou a mistura de compostos, iniciando-se assim o desdobraimento.

A velocidade de deslocamento deverá ser de mais ou menos 2cm por hora, dependendo entretanto da temperatura, textura do papel, do solvente usado e da saturação da câmara cromatográfica, pelos vapores do solvente.

Se os compostos são coloridos, como os pigmentos das plantas, pode-se observar o deslocamento; o solvente caminha à frente e os compostos caminham atrás, com velocidades diferentes, distribuindo-se ao longo da tira de papel.

No desenvolvimento cromatográfico, a água dissolve quantidades diminutas dos componentes da mistura tendendo a retê-los e o solvente orgânico se desloca tendendo a arrastar as substâncias, resultando daí um fator de separação, isto é, um coeficiente de partição da substância em relação à água e o solvente orgânico que caminha.

A velocidade de deslocamento de cada substância é uma função desse coeficiente de partição o qual é expresso pelo quociente da relação entre a concentração do soluto na fase não móvel representada pela água e a concentração na fase móvel que é o solvente orgânico. Assim, para haver uma separação entre os componentes de uma mistura, cada um deve ter uma afinidade diferente para com a celulose ou então solubilidades relativas diferentes no solvente orgânico e na água.

Se um dos componentes for extremamente solúvel no solvente orgânico, possuindo uma afinidade de adsorção relativamente pequena para a celulose, êle tende a caminhar rapidamente, com uma velocidade quase igual a do solvente.

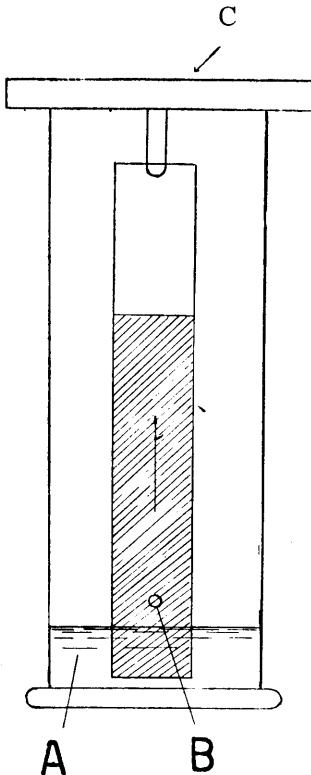
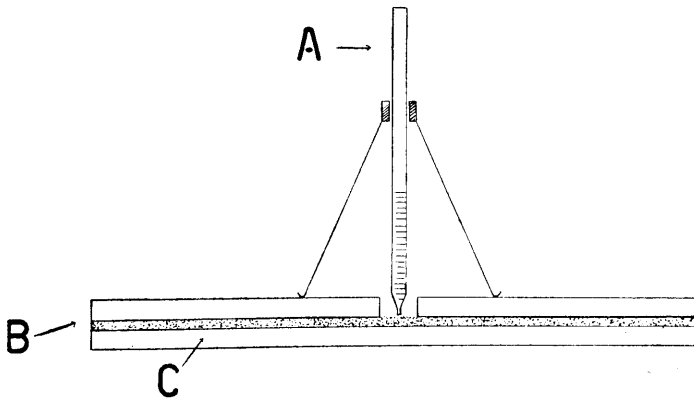


Fig. 6 — A - papel de filtro; B - solvente; C - placa de vidro.

Os compostos com grande afinidade de adsorção para com a celulose e muito solúveis em água tendem a se deslocar muito lentamente. Quando as substâncias possuem os mesmos coeficientes de partição, haverá uma superposição das mesmas, o que se pode verificar depois de revelado o cromatograma.

Torna-se necessário fazer correr um solvente, deixar secar o papel ao ar ou na estufa, a uma temperatura conveniente, fazendo correr outro solvente, perpendicularmente. Se houver necessidade faz-se correr um terceiro solvente.

Os dispositivos usados na cromatografia, em papel, são os mais diversos, desde as manilhas de barro até as modernas câmaras para deslocamento ascendente, descendente, assim como discos e tiras de vidro, entre os quais se prende o papel, para o deslocamento horizontal. (Figuras 6, 7 e 8).



