



Uso da Casca De Ovo Como Fase Estacionária Alternativa Em Cromatografia Líquida No Ensino De Ciências

*Use of eggshell as an alternative stationary phase for classical liquid column
chromatography*

Pedro Henrique Fonseca Veloso¹
Veronica de Melo Sacramento²
Vanessa de Andrade Royo³

RESUMO

Objetivo: realizar a cromatografia líquida clássica em coluna usando como fase estacionária a sílica, e como material alternativo cascas de ovos pulverizadas. **Metodologia:** trata-se de pesquisa investigativa, na qual foi testada um material alternativo para o preenchimento da coluna cromatográfica clássica. Para análise da capacidade de adsorção e eluição do material, utilizou-se o extrato de *Tradescantia pallida purpúrea* (Rose). **Resultados:** A separação dos pigmentos vegetais na eluição ocorreu de forma homogênea tanto na sílica quanto na casca de ovo. Foram coletadas 14 frações da coluna com sílica e 16 da coluna com cascas de ovos, no qual supõe a separação de antocianinas, carotenoides e clorofilas, respectivamente. O material alternativo é composto por carbonato de cálcio, mesmo composto utilizado no desenvolvimento da técnica. **Conclusão:** A atividade realizada focou-se na utilização de uma fase estacionária alternativa que além de ser de fácil acesso, constitui-se de resíduo doméstico que não gera custos na obtenção. Assim, é viável o uso de casca de ovo

¹ Mestrando em Biotecnologia. pedrofonsecambc@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2802-1244>, Universidade Estadual de Montes Claros. Montes Claros, Minas Gerais – Brazil.

² Doutoranda em Biotecnologia. veronica.sacramento.2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5956-1457>. Universidade Estadual de Montes Claros. Montes Claros, Minas Gerais – Brazil.

³ Docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, vanroyo31@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4842-3569>. Universidade Estadual de Montes Claros. Montes Claros, Minas Gerais – Brazil.

Recebido em	Aceito em	Publicado em
12-06-2023	12-09-2023	21-04-2024

pulverizada como enchimento (fase estacionária) em práticas de cromatografia em coluna, para demonstração de separação de pigmentos.

Palavras-chave: Cromatografia; Folhas de Planta; Pigmentos; Casca de Ovo.

ABSTRACT

Objective: Perform classical liquid chromatography in a column using silica as a stationary phase, and as an alternative material pulverized eggshells. **Methodology:** this is investigative research, in which an alternative material for the filling of the classical chromatographic column was tested. To analyze the adsorption and elution capacity of the material, the extract of *Tradescantia pallida purpura* (Rose) was used. **Results:** The separation of plant pigments in elution occurred homogeneously in both silica and eggshell. We collected 14 fractions of the column with silica and 16 of the columns with eggshells, which supposes the separation of anthocyanins, carotenoids and chlorophylls, respectively. The alternative material is composed mostly of calcium carbonate, the same compound used to develop the technique. **Conclusions:** The activity focused on the use of an alternative stationary phase that, in addition to being easily accessible, consists of domestic waste that does not generate costs in obtaining. Thus, it is feasible to use pulverized eggshell as filling (stationary phase) in column chromatography practices, to demonstrate pigment separation.

Keywords: Chromatography; Plant Leaves; Pigments; Egg Shell.

INTRODUÇÃO

No Brasil o ensino é regido pela Base Nacional Comum Curricular (BNCC) que normatiza o conjunto de aprendizagens que devem ser desenvolvidas pelos alunos durante as etapas da educação básica. No que tange a área de Ciências da Natureza e suas Tecnologias o documento esclarece a importância dessa área para o desenvolvimento científico e intelectual dos discentes, e parte desta articulação vem acompanhada de atividades capazes de exemplificar

as transformações, como práticas ou atividades experimentais. No ensino de ciências a experimentação é uma importante ferramenta para a construção de uma aprendizagem de cunho significativo e integrador, no qual é possível elucidar as mais diversas áreas que constroem o ensino de ciência, bem como os processos e eventos que ocorrem no cotidiano². Possibilita as interações entre o discente e a ciência por meio dos processos químicos, físicos e biológicos essenciais para a vida. Trabalhar a partir dessas reflexões, é essencial para a fundamentação de atividades práticas, que possuam a capacidade de despertar e desenvolver o protagonismo do discentes, e por consequência otimizar o processo de aprendizagem.

Se tratando do ensino de Biologia a lacuna existente entre a teoria e a prática é visível especialmente na dificuldade de relacionar o conteúdo científico com o mundo à sua volta, uma vez que os temas abordados podem ser complexos e fogem da realidade dos discentes³. Essa observação é possível em todas as disciplinas que compõem o quadro das ciências da natureza, taxadas como difíceis, isso pela abstração do conteúdo, os cálculos envolvidos no processo de aprendizagem⁴, e as nomenclaturas utilizadas pelas ciências de forma geral⁵. Outro ponto recorrente é a defasagem ou ausência de conhecimento anterior, o que justifica a falta de conhecimento específico e o baixo interesse nos assuntos relacionados as manifestações da vida.

