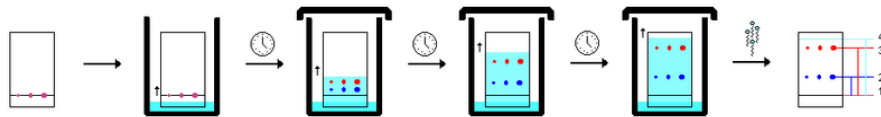


Cromatografia em camada fina e Metilação

Cromatografia em camada fina



As diferentes classes lipídicas presentes nos lípidos totais, extraídos do material vegetal, são separadas por cromatografia em camada fina (Thin Layer Chromatography, TLC). A mistura de solventes (clorofórmio / metanol / acetona / ácido acético / água; 25:5:10:5:2, em volume) permite a separação dos lípidos polares (fosfolípidos e galactolípidos) que se posicionarão na fase estacionária de acordo com a sua solubilidade na fase móvel. Os lípidos de reserva e os ácidos gordos livres, pouco abundantes em folhas e em mitocôndrias, migram na frente do solvente.

Procedimento:

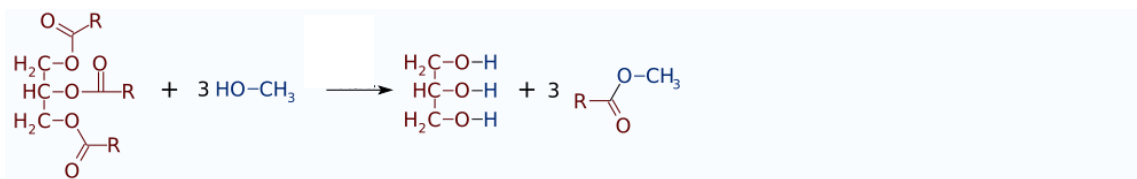
Aplicar, com um capilar, 90 % do volume do extracto dos lípidos totais a 2 cm da margem inferior de uma placa de Silica gel (G 60), sob a forma de vários “spots” formando uma fina banda. Deixar evaporar o solvente. Aplicar de forma semelhante ~15 µL de um dos standards fornecidos (fosfatidilglicerol, cardiolipina ou triacilglicerol). Colocar as placas na tina de cromatografia e fechar bem.

Após a separação (~1h), marcar a frente de migração e deixar secar a placa. Pulverizar com primulina (0,1 % em acetona 80%) e observar sob luz UV. Delimitar as bandas observadas a lápis e proceder à sua identificação de acordo com os Rf.

Nota: Aplicar em cada placa amostras de dois grupos.

Nota: O factor de retenção (Rf) calcula-se dividindo o valor da distância percorrida por uma determinada substância sobre a distância total percorrida pela fase móvel.

Metilação



A análise qualitativa e quantitativa dos ácidos gordos presentes nos lípidos totais (ou nas diferentes classes lipídicas separadas por TLC) é realizada por cromatografia gasosa (GC). Para tal é necessário proceder à saponificação dos lípidos (clivagem dos ácidos gordos do glicerol) e à metilação dos ácidos gordos, de modo a obter os esteres metílicos (Fatty Acid Methyl Esters, FAME). Ambos os processos são realizados em simultâneo por reacção com metanol e ácido sulfúrico.

Procedimento:

Transferir 10 % do volume do extracto dos lípidos totais para um tubo de vidro e adicionar 20 µg de ácido margárico (heptadecanoato, C17) que funcionará como padrão interno. Após secagem sob corrente de azoto adicionar 3 mL de metanol sulfúrico (39:1, v/v). A reacção decorre a 70 °C durante 1 hora e é terminada por arrefecimento dos tubos numa tina com água fria. Os esteres metílicos resultantes são recuperados por adição de 3 mL de éter de petróleo e 2 mL de água ultrapura, seguindo-se uma passagem ao vortex e centrifugação. A fase superior é recolhida para um novo tubo e após secagem a 50 °C, sob atmosfera de azoto, os FAME são ressuspensos em 50 µL de etanol / tolueno e conservados a -20°C até análise posterior por GC.