Fi. 7 — A - pipeta; B - papel de filtro; C - placa de vidro

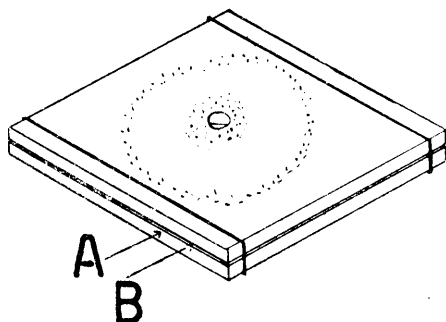


Fig. 8 — A — placa de vidro; B — papel de filtro.

4.4. Identificação

A identificação da substância torna-se mais fácil quando a mesma é colorida como os pigmentos vegetais e animais, etc.

Quando se trata de substâncias incolores, lança-se mão dos diversos meios para torná-las visíveis tais como:

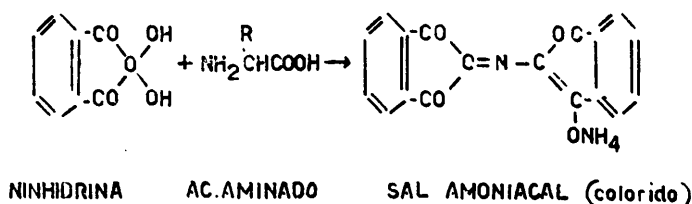
- a) Tratamento do papel com o reativo da substância;
- b) Observação da fluorescência produzida pela irradiação ultravioleta;
- c) Observação do efeito das várias partes do papel, na proliferação de microorganismos.

4.4.a. Decorridas 10, 15, 20 horas ou mais de deslocamento do solvente, conforme a necessidade, retira-se o papel da câmara e se assinala o ponto final do deslocamento do mesmo.

Seca-se o papel, ao ar ou na estufa à temperatura de 35, 50 ou 100°C., dependendo isto do composto formado e em seguida pulveriza-se o mesmo com o reativo da substância, em solução aquosa, alcoólica, ácida ou alcalina. Um novo aquecimento dará origem às manchas correspondentes aos compostos distribuídos pelo papel.

Para os ácidos aminados pulverizamos com uma solução 0,2% de ninhidrina em butanol normal.

A ninhidrina é um corpo de constituição tricetônica e foi indicada por Ruhemann (1910), como composto doador de oxigênio e que reagindo com os ácidos aminados dá origem, pelo aquecimento, a compostos de coloração intensa variável, amarela, vermelha, violeta, azul, etc., após a transformação a seguir:



4.4.b. A localização dos compostos pode ser conseguida, pela fluorescência que os mesmos apresentam, quando submetidos a ação da irradiação ultra violeta.

4.4.c. Neste último caso o papel é colocado em lâminas de ágar, inoculadas com os vários microorganismos a serem examinados. Depois da incubação, pode-se notar que, na zona onde existem antibióticos, há uma inibição da proliferação dos microorganismos, na camada interna do ágar.

4.5. Determinação do *R_F* e coeficiente de partição

Quando se obtêm as manchas, contornam-se as mesmas para se determinar seus respectivos centros.

Conhecidas as distâncias do ponto de partida dos compostos até a frente das manchas e a distância percorrida pelo solvente, fácil se torna calcular o *R_f* para cada componente de uma mistura. (Fig. 9).

Portanto temos :

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pelo composto}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} = \frac{a}{b}$$

O *R_f* pode ser igual ou muito próximo entre dois compostos, havendo em consequência disso, uma superposição dos mesmos, como já foi dito, o que se nota depois de revelado o cromatograma. No caso de superposição, ao invés de fazer cromatograma bi-dimensional pode-se fazer também uni-dimensional empregando-se diferentes alcoóis em diferentes concentrações, como apresenta Robert R. Redfield e E. S. Guzman Barron (1952), em sua análise de ácidos aminados. Isto tem a vantagem de evitar o efeito de solventes muito tóxicos, um quais é a colidina, e o aparecimento de manchas estranhas no cromatograma.