Desse modo, as atividades práticas conceituadas com elementos presentes no cotidiano são essenciais para o desenvolvimento do conhecimento científico, agregando pontos positivos no que tange a educação. Dentro da escola, o laboratório é o espaço que exerce funções importantes para o aluno, seja pela observação ou para o desenvolvimento intelectual, na contemplação de atividades ou nos diálogos em sala⁸. Isso é, possuem a capacidade de aproximar os alunos conteúdos mais complexos, possibilitando o entendimento de conceitos teóricos de forma mais sólida e organizada⁹.

Alguns experimentos são capazes de promover a separação de substâncias presentes em extratos vegetais, como os pigmentos. A cromatografia classificativa em coluna é um ensaio analítico, desenvolvido por Michael Semenovich Tswett em 1903 que consiste no uso de uma fase estacionária e uma móvel que fraciona substâncias de acordo com a polaridade das moléculas. A coluna é preenchida com material adsorvente como sílica, carbonato de cálcio, óxido de alumínio e outros, em conjunto com a amostra e o solvente que por meio de interações

são capazes de separar substâncias⁸. O experimento de Tswett consistiu em separar pigmentos de extratos vegetais⁹. Nesse processo o pesquisador identificou os processos da separação como adsorção e posteriormente introduziu a palavra cromatografia na ciência¹⁰.

A cromatografia em coluna é uma técnica amplamente utilizada, é um método físico-químico, empregado em diversas indústrias, como a farmacêutica e química. Tem sua utilização no processo de separação, isolamento e purificação de substâncias. Permite a utilização de mistura de solventes (fase móvel) direcionado a extração de classes de substâncias, ou solventes de carregamento geral da amostra¹¹.

Deste modo, esse trabalho vem explorar as possibilidades da cromatografia, que em contextos educacionais se faz uma ferramenta investigativa, capaz de chamar atenção dos alunos, bem como instigar a curiosidade. Se tratando do contexto educacional, utilizar materiais da realidade dos alunos pode aproximá-los das atividades e fazer que tenham maior interesse. Focado nesse aspecto e nas características físicas e químicas da casca de ovo, aqui utilizada como fase estacionária, rica em carbonato de cálcio. Composto já usado na separação de pigmentos vegetais¹². O trabalho justifica-se na necessidade de investigação de material alternativo a sílica, de fácil aquisição e baixo valor agregado para realização de práticas em escolas ou ambientes educacionais que não contam com esse material.

O objetivo deste trabalho é descrever uma metodologia alternativa de cromatografia líquida clássica em coluna para separação de pigmentos, utilizando casca de ovo como fase estacionária, que possa ser mais barata e de fácil utilização em práticas laboratoriais do ensino de ciências.

METODOLOGIA

Obtenção do Material Vegetal

Para realização do experimento foi utilizado extrato de *Tradescantia pallida* purpúrea (Rose) conhecida popularmente como trapoeraba-roxa ou coração-roxo, classificada como herbácea, originária da América do norte, foi introduzida no Brasil como planta ornamental, comumente encontrada em ambientes urbanos¹³. A espécie apresenta compostos promissores

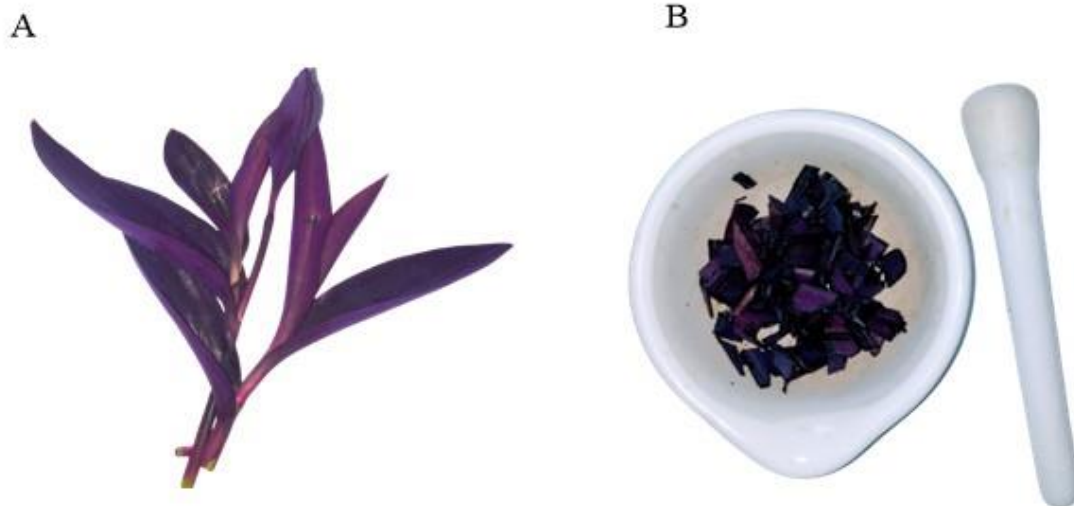
nas mais diversas áreas, como farmacêuticas e químicas¹⁴. Sabe-se que nas folhas são encontrados pigmentos, como clorofilas, carotenos e antocianinas¹⁵.

Foram coletados galhos e folhas sem sinais de herbivoria da espécie *Tradescantia pallida* purpúrea (Rose) (Figura 1) ao final do mês de outubro de 2022, no município de Montes Claros – MG/Brasil, nas dependências da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes (coordenadas -16.71859124853548, -43.87873149383716). Em local de jardinagem com alta incidência de luz, poda e irrigação frequentes.

