

## CROMATOGRAFIA

### META

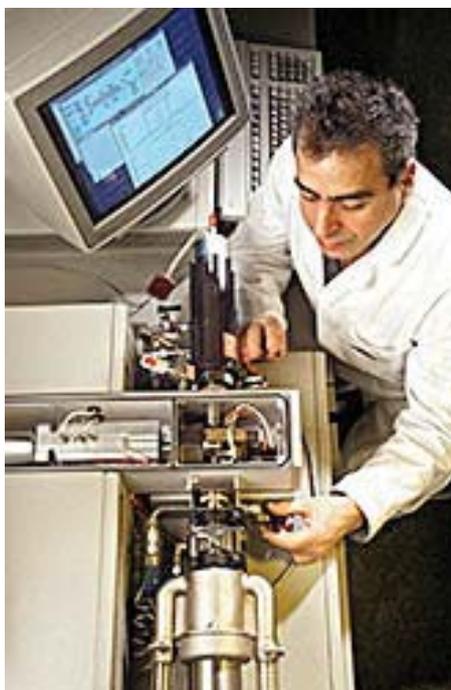
Ao final desta aula o aluno deverá ser capaz de isolar ou purificar compostos orgânicos de uma mistura utilizando a técnica da Cromatografia em Camada Delgada - CCD

### OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:  
verificar experimentalmente o comportamento de uma mistura por meio da cromatografia em camada delgada.

### PRÉ-REQUISITOS

Segurança em Laboratório, nomenclatura dos compostos orgânicos, propriedades físicas, forças intermoleculares.



Cientista utilizando a cromatografia.  
(Fonte: <http://www.ars.usda.gov>)

### INTRODUÇÃO

Olá! Preparado para aprender mais um novo método de purificação de compostos muito utilizado na química orgânica? Pois muito bem! Hoje, nós vamos falar de cromatografia.

A palavra cromatografia, do grego *kromatos*-cor, e *grafos*-escrita, foi, primeiramente, usada em 1906 por Mikhail Tswett, um botânico russo, para descrever a separação de pigmentos de plantas em zonas de cores distintas. Tswett usou um tubo de vidro preenchido com uma substância sólida (carbonato de cálcio) e passou através do tubo extratos de plantas, observando a formação de zonas verdes e amarelas. Entretanto, foi somente a partir de 1950 que o uso da cromatografia se tornou popular como um método de separação de substâncias coloridas. Atualmente, o método aplica-se também a substâncias incolores, porém o nome original foi mantido.

Na verdade, para melhor compreensão é preciso que se entenda que o princípio de todos os métodos cromatográficos é, em última análise, o mesmo em que se baseia a extração, ou seja, trata-se da distribuição de uma substância entre duas fases distintas. Como já vimos na aula anterior, na extração, uma substância se transfere, preferencialmente, para a fase em que ela é mais solúvel. É um estado de equilíbrio que pode ser deslocado por modificações das condições externas. Isto significa, por exemplo, que uma substância extraída com éter de uma solução aquosa pode ser extraída do éter por tratamento com muita água. (Marques, J. M., 2007).