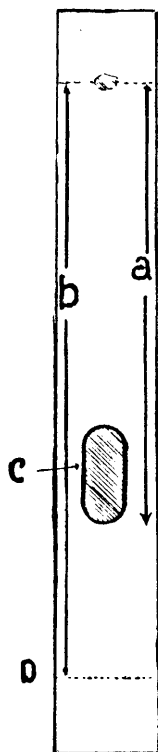


Fig. 9 — A - distância percorrida pelo composto; B - distância percorrida pelo solvente; C - mancha.

O Rf depende da quantidade de água contida no solvente, temperatura, textura do papel etc. Se a substância a analisar é solúvel em água o Rf cresce com o acréscimo da mesma. Esse tempo também varia com a mudança da temperatura quando os solventes são completamente miscíveis com a água.

O termo Rf foi introduzido por Consden e outros, os quais demonstraram que a teoria desenvolvida para as colunas podia ser aplicada à cromatografia em papel de filtro calculando-o em função do R usado por le Rosen, e o qual expressa a relação entre o movimento do máximo de concentração do soluto e o movimento simultâneo do solvente orgânico. Baseando-se em dados experimentais deduziram o coeficiente de partição α para os ácidos aminados em relação à água e o solvente, a partir da seguinte relação :

$$Rf = \frac{R A1}{A} = \frac{A1}{A1 + \alpha As} \quad \text{onde :}$$

A = área da secção transversal do papel + água + solvente.

A1 = área da secção transversal do solvente.

As = área da secção transversal da fase aquosa.

α = coeficiente de partição = concentração do soluto na fase aquosa/concentração no solvente.

$$Rf = \frac{A1}{A1 + \alpha As}$$

$$\therefore R_f = \frac{A_1}{A_1 + a A_s}$$

$$R_f (A_1 + a A_s) = A_1$$

$$R_f A_1 + R_f a A_s = A_1$$

$$\therefore R_f a A_s = A_1 - R_f A_1$$

$$\therefore a = \frac{A_1 - R_f A_1}{R_f A_s} = \frac{A_1}{R_f A_s} - \frac{A_1}{A_s}$$

$$\therefore a = \frac{A_1}{A_s} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right) \quad (a)$$

$\frac{A_1}{A_s}$ é a relação entre os valores do solvente orgânico e o da fase aquosa, no cromatograma.

A quantidade de água foi determinada pela diferença entre o peso do papel seco e o peso do papel depois de correr o cromatograma.

Considerando-se que a celulose retém 22% de água em relação ao papel seco, pode-se calcular o peso do solvente. Daí temos a relação acima (a), em função do peso da água e do solvente.

Consden e seus colaboradores (1944) puderam assim determinar os coeficientes de partição dos compostos, como os ácidos aminados, comparando com aqueles obtidos diretamente por England e Cohn (1935) e cuja concordância indicava que o papel não interferia na determinação desse coeficiente. A seguir temos uma relação dos valores R_f para os ácidos aminados em relação ao fenol e butanol-ácido acético-água.

Butanol-Ac. Acético-Água

Ácidos aminados	R_f
Glutationa	0,05
Cisteína	0,07
Cistina	0,08
Acido α γ diamino butírico	0,12

Lisina	0,14
Ornitina	0,15
Asparagina, taurina	0,19
Histidina, arginina	0,20
Histamina, glicil-glicina	0,22
Acido aspártico, dioxifenilalanina	0,24
Citrulina	0,25
Glicina	0,26
Serina	0,27
Homoserina, oxiprolina, ac. glutâmico	0,30
Treonina	0,35
Balanina	0,37
Alanina	0,38
Prolina	0,43
Tirosina, ac. γ amino butírico	0,45
Ác. α amino isobutírico	0,48
Triptofano, ác. α amino butírico	0,50
Metionina	0,55
Valina	0,60
Norvalina	0,65
Trimetilalanina (neo-leucina)	0,66
Fenilalanina	0,68
Diodotirosina	0,70
Isoleucina	0,72
Triptamina, leucina	0,73
Norleucina	0,74
Kinurenina	0,76
Ác. α amino caprílico	0,85
Ac. hipúrico	0,93

