

EXPERIMENTOS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA NO ENSINO DE GRADUAÇÃO

COLUMN CHROMATOGRAPHY EXPERIMENTS IN A GRADUATION COURSE

Eliana Beleski Borba Carneiro¹, Paulo Irajara Borba Carneiro²

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Campus em Uvaranas, Departamento de Química, Ponta Grossa, Pr, Brasil

² Autor para contato: Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Campus em Uvaranas, Departamento de Química, Ponta Grossa, Pr, Brasil; (42)220-3063; e-mail: pibc@uepg.br

Recebido para publicação em 26/01/2004

Aceito para publicação em 21/07/2004

RESUMO

Este trabalho mostra experimentos de cromatografia em coluna de duas horas, separando mistura de corantes: fluoresceína/rodamina B; azul de bromotimol/rodamina B e fluoresceína/azul de metileno. O experimento permite ilustrar conceitos de equilíbrio ácido-base e fluorescência, bem como objetivos e fundamentos dos métodos cromatográficos. Experimentos de cromatografia em camada delgada foram efetuados para escolher os solventes de eluição. Os resultados mostraram que etanol foi o solvente adequado e foi utilizado nos experimentos de cromatografia em coluna. Essa metodologia pode ser adaptada para separar outras substâncias.

Palavras-chave: coluna cromatográfica, corantes, experimentos didáticos

ABSTRACT

This work shows two-hour column chromatography experiments separating dye mixtures: fluorescein/rhodamine B, bromothymolblue/rhodamine B and fluoresceine/methyleneblue. It illustrates concepts of basic-acids and fluorescence equilibrium, as well as the objectives and the foundations of chromatographic methods. Thin layer chromatography experiments were performed in order to choose the elution solvents. The results showed that ethanol was the adequate solvent, and it was thus used in the column chromatography experiments. This methodology can be adapted to separate other substances.

Key words: chromatographic column; didactic experiment; dyes

1. Introdução

O processo de separação dos componentes de uma amostra em cromatografia envolve a distribuição dos componentes entre duas fases, uma móvel e outra estacionária. Os fatores envolvidos no processo cromatográfico - carga iônica, forças intermoleculares, polaridade molecular, volume molecular, adsorção e solubilidade - atuam simultaneamente, provocando a separação dos constituintes da amostra (Furniss, 1989; Pavia, 1999, Skoog, 1998).

A fase estacionária pode estar revestindo uma placa de vidro, como uma camada fina sobre a qual a fase móvel ascende por capilaridade (cromatografia em camada delgada), ou pode estar empacotada na forma de uma coluna, através da qual a fase móvel flui (cromatografia em coluna). A cromatografia em coluna é utilizada quando se pretende separar grandes quantidades de substâncias. A fase estacionária pode ser uma substância líquida ou sólida e a fase móvel, líquida ou gasosa. As diversas técnicas cromatográficas de uso geral são combinações destas fases. Assim, na cromatografia de partição, a fase estacionária é um filme líquido fino adsorvido na superfície de um suporte inerte. A fase móvel pode ser um líquido (cromatografia de partição líquido-líquido) ou um gás (cromatografia de partição gás-líquido ou cromatografia gasosa - GLC). A cromatografia em papel é um exemplo de cromatografia de partição, na qual um papel de filtro é utilizado como fase estacionária e suporte em fase líquida. Na cromatografia de adsorção, a fase móvel geralmente é um líquido e a fase estacionária é um adsorvente sólido finamente dividido (cromatografia sólido-líquida). Outros processos podem ser utilizados. A separação por cromatografia gás-sólido tem aplicações limitadas a misturas orgânicas. O uso de resinas trocadoras de íons como fase sólida é um exemplo de cromatografia sólido-líquida, na qual as forças eletrostáticas presentes reforçam as forças fracas de adsorção (Pavia, 1999; Dekker, 1998; Bell, 2000; Lehman, 1998).