Obtenção do Extrato Vegetal

Para o preparo do extrato quatro folhas limpas, grandes, espessas e frescas (aproximadamente 5 g) de *Tradescantia pallida* purpúrea (Figura 1.A) foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Posteriormente foram fragmentados com auxílio de tesoura, para o aumento da superfície de contato, para facilitar o processo de maceração e extração dos compostos, (Figura 1.B).

Figura 1: Folhas e material vegetal fragmentado para o processo de maceração



Legenda: 1.A - Folhas de *Tradescantia pallida* purpúrea (Rose) e 1.B- Material fragmentado para a maceração

Fonte: Autores

As folhas foram colocadas em almofariz com 10 mL de álcool etílico 70% e em seguida maceradas com auxílio de pistilo por 10 minutos até a extração dos pigmentos vegetais. Reservou-se o sobrenadante obtido.

Preparo das Colunas Cromatográficas

Utilizou-se coluna cromatográfica nas dimensões de 1,5 cm de diâmetro por 30 cm de altura com capacidade para 100 mL. Antes do empacotamento as colunas foram ambientadas com álcool etílico 70%.

Para a cromatografia com as cascas de ovos: primeiro realizou-se o preparo das cascas, com 40 g de cascas de ovos, sem película/membrana, pulverizadas, lavadas com ácido acético e posteriormente neutralizadas com hidróxido de amônio até pH 7. Após a neutralização, as cascas foram novamente lavadas em água destilada, autoclavadas e secas. A etapa da autoclavagem não é essencial para realização da utilização das cascas de ovos, desde que tenham uma mesma origem, caso contrário recomenda-se a autoclavagem ou emprego de algum método térmico a fim de esterilizar as cascas evitando contaminação da amostra. A suspensão foi preparada com 40 g das cascas de ovos pulverizadas em 40 mL de álcool etílico.

Para a cromatografia com sílica: a suspensão foi preparada com 10 gramas de sílica e 40 mL de álcool etílico. Durante o empacotamento a estratégia adotada para que a sílica não saísse pela torneira da coluna, foi a introdução um pequeno chumaço de algodão com auxílio de um bastão de vidro até a parte anterior da torneira. Fazendo-se assim uma contenção da fase estacionária.

Nos dois casos o preparo do enchimento da coluna, o material (cascas de ovos/sílica) foi suspenso em 40 mL de álcool etílico 70° INPM e homogeneizado utilizando bastão de vidro por cinco minutos para a eliminação das bolhas de ar ou foi utilizado banho ultrassônico por dez minutos.

Com auxílio do bastão de vidro, foi vertida a suspensão para o interior da coluna, e com o bastão de plástico foi promovida pequenas batidas para a deposição do material sem formação de bolhas de ar. Foi aberta a torneira da coluna deixando que a fase móvel gotejasse para o béquer, até que toda a fase estacionária (suspensão de cascas de ovo/sílica) esteja devidamente empacotada (compactada) na coluna. Foi mantida atenção para que o solvente não chegue ao nível mínimo de 1cm acima do material.

Por fim, foi adicionado 1,5 mL do extrato vegetal obtido a coluna para a incorporação mais rápida nas fases estacionárias, e após aderido, iniciou-se a eluição com etanol 70%.

Eluição

Com as colunas empacotadas, foi adicionado 2 mL do extrato de *Tradescantia pallida purpúrea* (Rose) de forma cautelosa ao centro da coluna, para que ocorresse a aderência do extrato a sílica, possibilitando a eluição homogênea dos pigmentos presentes no extrato (Figura 2.A). Em seguida foi adicionado o etanol 70% como eluente (fase móvel), posteriormente foi iniciado a eluição. Foram coletadas da coluna empacotada com sílica 14 frações, e na coluna empacotada com casca de ovo 16 frações, em ambos os métodos foram coletadas frações contendo aproximadamente 2 mL do pigmentos carregados com etanol. A análise das frações foi realizada de forma visual, uma vez que os pigmentos vegetais podem ser ver visualizados a olho nu, sem necessidade de uso de luz ultravioleta ou de reagentes reveladores.

Optou-se pelo uso do álcool etílico como único solvente para a eluição devido a acessibilidade e valor, uma vez que a introdução de dois ou mais solventes acarretaria maior custo para a realização da prática