Fenol

Acido aspártico	0,07
Cistina	0,08
Acido glutâmico	0,16
Cisteina	0,19
Serina	0,24
Acido α γ diamino butírico, glutationa	0,25
Ornitina	0,27
Asparagina, taurina	0,29
Glicina, dioxifenilalanina	0,30
Treonina, glicil-glicina, lisina	0,39
Arginina	0,41
Kinurenina	0,43

Homoserina	0,47
Histamina, tirosina	0,52
Alanina, Balanina, histidina	0,55
Citrulina	0,56
Oxiprolina	0,59
Valina	0,64
Acido α amino butírico	0,65
Triptofano	0,66
Acido α amino isobutírico	0,68
Metionina, norvalina	0,73
Acido α amino caprílico	0,74
Acido hipúrico	0,75
Acido γ amino butírico, fenilalanina	0,78
Leucina, iso-leucina	0,79
Diidotirosina	0,80
Trimetilalanina (neoleucina)	0,81
Norleucina	0,84
Triptamina, prolina	0,85

4.6. *Determinação Quantitativa*

Obtendo-se as manchas correspondentes aos compostos, pode-se determinar quantitativamente os mesmos, uma vez que se acham completamente separados.

Como se trata de um método que nos permite a purificação, determinação da pureza e caracterização imediata das substâncias, contribuindo para a pesquisa dos fatores de crescimento, das vitaminas, assim como muitos antibióticos atualmente usados, logo se pensou nas determinações quantitativas, para as quais foram propostos diversos métodos já aplicados por vários autores à determinação de ácidos aminados, segundo os seguintes princípios:

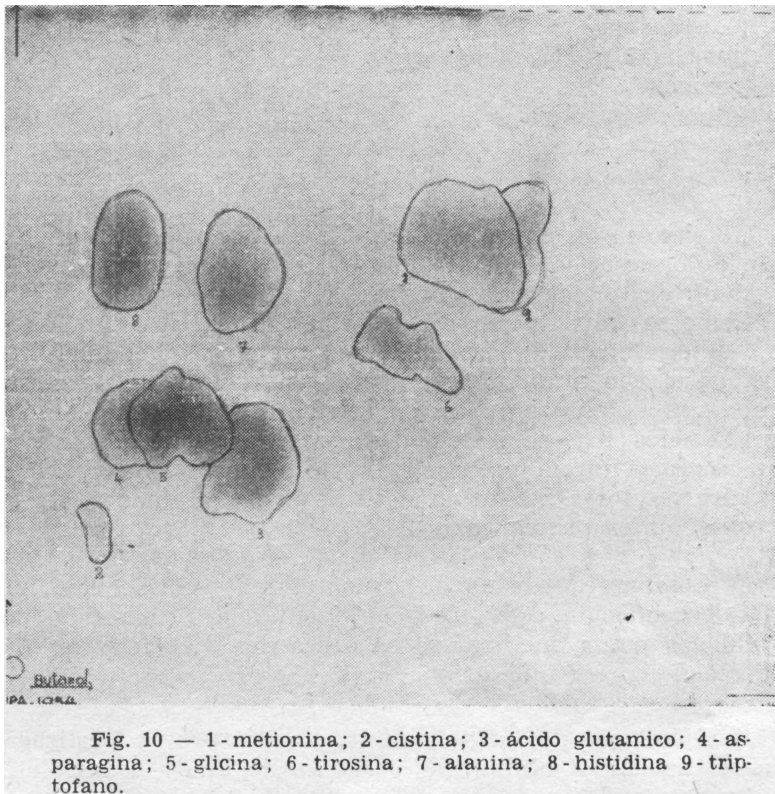
1) Comparação direta do cromatograma, obtido com material desconhecido, com outro com quantidades conhecidas das substâncias puras, medindo-se as áreas das manchas obtidas pela reação com a ninhidrina.

2) Dissolução dos ácidos aminados após prévia localização pela reação com a ninhidrina, reagente de Pauly, isatina etc., e subsequente determinação pelo micro Kjeldahl, titulação pelo ácido acético glacial, determinação dos complexos de cobre, pela colorimetria, titulação iodométrica ou determinação polarográfica, popirografia de alta tensão, etc.

3) Método da diluição isotópica, usando-se ácidos aminados marcados.