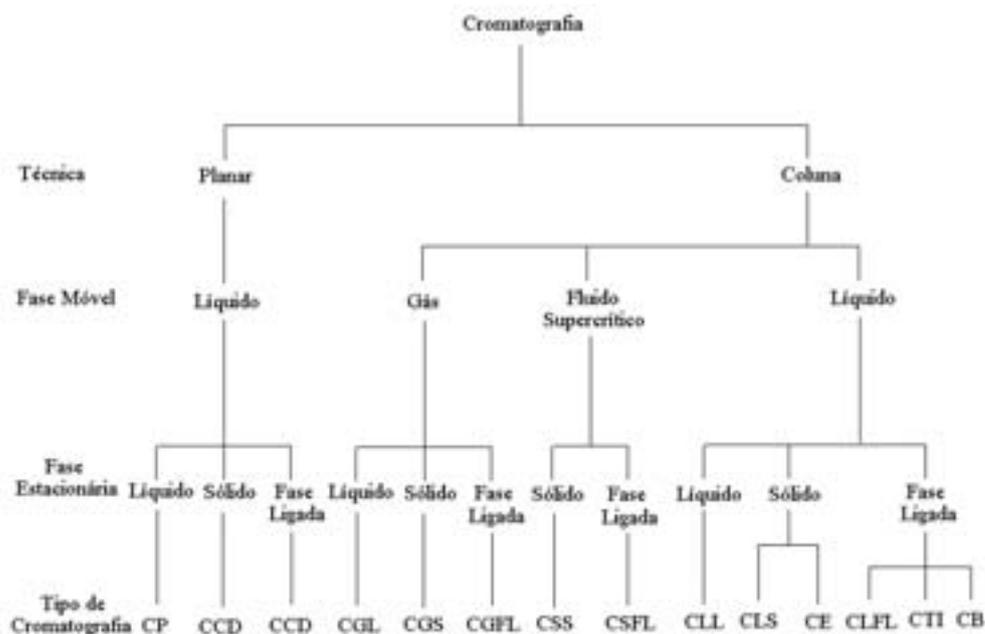


Mikhail Tswett, cientista russo pioneiro na utilização da cromatográfica.  
(Fonte: <http://labvirtual.eq.uc.pt>)

Agora que entendemos o princípio envolvido na cromatografia, podemos então definir a cromatografia como sendo a separação de uma mistura de dois ou mais compostos pela distribuição entre duas fases, sendo uma denominada fase móvel ou eluente que passa por outra denominada fase estacionária. Assim, os métodos cromatográficos se caracterizam pela passagem de uma fase móvel sobre uma fase estacionária. Se uma substância está dissolvida na fase móvel, ela se moverá mais ou menos rapidamente, de acordo com a relação de afinidade com a fase móvel e com a fase estacionária.

Quando a fase estacionária é uma substância sólida, em vez da solubilidade relativa das substâncias a serem separadas, deve-se considerar a sua adsorção relativa no sólido. Atente para o fato de que no fenômeno da adsorção, há formação de uma ligação fraca entre as moléculas de um gás ou de um líquido e a superfície de um sólido. (Marques, J. M., 2007).

Existem vários tipos de cromatografia, os quais dependem da natureza das duas fases envolvidas e de sua interação diferencial com as substâncias a serem separadas, Figura 1. Entretanto, focaremos a nossa atenção para a cromatografia de adsorção, também conhecida como cromatografia líquido-sólido. Neste processo os componentes de uma mistura são separados por migração diferencial, na qual a propriedade do soluto responsável pela competição é a polaridade.



Cromatográficas de acordo com a configuração da fase móvel e estacionária. (Fonte: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 7ª. Ed., Editora da Unicamp, 1997).