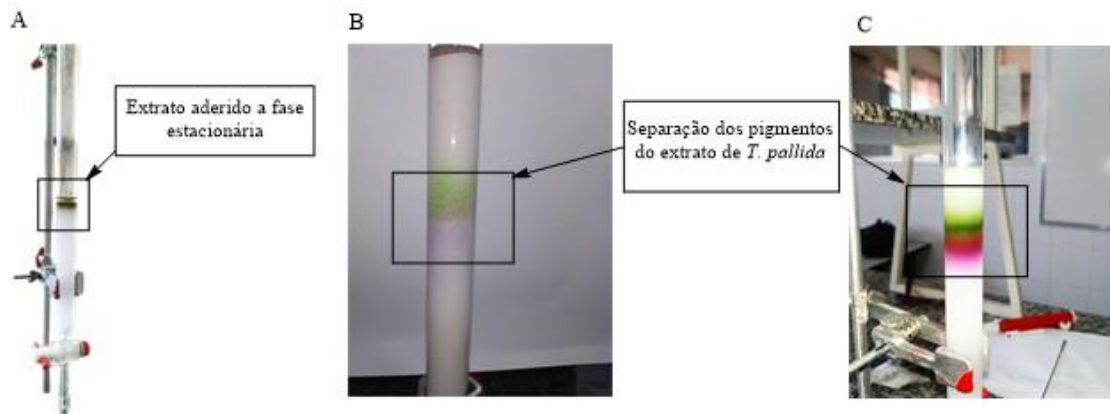
RESULTADOS

O empacotamento da coluna foi feito de forma que as fases estacionárias fossem distribuídas de forma homogênea pela coluna, permitindo assim maior eficiência durante a separação das substâncias. Após a aplicação do extrato de *Tradescantia pallida purpúrea* (Rose) na coluna e o início da eluição, os pigmentos presentes no extrato vegetal foram carregados pelo solvente, formando barras coloridas ao longo da fase estacionária. Pode ser observado que a coluna empacotada com casca de ovo permitiu a formação de bandas dos pigmentos separados, como na coluna de sílica, embora a intensidade dos pigmentos e a fina definição não tenha acontecido (Figura 2.B e 2.C).

Eluição da coluna preenchida com cascas de ovos

Foram coletadas frações de aproximadamente 2 mL em 16 tubos de ensaio, nos quais foi possível observar a separação dos pigmentos presentes no extrato. Os tubos coletados

Figura 2: Extrato aderido à sílica e separação dos pigmentos presentes no extrato vegetal.



Legenda: 2.A- Extrato aderido à sílica. 2.B- fase estacionária feita de cascas de ovos. 2.C- fase estacionária de sílica.

Fonte: Autores

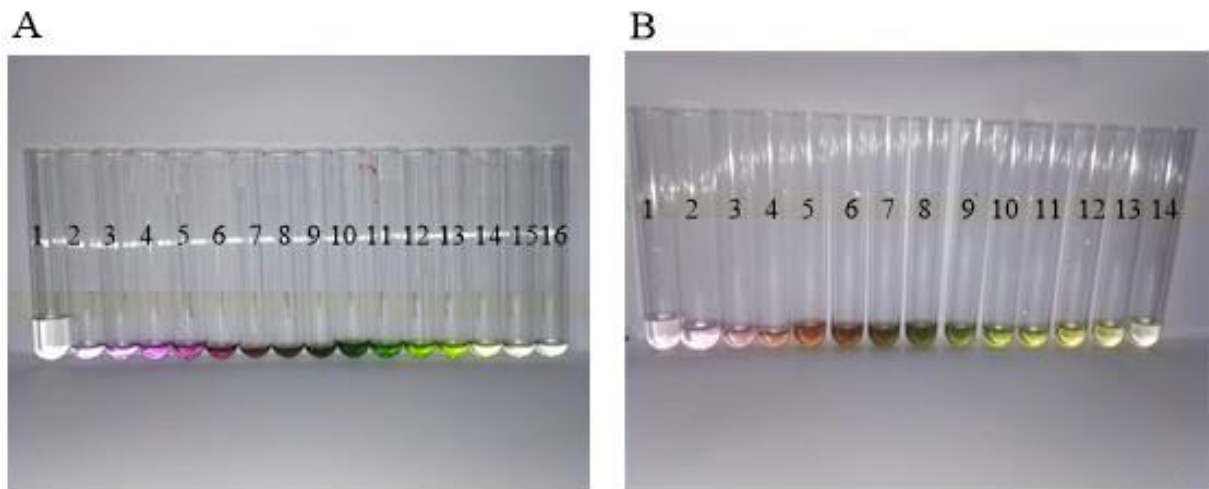
continham respectivamente: um incolor, dois a cinco tem coloração rosa, característica das antocianinas¹⁶, as frações de seis a oito apresentam uma cor róseo-alaranjada contendo carotenoides¹⁷ e nas frações de nove a quinze foi possível observar a cor verde de maior a menor intensidade, contendo clorofila a e b¹⁸, e a fração 16 incolor (Figura 3.A).

Eluição da coluna preenchida com sílica

Foram coletadas frações de aproximadamente 2 mL em 14 tubos de ensaio, nos quais foi possível observar a separação dos pigmentos presentes no extrato. Os tubos coletados continham respectivamente: um incolor, dois e três com coloração rosa, característica das antocianinas¹⁶, as frações de quatro a seis apresentam uma cor róseo-alaranjada contendo carotenoides¹⁷ e nas frações de sete a quatorze também foi possível observar a cor verde de maior a menor intensidade, contendo clorofila a e b¹⁸ (Figura 3.B).

Em relação aos resultados obtidos é possível observar que a fase estacionária composta por casca de ovos obteve excelentes resultados, comprovando a capacidade de separação de pigmentos vegetais de forma homogênea. As frações obtidas dessa fase estacionária possuíam

Figura 3: Frações obtidas



Legenda: 3.A- Frações obtidas da fase estacionária de cascas de ovos e 3.B- Frações obtidas da fase estacionária de sílica

Fonte: Autores

a cor mais vívida e aparentemente mais límpida quando comparada as frações obtidas da sílica. O que confirma que a casca de ovo é uma excelente opção de substituição da sílica em aulas práticas voltadas para a separação de pigmentos vegetais.