Executar experimentos de cromatografia em laboratório no período de 2 horas, duração normal das aulas de graduação, apresenta dificuldades. Nem sempre as sugestões da literatura podem ser adaptadas com sucesso, devido à reduzida carga horária para as

atividades experimentais, deficiências na infra-estrutura e dificuldades de dispor de materiais e reagentes adequados. Assim, é necessário adequar os experimentos que possam ser realizados, atendendo às exigências da qualidade de ensino: experimentos simples que demonstrem conceitos importantes da química. Além disto, que sejam de fácil execução e boa reprodutibilidade.

Os corantes apresentam extenso uso industrial. A indústria de alimentos, particularmente, os utiliza porque a cor influencia a aceitabilidade do produto. Muitos corantes são obtidos como misturas de extratos vegetais que necessitam ser separados, para posterior aplicação. A cromatografia em coluna é um método simples e eficiente para realizar esta separação. Na literatura, há exemplos de misturas de corantes separáveis por cromatografia, como os componentes de extratos vegetais (Pavia, 1999) e misturas de corantes como a fluoresceína e azul de metileno (Svoronos, 1996).

Neste trabalho, desenvolvido com a participação de acadêmicos, a cromatografia em coluna foi utilizada para a separação de misturas de corantes, processo didaticamente vantajoso, porque permite acompanhamento visual. São propostas separações de diversas misturas, com boa resolução. A separação da mistura dos corantes: azul de bromotimol e rodamina B é inédita nas condições apresentadas.

2. Material e métodos

Para a realização dos experimentos em coluna foram utilizadas buretas de 25 mL (como alternativa às colunas de vidro) contendo um pequeno chumaço de algodão para sustentar o recheio da coluna, uma suspensão contendo 3 g de sílica gel (Merck, 70-230 mesh) para coluna em etanol. As frações foram coletadas em tubos de ensaio. Os experimentos de cromatografia em camada delgada foram realizados em placas de vidro de 2,5 x 7,5 cm revestidas com suspensão de sílica gel G em água (1:2, m/m) (Furniss, 1989). Por razões didáticas foram utilizadas soluções alcoólicas a 0,1 % (m/v) de corantes orgânicos de fácil visualização durante a eluição com etanol: fluoresceína

(amarelo), rodamina B (róseo), azul de bromotimol (amarelo) e azul de metileno (azul). O procedimento é simplificado, não havendo necessidade de se utilizar material sofisticado, o que facilita a aplicação didática desta técnica experimental.

REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES:

Foram utilizados fluoresceína, rodamina B, azul de bromotimol, azul de metileno, hexano, diclorometano, clorofórmio, éter etílico, acetato de etila, acetona, etanol (95%) e ácido acético de grau analítico (PA), sem purificação prévia.

TESTE DE SOLUBILIDADE: Os ensaios de solubilidade dos corantes em diversos solventes (0,100 g/3 mL) foram realizados em tubos de ensaio. A partir destes dados, foram realizados experimentos em camada delgada para prever o possível comportamento dos corantes em coluna cromatográfica.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA: Foram realizados experimentos para a escolha dos solventes de eluição. As placas de vidro (2,5 x 7,5 cm) previamente lavadas foram limpas com algodão umedecido em álcool, fixadas em suporte de alumínio e revestidas com uma camada de 250 µm de sílica gel G (Merck), usando-se um espalhador contendo a suspensão aquosa da sílica (1:2, m/m). Foram ativadas em estufa durante 1 h a 110 °C e mantidas secas em dessecador. A seguir foram aplicados 2 µL das soluções alcoólicas dos corantes (0,1 % m/v), utilizando-se micropipetas. Os cromatogramas foram desenvolvidos em frascos de vidro de 100 mL (10,0 cm x 5,0 cm) tampados, contendo aproximadamente 20 mL de solvente (Furniss, 1989; Svoronos, 1996). As placas foram eluídas em diversos solventes (Tabela 2). Foram selecionados os solventes que eluíram a maioria dos corantes ($R_f \cong 0,50 - 0,80$). Neste procedimento, dispensou-se a saturação dos frascos, devido às pequenas dimensões das placas utilizadas.