4) Medida das áreas das manchas provenientes da reação com a ninhidrina, relacionando-se com as áreas obtidas de quantidades conhecidas das substâncias puras, em cromatograma corrido paralelamente, empregando se a fórmula :

$$\log \frac{ul}{sl} = \frac{(U1 + U2) - (S1 + S2)}{(U1 - U2) + (S1 - S2)} \log K$$



onde s1 e s2 são quantidades conhecidas e u1 e u2 são desconhecidas. As áreas S são conhecidas e as áreas U desconhecidas.

As relações $\frac{S1}{S2}$ e $\frac{U1}{U2}$ nos dão a constante K. Isto se baseia em que a área da mancha é proporcional ao logaritmo da concentração da substância empregada.

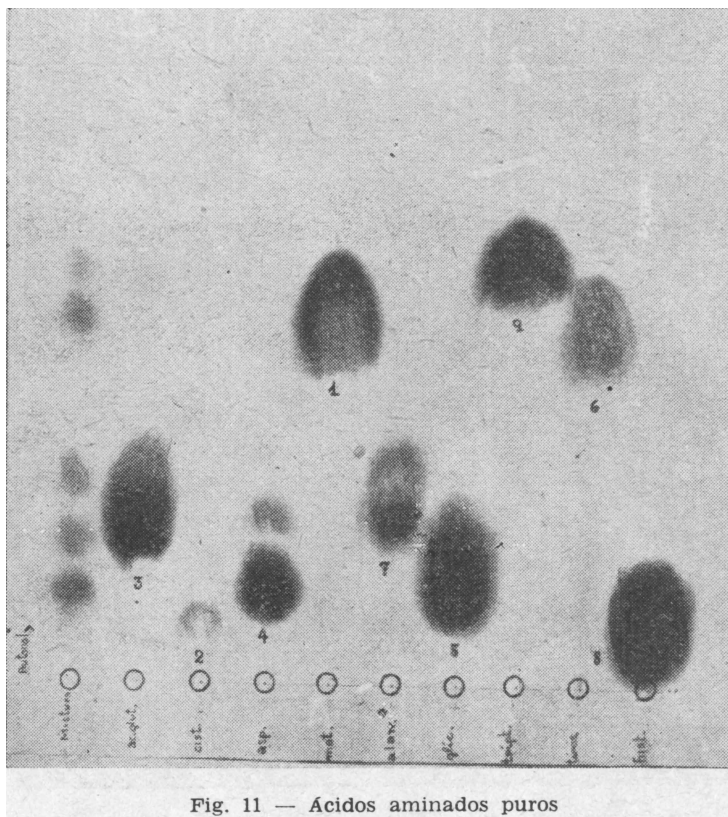


Fig. 11 — Ácidos aminados puros

5) Fotometrica direta dos ácidos aminados previamente coloridos com ninhidrina, método empregado para cromatogramas uni e bi-dimensionais, usando-se o densitômetro, com diafragma ajustável para atender à variação das áreas das manchas. O densitômetro nos dá a porcentagem de transmissão da luz através da mancha, isto é, a densidade ótica que, relacionada com a área, nos fornece o teor da substância. Para o uso do densitômetro é inconveniente o emprêgo de solventes tais como

fenol, colidina, lutidina, Obtem-se melhor resultado nos cromatogramas uni-dimensionais feitos com os alcoóis de baixo pêso molecular, anteriormente citados.

Para a cromatografia bi-dimensional de ácidos aminados podemos usar o fenol e butanol-ácido acético-água.