Os experimentos foram realizados, cada um no intervalo de 2 horários, desde a extração dos pigmentos e empacotamento da coluna até a eluição e fracionamento, compatível para realização em aulas práticas. Recomenda-se, que caso não seja realizado em horários simultâneos, o preparo do extrato seja feito no momento da eluição, para evitar a oxidação dos pigmentos e mudança de cor.

DISCUSSÃO

A utilização das cascas de ovos deu-se pela necessidade de materiais alternativos de baixo custo e fácil acesso, o que podem contribuir na realização de aulas práticas em locais onde não há a disponibilidade de materiais. As cascas de ovos, por exemplo, são classificadas como resíduos sólidos, que possuem aplicações como fertilizante e neutralizador de solos. Contudo, devido as características das cascas, como porosidade e alta concentração de carbonato de cálcio. A mesma composição mineral utilizada por Tswett durante seus

experimentos cromatográficos em 1903¹⁹. Devido a isso, o material alternativo foi utilizado e os resultados obtidos (Figura 2.B) foram os esperados, a separação dos pigmentos vegetais de forma eficiente.

Estudos publicados nos últimos anos já relataram o uso da casca de ovo para o processo de fabricação e avaliação coluna à base de casca de ovo para separação preparativa de fase reversa^{20,21} e fabricação de microesferas de hidroxiapatita derivadas da casca de ovo para aplicações cromatográficas²². Há um relato do uso da casca de ovo para fabricação de placa cromatográfica para cromatografia em camada delgada²³.

A escolha da *Tradescantia pallida purpúrea* (Rose) para o experimento se deu devido a presença de pigmentos já conhecidos e relatados, o que possibilitou a realização da prática. Por ser encontrada em diversos ambientes, como planta ornamental, é uma excelente escolha para realizar atividades que envolvam separação de pigmento devido as cores. É uma espécie que apresenta cor roxo intensa na face adaxial e verde na face abaxial das folhas. Os pigmentos presentes na lâmina foliar são a clorofila a e b, carotenoides e antocianinas²⁴. Os pigmentos vegetais têm cores características próprias, tal como particularidades na estrutura química.

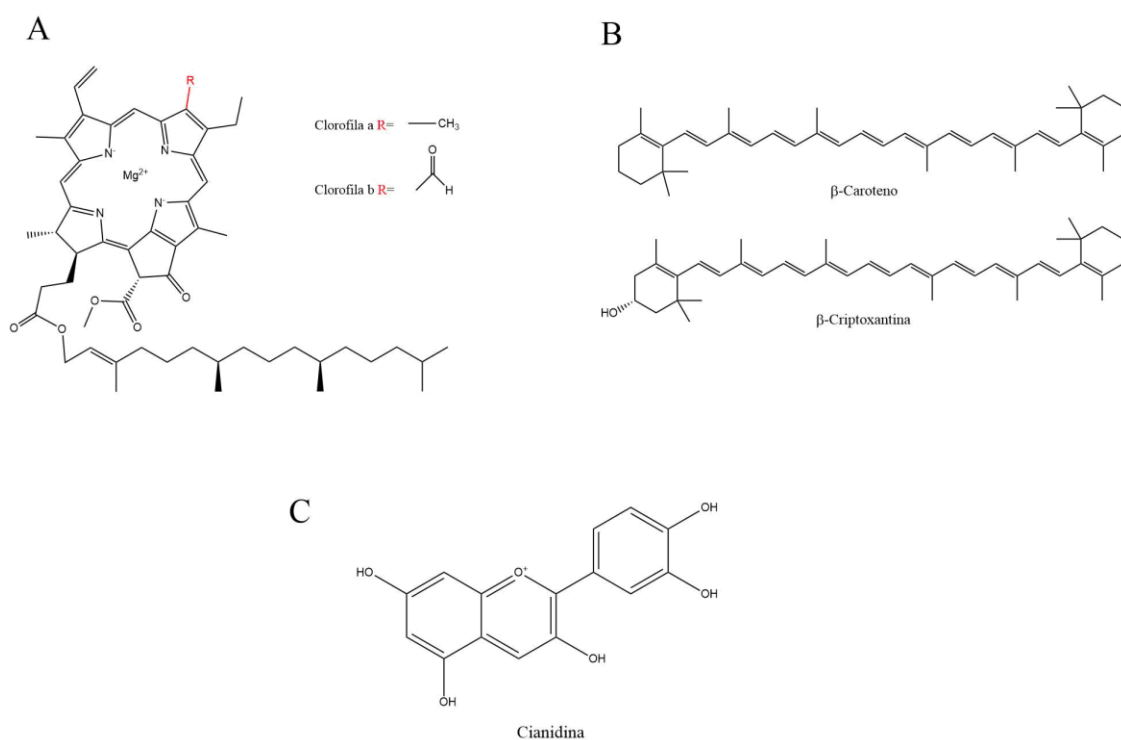
As clorofilas são pigmentos formados a partir de derivados da porfirina ligada a uma longa cadeia de fitol, caracterizadas pela presença de um átomo central de magnésio e refletem a cor verde. Especificamente, a clorofila a apresenta na estrutura um grupo metil (CH₃) o que acarreta a cor verde azulada, em contrapartida a clorofila b, considerada pigmento acessório, tem o grupo aldeído (CHO) substituindo o grupo metil, isso confere a cor amarelo esverdeada^{25,16,19} (Figura 4 A).