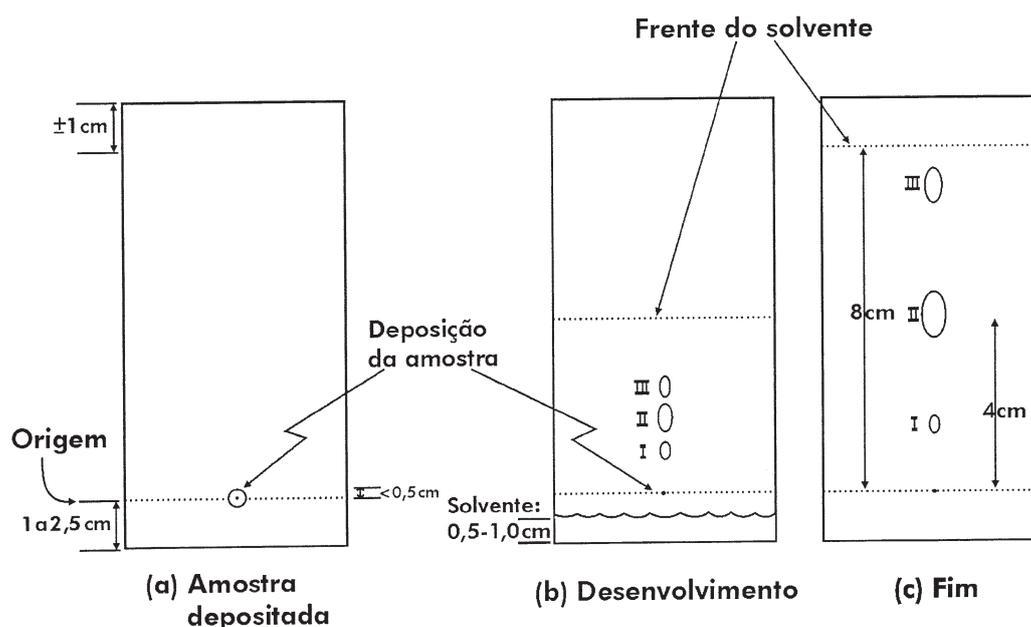
Atente para o fato de que para uma análise cromatográfica satisfatória devemos ter cuidados com a escolha do eluente. Este deve obedecer aos seguintes critérios:

- deve ser capaz de solubilizar os componentes da mistura a ser cromatografada;
- devem ter baixo ponto de ebulição (35-85°C) para que sejam evaporados facilmente;
- a vazão do eluente pode ser aproximadamente de uma gota por segundo. Não se deve aumentar muito rapidamente a polaridade do eluente para evitar a sobreposição de bandas.

Bem, na cromatografia de adsorção podemos ter a fase estacionária constituída de uma superfície plana, denominada Cromatografia em Camada Delgada (CCD) ou em Cromatografia em Coluna (CC) a qual pode ser: Cromatografia em Coluna Clássica, Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Vejamos agora especificamente cada um destes métodos por adsorção:  
Cromatografia em Camada Delgada – CCD:

Na cromatografia em camada delgada, CCD (ou TLC, “thin layer chromatography”), a fase móvel é o solvente de desenvolvimento e a fase estacionária encontra-se adsorvida à superfície da placa. A fase estacionária mais comum é constituída por uma camada de sílica-gel. A CCD pode ser analítica (CCDA) e/ou preparativa (CCDP), Figura 2, e seu princípio consiste na análise dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana.



CCDA após isolamento de substâncias a partir de uma mistura.

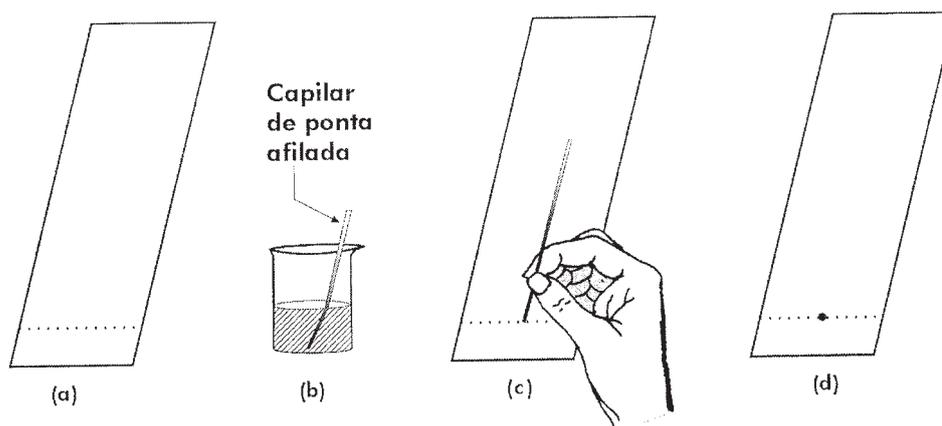
(Fonte: AQUINO NETO, F. R., NUNES, D. S. S. Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins. Editora Interciência, 2003, pg 33).