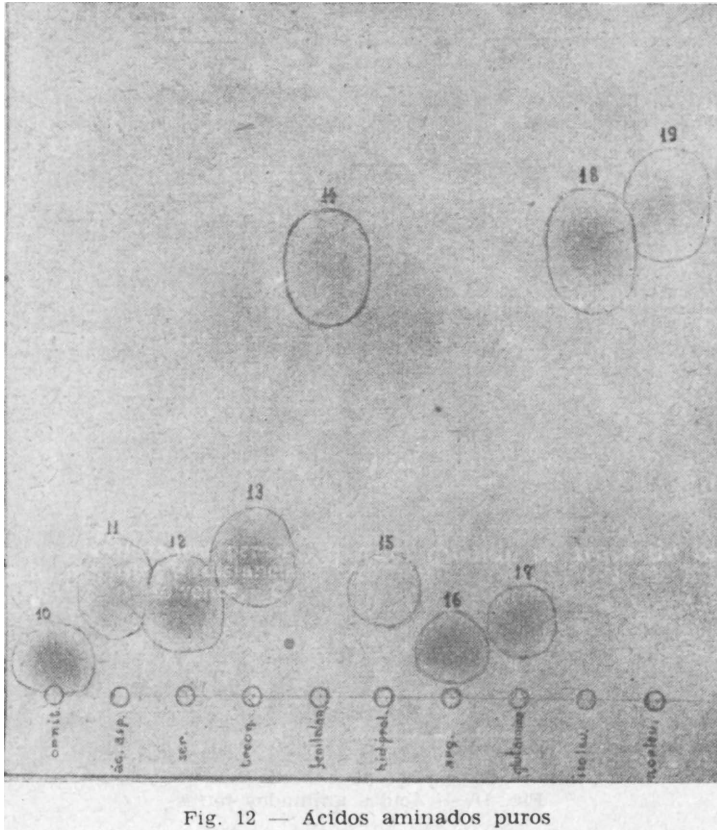


Fig. 12 — Ácidos aminados puros

O primeiro se prepara pela dissolução de 100 g de fenol, em cristais, em 20 ml de uma solução contendo 6,3% de citrato de sódio, 3,7% de fosfato monopotássico e 0,5% de ácido ascórbico. Agita-se em funil de decantação, separando-se a camada superior para a cromatografia. Para a conservação desse solvente pode-se manter na camara, um recipiente com uma solução de NaCN, 100 mg para 9 ml de água; o ácido cianídrico que se desprende retarda a decomposição do fenol.