PREPARAÇÃO DA COLUNA (Furniss, 1989; Bell, 2000; Lehman, 1998; Svoronos, 1996; Hart, 1995).

- Introduzir o etanol na coluna (bureta) até cerca de 1/4 da altura total desta. Verificar o funcionamento da torneira.

- Pesar aproximadamente 3 g de sílica gel para coluna em bquer de 100 mL. Adicionar uma quantidade suficiente de etanol para formar uma suspensão;

misturar com um bastão de vidro.

- Abrir um pouco a torneira da coluna deixando gotejar o solvente para dentro de um bquer, o qual é percolado novamente através da coluna.

- Com a ajuda do bastão de vidro, introduzir lentamente e de forma contínua a suspensão na coluna.

- Deixar gotejar o solvente durante 5 minutos após o enchimento da coluna para facilitar a sedimentação da sílica. O nível do solvente deve ficar no mínimo 1 cm acima da fase estacionária durante essa etapa.

- Fechar a torneira deixando um volume suficiente de solvente para cobrir a parte superior da fase estacionária contida na coluna.

- Colocar papel de filtro com um diâmetro inferior ao da coluna (bureta) sobre a fase estacionária, a fim de proteger a superfície da mesma, utilizando bastão de vidro, se necessário. Colocar um pouco de algodão hidrofílico para cobrir o papel de filtro (aproximadamente 1 cm de espessura).

PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DA AMOSTRA:

- Preparar amostras contendo mistura de 2 corantes de coloração diferentes (1:1, v/v).

- Percolar o solvente até este ficar 2-3 mm acima do nível do algodão.

- Medir 0,2 mL da solução da amostra de corantes.

- Verter lentamente a mistura no topo da coluna.

- Gotejar o solvente na coluna até que a solução da amostra desça ao nível do algodão, colocado na parte inferior da coluna.

ELUIÇÃO:

- Deixar gotejar lentamente o eluente, de um funil de decantação fixado sobre a coluna.

- Percolar aproximadamente 60 a 100 mL do eluente através da coluna, recolhendo aproximadamente 10 mL em tubos de ensaio previamente numerados, numa vazão de 3 mL/min.

- Prosseguir a eluição até a saída total dos analitos. Reunir os eluídos correspondentes a cada corante separado no processo (coloração diferente). Remover o solvente em evaporador rotativo.

NOTAS:

1. Por vezes torna-se difícil arrastar a suspensão para a coluna, caso isto ocorra, usar bastão de

vidro e juntar um pouco mais de solvente para auxiliar na transferência.

2. Quando se interrompe a adição da suspensão à coluna por algum tempo a sílica tende a sedimentar e formam-se zonas estratificadas. Uma maneira de evitar esta situação é agitar o solvente na coluna com o bastão entre duas adições da suspensão.

3. Nunca deixar a superfície da coluna sem eluente porque esta se deteriora em contacto com o ar.

4. O controle das frações eluídas por cromatografia em camada delgada é dispensável, pois os corantes separados exibem colorações diferentes.

5. Os valores de R_f são calculados da razão da/ds

onde da é distância percorrida pela substância e ds é à distância percorrida pelo solvente (do ponto de aplicação até a frente do solvente).

3. Resultados e discussão

Os testes de solubilidade (Tabela 1) indicaram etanol e água como solventes adequados para solubilizar as amostras dos corantes. Assim, foram usadas soluções alcoólicas nos experimentos de cromatografia em camada delgada.

Tabela 1 - Dados da solubilidade dos analitos nos solventes avaliados*.

Compostos utilizados	Solventes						
	Dicloro- metano	Cloro- fórmio	Eter etílico	Acetato de etila	Acetona	Etanol	Água
Fluoresceína	-	-	-	+	+	+	+
Rodamina B	+	+	+	+	+	+	+
Azul de bromo-timol	+	+	+	+	+	+	+
Azul de metileno	-	-	-	-	-	+	+

* (+) = solúvel; (-) = insolúvel.