Os carotenoides são compostos do grupo dos terpenos conhecidos como tetraterpenoides, substâncias que tem 40 átomos de carbono que se opõe no centro da molécula²⁶ e conhecidos como pigmentos acessórios da fotossíntese. Trata-se da classe de pigmentos vegetais responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho. Os carotenoides são divididos em duas classes, os carotenos que possuem nas cadeias apenas carbono e hidrogênio, e as xantofilas quando grupos substituintes como o oxigênio, grupo ceto e epóxi estão presentes na cadeia^{16,17,27} (Figura 4 B).

As antocianinas são pigmentos polifenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonoides. Na estrutura básica há um núcleo cátion 2-fenilbenzopirano altamente conjugado²⁸ (Figura

4.C). Na natureza, esses compostos são responsáveis pelas cores rosa, vermelha, azul e roxa espalhados pelo corpo da planta^{17,28}. A variação de cor deste pigmento na natureza depende exclusivamente da posição de grupos químicos nos anéis aromáticos^{16,29}. As antocianinas são pigmentos sensíveis ao pH capazes de mudar de cor, indicando acidez ou basicidade³⁰. São substâncias que tem atividade anti-inflamatória, antioxidante, anti edema³¹ redutora de doenças cardiovasculares, anticâncer, antidiabética, dentre outros²⁷.

Figura 4: Estruturas químicas de clorofilas, carotenoides e antocianina.



Legenda: 4A- Estrutura química básica das clorofilas. 4.B- Exemplos de estruturas químicas de caroteno e xantofila. 4.C – Exemplo de estrutura de uma antocianina (cianidina).

Fonte: Autores (ChemDraw 18.1)

A caracterização química da casca de ovo já foi realizada por pesquisadores, no qual foi possível a visualização de poros por microscopia eletrônica de varredura, bem como determinação e quantificação de cálcio, e aplicação como fase estacionária para coluna, obtendo resultados esperado na separação de caroteno e clorofila de folhas de espinafre³². Em nosso experimento a coluna preenchida com casca de ovo comportou-se de forma similar a coluna de sílica, eluindo os pigmentos presentes no extrato vegetal na mesma ordem, estudos anteriores

comprovam e corroboram com a nossa pesquisa, que a casca de ovo é eficiente na separação de pigmentos. Além de possuir o baixo valor agregado, a casca de ovo pode ser obtida por meio do consumo de ovo na alimentação diária, ou mesmo por meio de locais que usam esse insumo para fabricação de outros alimentos, como padarias, restaurantes, confeitarias, biscuitarias e entre outras.

A cromatografia líquida clássica em coluna foi relatada anteriormente para separação de pigmentos de cenoura, folha de couve e beterraba desidratados, no qual se obteve três frações utilizando diferentes solventes; hexano, álcool etílico e álcool etílico/ácido acético (70:30), que ao eluir pela coluna extraíram carotenos, clorofilas e compostos avermelhados presentes em beterrabas³³.

A utilização do extrato de espinafre é recorrente, os pigmentos já conhecidos fazem deste alvo de experimentação em colunas cromatográficas, com mudanças nas fases móveis e estacionárias. Como a utilização de removedor de cera e acetona comercial (removedor de esmalte) como fase móvel para eluição em uma coluna cromatográfica montada com açúcar refinado³⁴. E cinzas da casca de arroz como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel³⁵.

A cromatografia clássica em coluna já foi empregada na graduação, como estratégia de ensino para a separação de mistura de dois corantes: fluoresceína/rodamina B; azul de bromotimol/rodamina B e fluoresceína/azul de metileno, e como atividade experimental, permitindo trabalhar conceitos químicos de polaridade e eluição³⁵. Em trabalhos já realizados, verificou-se a utilização do extrato de páprica por cromatografia em coluna, para o ensino regular e de graduação, os resultados obtidos foram a separação do β -caroteno e capsantina, contudo o processo é mais complexo e exige que haja o uso de reagentes e calor para a extração dos pigmentos da páprica³⁶.

Com a realização das práticas tanto no ensino regular quanto na graduação presume-se que haja amarração entre o conteúdo teórico trabalhado, aprofundando as informações e deixando-as mais completas. Espera-se que o professor assuma um papel reflexivo capaz de articular entre a teoria e a prática. De forma a estabelecer ações concretas, a partir de critérios lógicos³⁷. A pauta do ensino de biologia deve apresentar reflexões sobre os processos metodológicos utilizados para a produção do conhecimento, bem como das aplicações na sociedade³⁸.

Constatou-se, diante dos resultados obtidos que o experimento proposto permite discussões sobre temas que permeiam a biologia e a química de forma interdisciplinar. Apresenta conceitos, métodos e estimulando a prática investigativa. O experimento em questão é de fácil realização, possibilita o protagonismo do discente nas tarefas necessárias para a execução. Diversos temas podem e devem ser explorados, como, interações moleculares, polaridade, gravidade, química de produtos naturais, moléculas bioativas, extração vegetal, pigmentos naturais e demais temas que permeiam a física, química e biologia.