A análise qualitativa de uma substância é realizada através da cor da mancha, e de seu fator de retenção ( $R_f$ ), segundo a fórmula abaixo:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela mancha}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

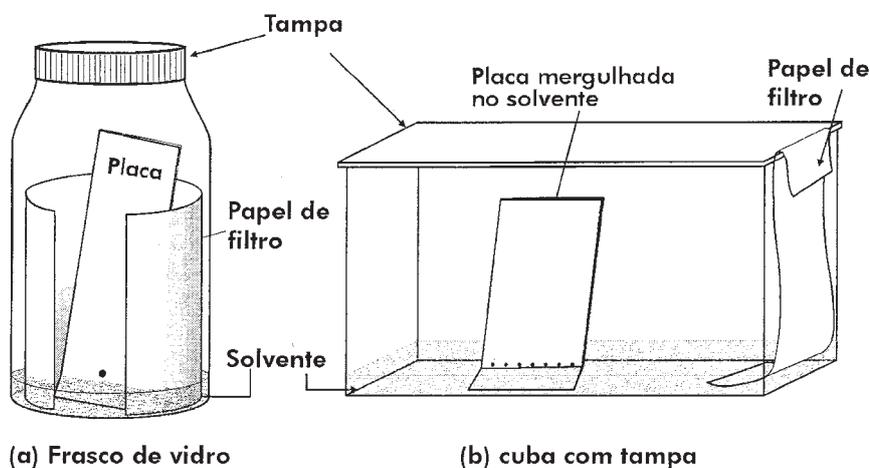
Para uma boa análise, as substâncias a serem analisadas deverão obedecer aos seguintes critérios (Figura 3):

- Serem dissolvidas na menor quantidade possível de solvente [Por exemplo: um spot da amostra para 0,1 mL de solvente (uma gota)];
- Serem aplicadas a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da base da placa, com o auxílio de um capilar;
- Terem um spot de 1 a 2 mm de diâmetro;
- Terem, aproximadamente, 0,5 cm de distância uma da outra;
- E, finalmente, as placas deverão ser reveladas primeiramente com lâmpada ultra-violeta. (Cuidado! Não olhe diretamente na luz). Neste caso, os contornos das manchas observadas deverão ser marcados com o auxílio de um lápis grafite e, em seguida, as placas deverão ser reveladas em cuba saturada com vapores de iodo ou soluções apropriadas.



Etapas da Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).

(Fonte: AQUINO NETO, F. R., NUNES, D. S. S. Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins. Editora Interciência, 2003, pg 37).



Etapas da Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).

(Fonte: AQUINO NETO, F. R., NUNES, D. S. S. Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins. Editora Interciência, 2003, pg 38).

Agora, vamos ver quais as vantagens, usos e aplicações da CCD.

Vantagens da CCD:

- fácil compreensão e execução;
- separações em breve espaço de tempo;
- versatilidade;
- grande reprodutibilidade;
- baixo custo.

Usos da CCD:

- reações orgânicas: pureza e acompanhamento da reação;
- fitoquímica: pureza dos compostos, natureza química dos compostos, identificação;
- fitoterapia: controle de qualidade.

Aplicação: Indústria Farmacêutica; Indústria de Alimentos; Indústria Petroquímica; Análise Forense; Química Orgânica; Bioquímica; Farmacologia; Análises Clínicas e Produtos Naturais (Farmacognosia).