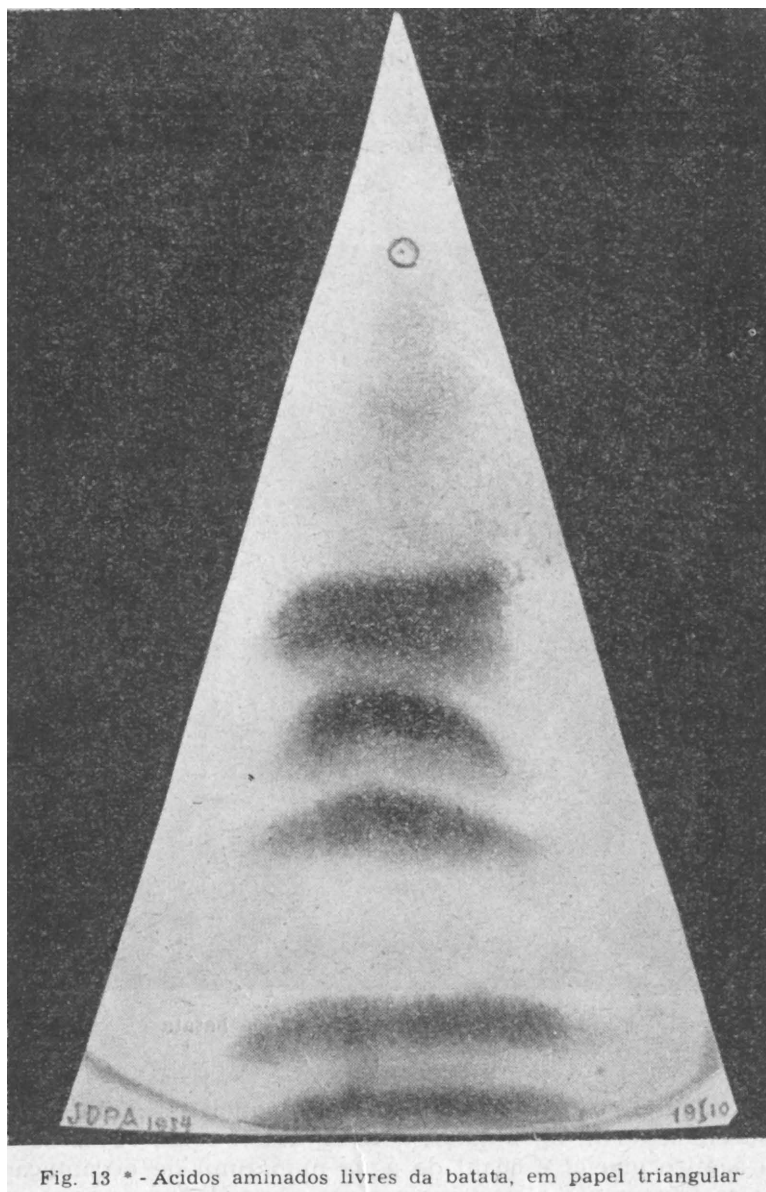


Fig. 13 * - Ácidos aminados livres da batata, em papel triangular

* Comunicação pessoal à VI Reunião Anual da S. B. P.C., Ribeirão Preto, 1954

Como se trata de substância perigosa, ao invés de NaCN usa-se 0,04% de hidroxiquinolina (Block, 1950) ou cupron, 0,1% (Fromageot, 1950) no solvente. No fundo da câmara deve-se colocar amoníaco 0,3%. As manchas serão menores, mais nítidas tornando-se mais interessante para a análise quantitativa.

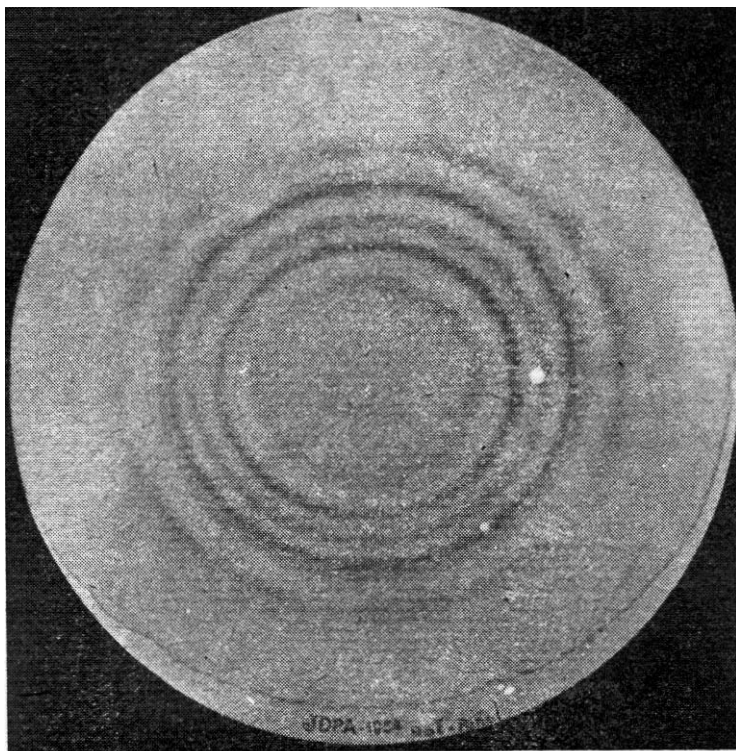


Fig. 14 — Ácidos aminados livres da batata

O segundo solvente se prepara da maneira seguinte: Introduzem-se 40 ml de butanol normal, assim como 10 ml de ácido acético glacial e 50 ml de água num funil de decantação, agita-se fortemente e se deixa em repouso até que se separem duas camadas. A camada superior, constituída pelo solvente orgânico saturado de água, é usada na barquinha e o inferior no fundo da câmara cromatográfica, destinada a manter sua

saturação. Esses dois tipos de solventes foram empregados em nosso laboratório para a cromatografia ascendente, descendente e horizontal, mono e bi-dimensional de uma mistura de ácidos aminados puros, contendo cistina, asparagina, histidina, glicina, metionina, tirosina, alanina, triptofano, (Figuras 10 e 11), ornitina, ácido aspártico, serina, treonina, fenilalanina, hidroxiprolina, arginina, glutamina, isoleucina, norleucina, (Figura 12) assim como os de hidrolizado de albumina do ovo, de tecido muscular de peixe, produtos farmaceuticos, empregando-se, para caracterizá-los, uma solução 0,2% de ninhidrina em butanol normal. As figuras 13* e 14 são cromatogramas de ácidos aminados livres da batata.