Na Tabela 2 são apresentados os dados da eluição dos analitos em diversos solventes. A série eluotrópica utilizada na cromatografia em camada delgada foi: hexano, éteretílico, acetato

de etila, acetona, etanol e ácido acético glacial. A análise dos dados mostra que o etanol foi o melhor eluente, sendo escolhido para utilização na cromatografia em coluna.

Tabela 2 - Dados da eluição dos analitos por cromatografia em camada delgada empregando diversos solventes

Compostos utilizados	Solventes (R_f)					
	Hexano	Éter etílico	Acetato de etila	Acetona	Etanol	Ácido acético
Fluoresceína	0,0	0,0	0,7	0,7	0,7	1,0
Rodamina B	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	1,0
Azul de bromotimol	0,0	0,0	0,2	0,9	0,9	1,0
Azul de metileno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1

$R_f = da/ds$; razão da distância percorrida pela substância e o solvente.

A Tabela 3 apresenta os resultados de 3 experimentos de cromatografia em coluna que podem ser realizados num período de 2 horas. Nestes experimentos, cada mistura de 2 corantes foi eluída em etanol, coletando-se frações de 10 mL em tubos de ensaio. O primeiro componente, geralmente contido nas 3 primeiras frações, foi isolado juntando-se estas frações e removendo-se o solvente no evaporador rotativo. O 2º componente foi eluído a partir da 5ª fração e isolado da mesma maneira. O número total de frações variou de 6 a 10, conforme o experimento. A 4ª fração, geralmente contendo traços dos 2 corantes, foi reservada para nova tentativa de separação.

Tabela 3 - Cromatografia em coluna dos analitos em estudo.

Amostras	Eluente: etanol
Fluoresceína/rodamina B ^a	+/+
Azul de bromotimol/rodamina B ^a	+/+
Fluoresceína/azul de metileno ^b	+/-

a = O 2º componente, rodamina B (róseo), elui em aproximadamente 60 min.

b = O 2º componente, azul de metileno (azul), não elui em etanol, exigindo fase eluente mais polar.

(+) = componente eluído.

Na mistura fluoresceína/rodamina B, observa-se primeiramente a eluição da fluoresceína de cor amarelada, seguindo-se a rodamina B, de coloração rósea, quando eluídas em etanol. Na mistura azul de bromotimol/rodamina B, observa-se primeiramente a eluição do azul de bromotimol de cor amarelada, seguindo-se a rodamina B, de coloração rósea. Todos estes analitos foram obtidos com boa resolução em etanol.

Na mistura fluoresceína/azul de metileno, observa-se primeiramente a eluição da fluoresceína, de cor amarelada, porém, o segundo componente, o azul de metileno, não elui em etanol, necessitando de um sistema eluente mais polar. Foram utilizados dois sistemas para eluição do azul de metileno: a mistura água/etanol (1:1 v/v) onde o composto eluiu em aproximadamente 60 min. e a mistura etanol/água/acetona/ácido acético

(1:1:1:1 v/v), onde o composto eluiu rapidamente, em aproximadamente 20 min.