A principal forma do estímulo a experimentação no ensino de ciências se dá através de aulas práticas, a realização desta pode acontecer tanto dentro quanto fora do ambiente escolar, adaptando-se as necessidades de um determinado conteúdo. Contudo, aulas em laboratórios ocupam um lugar insubstituível nos cursos de biologia, uma vez que permitem o contato e a observação de fenômenos, além de proporcionar análise dos processos biológicos e o confronto de resultados não previstos, desafiando a imaginação e o raciocínio³⁹.

CONCLUSÃO

De modo geral os resultados são suficientemente visíveis, capazes de elucidar o que foi proposto, além de indagar novas perguntas sobre materiais alternativos para a realização da prática, nesse caso demonstrar de forma eficiente a separação das substâncias presentes no extrato, quando utilizado cascas de ovos pulverizadas.

A atividade pode ser reproduzida no ensino regular com modificações de materiais e adaptação da técnica, e com mais detalhes no ensino superior em cursos de graduação e pós-graduação que apresentem a cromatografia em coluna no currículo ou plano de curso.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Educação. Base Nacional Comum Curricular. Brasília, 2018.
2. ARAÚJO, Maurício dos Santos; FREITAS, Wanderson Lopes dos Santos. A experimentação no ensino de biologia: uma correlação entre teoria e prática para alunos do ensino médio em Floriano/PI. *Revista de Ensino de Biologia*. [S. l.]: Revista de Ensino de Biologia, 15 maio 2019. DOI 10.46667/renbio.v12i1.86.
3. CANTANHÊDE, Sildiane Martins; BARROSO, Ariane Alves Cortez; SILVA, Giovani Pessoa da. Uso De Experimentos Com Materiais Alternativos No Ensino De Biologia Em Uma Escola Pública. *Educação: pesquisa, aplicação e novas tendências*. [S. l.]:

- Editora Científica Digital, 2022. DOI 10.37885/220408515. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.37885/220408515>.
4. MOISÉS, Laura Jamilly Alves et al. Experimentação no ensino de ciências: possibilidades e desafios. *Revista Brasileira da Educação Profissional e Tecnológica*. [S. l.]: Instituto Federal de Educacao, Ciencia e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), 6 abr. 2022. DOI 10.15628/rbept.2022.12562.
 5. DOS SANTOS, Camila.; CHASSOT, Attico.; CORTE, Viviana. Scientific education and popularization of Science: investigation teaching as a educational approach. *Revista Brasileira de Ensino de Ciências e Matemática*, v. 3, n. 2, 25 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.5335/rbecm.v3i2.10452>
 6. VELOSO, Pedro Henrique Fonseca; SACRAMENTO, Veronica de Melo; ROYO, Vanessa de Andrade. USE OF RGB AS A QUANTITATIVE METHOD APPLIED TO THE TEACHING OF ANALYTICAL CHEMISTRY. *Periódico Tchê Química*. [S. l.]: Dr. D. Scientific Consulting, 11 out. 2022. DOI 10.52571/ptq.v19.n42.2022.01_veloso_pgs_01_12.pdf
 7. SANTOS, Letícia Gonçalves Brambilla; JUNIOR, Alvaro Lorencini. Uma abordagem interdisciplinar entre a química e a biologia com o estudo dos fósseis para o terceiro ano do ensino médio. *Arquivos do Mudi*. Maringá – PR. v. 21, n. 3, p. 142-154, 2017.
 8. DANUELLO, Amanda et al. Técnicas cromatográficas princípios, classificações e aplicações: técnicas cromatográficas. In: *Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros - Volume 2*. [S. l.]: Editora Científica Digital, 2022. DOI 10.37885/220509051.
 9. LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
 10. COLLINS, Carol H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. *Química Nova*. [S. l.]: FapUNIFESP (SciELO), jul. 2006. DOI 10.1590/s0100-40422006000400045. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400045>.
 11. FILHO, João R. de Freitas et al. Investigando cinza da casca do arroz como fase estacionária em cromatografia: uma proposta de aula experimental nos cursos de graduação. *Química Nova*. [S. l.]: FapUNIFESP (SciELO), 2012. DOI 10.1590/s0100-40422012000200033.
 12. Albertsson, P.-Å. The contribution of photosynthetic pigments to the development of biochemical separation methods. *Photosynthesis Research* . Vol. 76, Issue 1/3, pp. 217–225, 2003. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1023/a:1024944606930>
 13. KIRSTEN, Hugo Lima et al. Aspectos da biologia floral de *Tradescantia pallida* (Commelinaceae). *Unisanta BioScience*, v. 9, n. 5, p. 119-131, 2020.
 14. MENEGAZZO, Renato Fernando et al. Chemical composition of *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* Boom (Comelinaceae) essential oil. *Natural Product Research*. [S. l.]: Informa UK Limited, 18 maio 2020. DOI 10.1080/14786419.2020.1765341
 15. PAIVA, Élder Antonio Sousa et al. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom

- (Commelinaceae) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. [S. l.]: FapUNIFESP (SciELO), dez. 2003. DOI 10.1590/s1516-89132003000400017.
16. SOUSA, Clara. Anthocyanins, Carotenoids and Chlorophylls in Edible Plant Leaves Unveiled by Tandem Mass Spectrometry. *Foods*. [S. l.]: MDPI AG, 28 jun. 2022. DOI 10.3390/foods11131924
 17. NABI, Brera Ghulam et al. Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. *Food Bioscience*. [S. l.]: Elsevier BV, abr. 2023. DOI 10.1016/j.fbio.2023.102403.
 18. STREIT, Nivia Maria et al. As clorofilas. *Ciência Rural*. [S. l.]: FapUNIFESP (SciELO), jun. 2005. DOI 10.1590/s0103-84782005000300043
 19. COLLINS, Carol H. I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 1, p. 07-20, 2009.
 20. YOSHII, Tomoka et al. Fabrication process development and basic evaluation of eggshell-based column packing material for reversed-phase preparative separation. *Journal of Chromatography A*. [S. l.]: Elsevier BV, jan. 2023a. DOI 10.1016/j.chroma.2022.463722.
 21. YOSHII, Tomoka et al. Evaluation of separation performance for eggshell-based reversed-phase HPLC columns by controlling particle size and application in quantitative therapeutic drug monitoring. *Analytical Methods*. [S. l.]: Royal Society of Chemistry (RSC), 2023b. DOI 10.1039/d3ay00219e.
 22. ASHOKAN, Anbuthangam et al. Eggshell derived hydroxyapatite microspheres for chromatographic applications by a novel dissolution - precipitation method. *Ceramics International*. [S. l.]: Elsevier BV, jul. 2021. DOI 10.1016/j.ceramint.2021.03.183.
 23. ROCHA, Leandra Protázio et al. Cromatografia: Uso de materiais alternativos para o ensino de separações Químicas. *Rev. Ens. Sa. Biotec. Amaz.*, v. 2, n.2, p. 10-20, 2020.
 24. MARCELINO, Sandra Andreia Gonçalves. Valorização de ingredientes naturais na inclusão de uma dieta saudável. 2022. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca, Portugal, 2022.
 25. UENOJO, Mariana; MARÓSTICA JUNIOR, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*. [S. l.]: FapUNIFESP (SciELO), jun. 2007. DOI 10.1590/s0100-40422007000300022.
 26. TURNER, Tami; BURRI, Betty. Potential Nutritional Benefits of Current Citrus Consumption. *Agriculture*. [S. l.]: MDPI AG, 19 mar. 2013. DOI 10.3390/agriculture3010170.
 27. QI, Qianqian et al. Anthocyanins and Proanthocyanidins: Chemical Structures, Food Sources, Bioactivities, and Product Development. *Food Reviews International*. [S. l.]: Informa UK Limited, 2 fev. 2022. DOI 10.1080/87559129.2022.2029479
 28. WALLACE, Taylor C; GIUSTI, M Monica. Anthocyanins. *Advances in Nutrition*. [S. l.]: Elsevier BV, set. 2015. DOI 10.3945/an.115.009233.
 29. WROLSTAD, R.E. Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*. [S. l.]: Wiley, 31 maio 2006. DOI 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x.
 30. VELOSO, Pedro Henrique Fonseca et al.. Antocianinas do repolho-roxo como alternativa para investigação do pH em diferentes níveis de fermentação do leite.. In:

- Congresso Biotemas na educação básica - Fórum Biotemas - Mostra Científica Biotemas. *Anais Mostra Científica Biotemas Montes Claros(MG) Unimontes*, 2021.
31. KONG, Jin-Ming et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. [S. l.]: Elsevier BV, nov. 2003. DOI 10.1016/s0031-9422(03)00438-2.
 32. Rodrigues, Aleff dos Santos et al. Caracterização química da casca de ovo de galinha e utilização como fonte para produção de compostos de cálcio (ca). In: *15º Congresso Nacional de Iniciação Científica*. Anais CONIC, 2015.
 33. XAVIER, Luciana Araújo; SOUZA, Edineide Cristina A.; DE LIMA REBOUÇAS, Elenilda. Separação de pigmentos naturais por cromatografia em coluna: proposta de um experimento fácil e rápido. *RCT-Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 6, 2020.
 34. FONSECA, Sebastião Ferreira; GONÇALVES, Carolina Costa da Silva. Extração dos pigmentos do espinafre e separação em coluna de açúcar comercial. *Química Nova na Escola*, v. 20, p. 55-58, 2004.
 35. CARNEIRO, Eliana Beleski Borba; CARNEIRO, Paulo Irajara Borba. Experimentos de cromatografia em coluna no ensino de graduação. Publicatio *UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias*, v. 10, n. 02, 2004.
 36. SILVA, Letícia Barros da et al. Produtos naturais no ensino de química: experimentação para o isolamento dos pigmentos do extrato de páprica. *Química Nova na Escola*, São Paulo, 2006.
 37. FONTANA, Maire Josiane; FÁVERO, Altair Alberto. Professor reflexivo: uma integração entre teoria e prática. *Revista de Educação do IDEAU*, v. 8, n. 17, 2013.
 38. SILVA, Henrique Mendes da. Atividade investigativa no ensino de biologia. *Revista de Ensino de Biologia*. [S. l.]: *Revista de Ensino de Biologia*, 30 nov. 2021. DOI 10.46667/renbio.v14i2.629
 39. KRASILCHIK, Myriam. *Prática de Ensino de Biologia*. São Paulo: Universidade de São Paulo. Editora: Edusp, 2005.