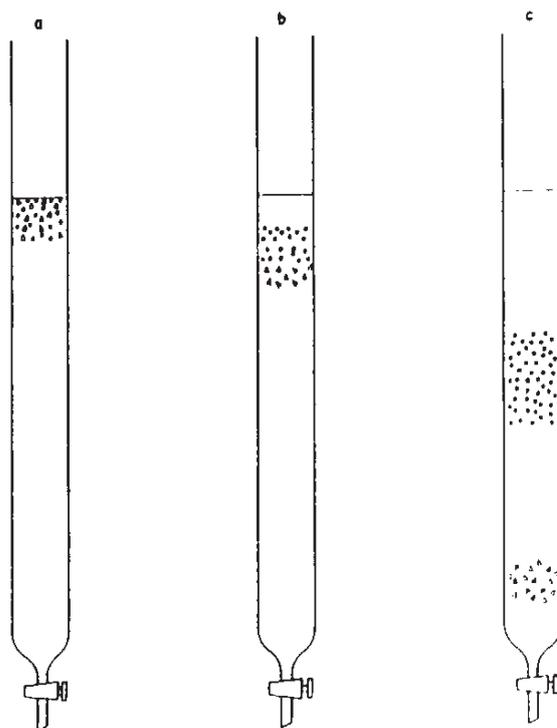
### **CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)**

Da mesma forma que na CCD, a cromatografia em coluna é também um processo de separação dos componentes de uma mistura por migração diferencial, na qual a propriedade do soluto responsável pela competição também é a polaridade; a fase móvel é o solvente de desenvolvimento, enquanto que a fase estacionária é o adsorvente. A Tabela 2 lista alguns adsorventes utilizados na fase estacionária da CC, classificados por ordem crescente de sua capacidade de ligação. Esta habilidade de ligação depende de ambos, material adsorvente e polaridade dos componentes na mistura a ser separada. Geralmente, quanto maior a polaridade, mais forte será a ligação e mais difícil será a separação de cada componente na mistura dentro da coluna. Para componentes tendo polaridades similares ou idênticas o peso molecular será o fator determinante, com os componentes de alto peso molecular se deslocando mais lentamente (Eaton, D.C., 1989).

Tabela 1 – Adsorventes mais utilizados em cromatografia em coluna.

<i>Adsorventes usados em Cromatografia em Coluna</i>	
Celulose	Aumento da habilidade de ligação  ↓
Amido	
Açúcares	
Silicato de magnésio	
Carbonato de cálcio	
Fosfato de cálcio	
Sulfato de cálcio	
Óxido de cálcio	
Sílica gel	
Florisil	
Carvão	
Alumina	

A Figura 4 mostra a simulação da separação dos componentes de uma mistura por migração diferencial numa coluna cromatográfica.



Desenvolvimento de uma coluna cromatográfica.

(Fonte: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 7ª. Ed., Editora da Unicamp, 1997, pg 68).

Bom, agora que você já tem uma boa noção da técnica de cromatografia como um método de separação e purificação de compostos orgânicos, vamos então dar início aos nossos experimentos, como forma de visualizar na prática a teoria que acabamos de ver.



## ATIVIDADES

### 1. Cromatografia em camada delgada

#### Procedimento

Pegue uma placa cromatográfica pronta, de sílica suportada em alumínio. Com o auxílio de um lápis, uma régua e um estilete corte um pedaço da placa no tamanho de 2,5 cm por 7,0 cm, com cuidado para não danificar a camada de sílica de outras regiões da placa. Analise as substâncias fenantreno,  $\beta$ -naftol e anilina segundo a sequência abaixo:

1. Com o auxílio de tubos capilares, aplique cada substância e a mistura em pontos separados de 0,5 cm entre si e em relação às bordas laterais, e distantes 1,0 cm da borda inferior. Deve ser aplicada uma gota (spot) de solução de cada uma das substâncias puras e uma gota da mistura.
2. Com uma proveta de 10,0 mL prepare uma mistura de 0,5 mL de hexano e 9,5 mL de acetato de etila. Transfira 5,0 mL da fase móvel para a cuba cromatográfica, tampe e aguarde saturar o ambiente.
3. Transfira a placa cromatográfica para a cuba de modo que o nível do líquido fique abaixo dos pontos de aplicação, e desenvolva (elua). Espere o desenvolvimento do cromatograma mantendo a cuba fechada.
4. Quando a frente do solvente ficar a 1,0 cm (registre essa distância) da borda superior da placa, retire-a e deixe-a secar totalmente ao ar (10 a 15 minutos).
5. Faça a revelação com lâmpada de UV e marque o contorno das manchas das substâncias UV ativas, cuidadosamente, com o auxílio de um lápis.
6. Em seguida, faça a revelação borrifando com uma solução de anisaldeído (anisaldeído com ácido sulfúrico em etanol).
7. Com o auxílio de uma régua, registrar as distâncias percorridas pela frente do solvente e pelos componentes de cada amostra analisada (fenantreno,  $\beta$ -naftol e anilina), medidas a partir do ponto de aplicação.
8. Repetir estes procedimentos nas seguintes concentrações: hexano/acetato de etila (9:1) e hexano/acetato de etila (8:2).

## COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

- Siga rigorosamente todas as etapas descritas acima para que você possa obter um bom resultado no seu experimento.
- Anote em seu caderno todas as observações que você fizer durante a execução do seu experimento.

## CONCLUSÃO

Esta aula nos deu oportunidade de trabalharmos um dos métodos mais utilizados na prática para separação de compostos orgânicos, a cromatografia. Teoricamente, vimos os vários tipos de cromatografia. Porém, na prática trabalhamos somente a cromatografia em camada delgada. Vimos que esta metodologia também é aplicada para se fazer o monitoramento de uma cromatografia em coluna. Neste experimento foram isoladas as substâncias fenantreno,  $\beta$ -naftol e anilina de uma mistura.

## RESUMO

A cromatografia é um dos métodos mais utilizados na purificação de compostos orgânicos. Trata-se de uma técnica simples uma vez que o princípio de todos os métodos cromatográficos, em última análise, é o mesmo no qual se baseia a extração, ou seja, trata-se da distribuição de uma substância entre duas fases distintas. A cromatografia em camada delgada torna-se uma técnica importante pelo fato dela usar quantidades pequenas de amostra, usualmente menos que um miligrama. Esta técnica é usada com muita frequência quando se quer determinar os componentes de uma mistura, as condições propícias para eluir uma coluna cromatográfica, monitorar uma separação por coluna cromatográfica, determinar a pureza de um produto comercial e, monitorar o progresso de uma reação. Neste experimento você viu os procedimentos necessários para se fazer o isolamento ou a purificação de compostos orgânicos utilizando a técnica da cromatografia em camada delgada, as vantagens e usos deste método e como determinar o  $R_f$  das substâncias. Portanto, a aula de hoje teve como objetivo mostrar o uso desta técnica para separar uma mistura composta das seguintes substâncias: fenantreno,  $\beta$ -naftol e anilina.



## PRÓXIMA AULA

Na próxima aula você verá um método versátil de purificação de compostos orgânicos líquidos – a destilação.

## AUTOAVALIAÇÃO

Com base no experimento realizado:

1. apresente um desenho do seu cromatograma (revelado na luz ultravioleta e no anisaldeído).
2. determine os  $R_f$  de todos os componentes das soluções analisadas;
3. com base nos  $R_f$  dos componentes de sua amostra e considerando as-



pectos estruturais dos constituintes da sua mistura, você poderia fazer uma correspondência entre as manchas observadas e os componentes da mistura?

4. Observe o aspecto da sua cromatoplaça quando revelada sob luz ultravioleta e no anisaldeído e diga quantos componentes foram detectados em cada caso. Considerando os aspectos estruturais dos constituintes da mistura, você avalia como coerente os resultados da comparação? Explique.

### REFERÊNCIAS

Paiva, D. L., Lampman, G. M., Kris, G. S., Introduction to Organic Laboratory, a Comporary Approach, 2nd Ed. Saunders College Publishing, New York, 1982. p. 553-561 e 571-585.

Marques, J. A., Borges, C. P. F., Práticas de Química Orgânica, Ed. Átomo, 2007, p. 151-162.

Eaton, D.C., Laboratory Investigation in Organic Chemistry, McGraw-Hill Book Company, 1989, p. 127-174.