A análise das estruturas dos corantes utilizados (Figura 1) mostra um composto polar, o azul de bromotimol [3] e 3 sais: o sal dissódico da fluoresceína [1], com concentração de cargas negativas no radical orgânico; e os cloretos da rodamina B [2] e do azul de metileno [4], ambos, com concentração de cargas positivas no radical orgânico. O constituinte polar $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, presente na fase estacionária, é mais efetivo na adsorção de íons positivos e moléculas polares, sendo pouco efetivo na adsorção de íons negativos. Assim, adsorve melhor o azul de metileno [4] e rodamina B [2], sendo pouco eficiente na adsorção da fluoresceína [1] e azul de bromotimol [3], que são eluídos rapidamente em etanol (aproximadamente 10 min). Os compostos policíclicos com anéis coplanares, mostram adsorção mais efetiva na fase estacionária. Assim, o composto azul de metileno [4], com os 3 anéis coplanares, foi o mais adsorvido, não sendo eluído em etanol. Esta dificuldade foi contornada alterando-se a polaridade do sistema solvente: em etanol/água (1:1 v/v) o azul de metileno [4] foi eluído lentamente (aproximadamente 60 min.) e rapidamente em etanol/água/acetona/ácido acético (1:1:1:1 v/v, aproximadamente 20 min). A rodamina B [2], com 3 anéis aproximadamente coplanares e 1 anel fora do plano, apresentou adsorção menos efetiva que o azul de metileno, sendo eluído lentamente em etanol (aproximadamente 60 min).

Os compostos polares, fluoresceína [1, amarelo] e azul de bromotimol [3, amarelo], adsorvidos na fase estacionária polar, foram removidos e eluídos nos solventes polares acetona e etanol. Os compostos rodamina B [2, róseo] e azul de metileno [4, azul], os quais apresentam interações eletrostáticas e polares mais efetivas com a fase estacionária polar, não foram eluídos em hexano, éter etílico, acetato de etila e acetona. O composto rodamina B [2] foi eluído em etanol e ácido acético glacial.

4. Conclusão

Este trabalho mostra os resultados de experimentos de cromatografia em coluna, realizados em

2 h, com a separação da mistura de 2 corantes: fluoresceína/rodamina B; azul de bromotimol/rodamina B e fluoresceína/azul de metileno. Os experimentos de cromatografia em camada delgada indicaram o etanol como o eluente de escolha, o qual foi utilizado nos experimentos de cromatografia em coluna. A seqüência de eluição dos componentes de cada mistura mostra a in-

fluência da estrutura e interações entre cada componente com o adsorvente e o eluente. Em resumo, a demonstração permite trabalhar conceitos importantes da química a partir de experimentos simples. A análise estrutural das substâncias aplicadas permite fazer previsões de solubilidade e possível comportamento cromatográfico.