Os valores de Rf para cada ácido aminado, puro, nos cromatogramas, uni e bi dimensionais foram comparados com os da tabela na página anterior, transcritos do Papier Chromatographie de Friedrich Cramer, os quais foram colocados na ordem crescente.

5 — BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE, SYLVIA O., 1949 — Análise cromatográfica em papel de filtro de misturas de aminoácidos e hidrolisados de proteínas. *Ciência e Cultura* (S. Paulo) 1 (4): 183-190.
- BLOCK, RICHARD J., 1952 — *Paper Chromatography*, 195 pp., Academic Press Inc., Publ., New York.
- BLOCK, RICHARD S. and DIANA BOLLING, 1942 — *The determination of the amino acids*, 58 pp. (New York).
- BOULANGER, PAUL, GÉRARD BISERTE et RENÉ SCRIBAM, 1950 — *Application dela chromatografie de partage sur papier des acides amines a la chimie vegetale et a la chimie alimentaire*. VIIe. Cong. Inst. des Indus. Agric. Bruxelles), vol. II: 38-54.
- BRIMLEY, R. C. and F. C. BARRETT, 1953 — *Practical chromatography*, 128 pp. (London).
- CASSIDY, HAROLD GOMES, 1951 — *Adsorption and chromatography* 360 pp., Interscience Publ., Inc., New York.
- CRAMER, FRIEDRICH, 1953 — *Papier chromatographie*, 136 p., Verlag Chemie, CMBH., Weinheim-Bergstr.
- GRASMANN, W. und K. HANNIG, 1953 — *Trennung von Stoffgemischen auf Filtrierpapier durch Ablenkung im Elektrischen Feld*. Hoppe Seyler's Zeits. Physiol. Chem. (Berlin) 292 (1-2): 32-50.
- HAUROWITZ, FELIX, 1950 — *Chemistry and biology of proteins*, 374 pp., Academic Press, Inc., Public., New York.

- MACHABOEUF, M. et JUDITH BLASS, 1947 — Quelques Détails d'application de la methode microchromatophique des aminoacides de Consden, Gordon et Martin. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 73 (11): 1053-1065.
- MALAVOLTA, E., A. B. CARLTON, 1953 — Nota preliminar sôbre a distribuição do radiozinco no tomateiro. *Separata n. 189 dos anais da E. S. A. L. Q. (Piracicaba)* 10: 121-126.
- PARKER, DOREEN I., F. J. SOWDEN and H. J. ATKINSON, 1952 — The nitrogen distribution and amino acid content of certain soil organic matter fractions. *Scientific Agriculture (Ottawa)* (3): 163-169.
- REDFIELD, ROBERT R. and E. S. GUZMAN BARRON, 1952 — Quantitative determination of aminoacids, in protein hydrolyzates by paper chromatography. *Arch. Biophys. (New York)* 35 (2): 443-461.
- SLOTTA, K. e J. PRIMOSIGH, 1952 — A new method of quantitative paper chromatography. *Separata de Memórias do Instituto Butantan* 24 (2): 85-100.
- VERNON, LEO P. and S. ARONOFF, 1952 — Metabolism of Soybean leaves. IV. Translocation from soybean leaves. *Arch. Biochem. Biophys. (New York)* 36 (2): 383-398.
- VIANA, REGINA C. e C. R. DINIZ, 1951 — Composição em aminoácidos do quimotripsinogeno. *Separata de Ciência e Cultura (S. Paulo)*, (1): 38-39.
- WILLIAMS, TREVOR I., 1953 — *Introduccion a la cromatografia*, 116 pp., (Barcelona).
- WILLIAMS, R. T., R. L. M. SINGE, 1950 — *Partition Chromatography*. *Biochemical Society Simposia*, n. 3, 103 pp. Cambridge University Press (London).
- ZECHMEISTER, L., 1950 — *Progress in Chromatography*, 368 pp. London.
- ZECHMEISTER, L. and L. CONOLKY, 1950 — *Principles and Prattice of Chromatography*, 260 pp. (London).