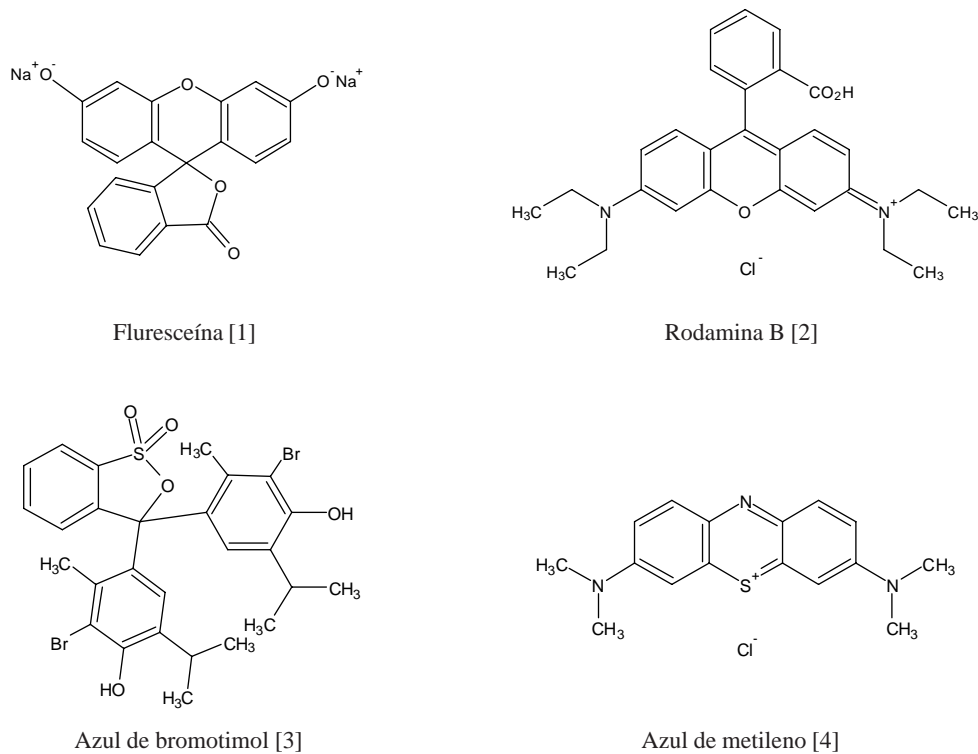


Figura 1 - Estrutura dos corantes utilizados: [1] 3',6'-Dissódioespiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xantenato]-3-ona (fluoresceína sódica); [2] Cloreto de N-[9-(2-carboxifenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno]-N-etiletanamínio (rodamina B); [3] 4,4'-(3H-2,1-benzoxatíol-3-ilideno)bis[2-bromo-3-metil-6-(1-metiletí)fenol]S,S-dióxido (azul de bromotimol); [4] Cloreto de 3,7-bis (dimetilamino)fenotiazin-5-íio (azul de metileno).

Comentários e sugestões para aplicação e estudo

As soluções de corantes podem ser utilizadas para mostrar:

1. O equilíbrio de adsorção: a distribuição do soluto na fase estacionária (adsorvente) e na fase móvel (eluente).
2. O equilíbrio ácido-base envolvendo indicadores de pH como o azul de bromo-timol (amarelo/azul em pH ácido/básico).
3. O equilíbrio de adsorção da rodamina B e

fluoresceína (coloração esverdeado/alaranjado) em argentimetria.

4. As propriedades fluorescentes da fluoresceína e rodamina B podem ser observadas em ambiente de pouca luminosidade. Pode-se discutir conceitos de fluorescência e fosforescência.

5. A demonstração pode ser feita em qualquer laboratório de ensino, realçando aspectos relacionados ao equilíbrio ácido-base (reações, conceito de pH, indicadores ácido-base), equilíbrio de adsorção (indicadores de adsorção).

Sugestões para pesquisa

1. Qual o grau de confiabilidade do R_f como critério qualitativo na identificação de substâncias?
2. Porque a fluoresceína elui mais rapidamente da coluna do que o azul de metileno?
3. Comente sobre a natureza das interações entre os componentes da amostra e o adsorvente da coluna.

Agradecimentos

Aos acadêmicos do curso de Farmácia que nos auxiliaram nos experimentos, e a UEPG pela utilização de laboratórios de ensino.

REFERÊNCIAS

- 1 BELL, C.; TABER, D.; CLARCK, A. **Organic chemistry laboratory with quantitative analysis**, 3rd ed.; Thomson learning, New York, USA, 2000.
- 2 DEKKER, M. **Advances in chromatography**. Phyllis, R. Brown Ed.; Publisher book news, Inc.; Portland, OR; USA; 1998.
- 3 FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; ROGERS, V.; SMITH, P. W. G.; TATCHELL, A. R. **Voguel's textbook of practical organic chemistry**; 5th ed., John Wiley & Sons, Inc.; New York, USA, 1989.
- 4 HART, D.; CRAINE, L. **Organic chemistry: A short course laboratory manual**, 9th ed., New York, USA, 1995.
- 5 LEHMAN, J. W. **Operational organic chemistry: a problem solving approach to the laboratory course**, 3rd ed., Pearson Higher Education, New York, USA, 1998.
- 6 PAVIA, D. L.; LAMPMAN, C. M.; KRIZ, G. S. ENGEL, R. G. **Introduction to organic laboratory techniques: a micro scale approach**; 3rd ed., Saunders College Publishing Ed.; New York, USA, 1999.
- 7 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMANN, T. A. **Principles of instrumental analysis**, 5th ed., Saunders; New York, USA, 1998.
- 8 SVORONOS, P.; SARLO, E.; KULAWIEC, R. J. **Organic chemistry laboratory manual**, 2nd ed., WCB publishers; Iowa, USA, 1996.